

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

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

Scuola di Dottorato in Scienze Molecolari
Indirizzo Scienze Farmaceutiche
CICLO XXIV

**Radiofarmaci “*metal-based*” nella cardiologia
nucleare e nell’*imaging* tumorale**

Direttore della Scuola: Ch. mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch. mo Prof. Alessandro Dolmella

Coadiutrice: Dott. ssa Cristina Bolzati

Dottorando: Dott. Davide Carta

31 gennaio 2012

Va benissimo sentirsi degli
alieni - non è affatto qualcosa
di sbagliato. Dovresti sentirti
proprio così, perché questo
mondo nel quale devi vivere
non è un mondo che ti
permette di entrare in
sintonia con gli altri, con le
loro idee, con i loro
comportamenti. Questo non è
un mondo giusto - intendo
dire che non è un mondo a
misura d'uomo. E tu vorresti
stare in questo mondo e
sentirti parte? Sarà naturale
sentirsi degli alieni. Ma è
qualcosa che dovrebbe
renderti felice. Resta nel
mondo senza appartenervi...
Non ti mando nel mondo
perché ti perda; ti mando nel
mondo perché tu rimanga te
stesso nonostante il mondo
che ti circonda.

Osho

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE
XXIV Ciclo

Dottorando:

dr. **Davide Carta**
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Via Francesco Marzolo, 5 – 35121, Padova
Email: davide.carta@unipd.it

Supervisore:

Prof. **Alessandro Dolmella**
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Via Francesco Marzolo, 5 – 35121, Padova
Email: alessandro.dolmella@unipd.it

Radiofarmaci “*metal-based*” nella cardiologia nucleare e nell’*imaging* tumorale

Stato dell’Arte

Molti dei nuclidi impiegati nella preparazione di radiofarmaci sono metalli di transizione. Tra questi il ^{99m}Tc , radionuclide gamma emittente ($t_{1/2}=6,02\text{h}$; $E=141\text{keV}$), prodotto attraverso l’uso di un generatore portatile di ^{99}Mo - ^{99m}Tc , è considerato il nuclide di elezione nella diagnosi SPECT (*Single Photon Emission Tomography*). La recente scoperta di un nuovo ed efficiente metodo per la produzione di complessi del ^{99m}Tc contenenti il legame multiplo terminale tecnezio-azoto [$^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$] $^{2+}$ ha aperto la possibilità di valutare l’attività biologica di diverse classi di azoturo complessi di ^{99m}Tc e di proporli come radiofarmaci di perfusione o recettori specifici^[1].

Obbiettivi

Il presente progetto propone un’attività di ricerca che si estende a diversi settori della Medicina Nucleare, quali la Cardiologia, l’*Imaging* Molecolare, la sintesi di nuovi radiofarmaci “*metal-based*”.

Sintesi e valutazione biologica di una serie di nuovi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -eterocomplessi e loro confronto con $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(\text{PNP5})$

Un primo obiettivo consiste nel migliorare le caratteristiche biologiche di $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(\text{PNP5})$, “lead compound” di una serie di azoturo complessi monocationici del tipo [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{DTC}(\text{PNP})$] $^{+}$ (DTC=ditiocarbammato alifatico a catena lineare; PNP=aminodifosfina), attualmente in fase di studio clinico come tracciante di perfusione cardiaca^[2]. L’attività di ricerca sarà focalizzata al miglioramento di un parametro di elevata importanza clinica: l’estrazione di primo passaggio, mantenendo inalterate le favorevoli proprietà diagnostiche. Tale risultato potrà essere conseguito attraverso un attento studio di relazione struttura – attività che prevede una razionale modifica dei leganti ditiocarbammici, ottimizzando il volume molecolare e la lipofilia del complesso finale e, non da ultimo, il suo profilo farmacocinetico.

Saranno quindi sintetizzati leganti ditiocarbammici aliciclici, contenenti diversi eteroatomi opportunamente funzionalizzati: la sintesi sarà condotta in accordo a quanto riportato in letteratura, utilizzando ammine primarie o secondarie. I leganti ottenuti saranno quindi sottoposti a caratterizzazione chimico-fisica mediante analisi elementare e tecniche spettroscopiche.

I leganti ottenuti saranno utilizzati nella preparazione dei corrispondenti complessi a livello macroscopico con ^{99}Tc o $^{185/187}\text{Re}$ ($10^{-3}/10^{-6}$ M) e a livello di tracciante $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($10^{-9}/10^{-11}$ M). I $^{99}\text{Tc}/^{185/187}\text{Re}$ complessi saranno quindi sottoposti a caratterizzazione chimico-fisica allo stato solido ed in soluzione. I complessi prodotti a livello di tracciante ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) saranno invece caratterizzati per comparazione cromatografica TLC e HPLC con gli analoghi composti prodotti a livello millimolare.

Dalla cardiologia nucleare all'imaging tumorale

$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(\text{PNP}5)$ si localizza irreversibilmente nelle strutture mitocondriali in forza di un gradiente elettrico transmembrana negativo. Inoltre, studi di metabolismo condotti al fine di chiarire il meccanismo di rapida rimozione di tale complesso dagli organi non bersaglio hanno dimostrato che $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})\text{DBODC}(\text{PNP}5)$ è eliminato nella sua forma nativa e che l'escrezione è mediata dai trasportatori Pgp/MDR-Pgp (*multidrug resistant proteins*), aspetti questi che lasciano intravedere la possibilità di estendere la applicabilità diagnostica di questo complesso e dei suoi derivati dal campo cardiologico a quello oncologico.

In questa parte del progetto si intende quindi valutare la possibilità di estendere l'applicabilità diagnostica di questo nuovo tracciante al monitoraggio e visualizzazione di alcune forme neoplastiche caratterizzate da elevata densità mitocondriale, nonché alla valutazione della refrattarietà delle cellule al suo accumulo.

Applicabilità della tecnologia $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ alla preparazione di radiofarmaci target-specifici

Un terzo obiettivo consiste nel verificare la possibilità di applicare il frammento molecolare $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ alla marcatura di molecole biologicamente attive mantenendo inalterate le proprietà biologiche di queste ultime. $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ può essere coordinato in modo efficiente e versatile dall'amminoacido cisteina a formare complessi neutri o carichi, caratterizzati da una elevata attività specifica. Nel caso di peptidi, l'aggiunta di un residuo cisteinico terminale alla sequenza amminoacidica prescelta consente di ottenere un chelante bifunzionale in grado di reagire selettivamente con il frammento molecolare dando così origine al complesso finale^[3].

Molecole di interesse nella selezione di sonde molecolari con cisteina possono essere: *i*) peptidi contenenti la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp) selettiva verso l'integrina alfa-V beta-3 coinvolta nell'angiogenesi ed in numerose metastasi tumorali; *ii*) derivati dell'ormone alfa-MSH in grado di legare con elevata selettività recettori della melanocortina-1 (MC-1) sovra espressi sulla superficie di cellule melanomatose.

Alla preparazione dei corrispondenti complessi seguiranno lo studio di stabilità in vitro e di transchelazione con cisteina e glutatione, nonché la valutazione biologica in vitro ed in vivo.

Analogamente ed in parallelo sarà valutata anche l'applicabilità del frammento $[\text{Tc}(\text{N})(\text{R}_2\text{PS})]^{2+}$ (R_2PS =fosfotriolo variamente sostituito), nella preparazione di radiofarmaci target-specifici.

1. Bolzati C., Boschi A., Uccelli L., Tisato F., Refosco F., Cagnolini A., Duatti A., Prakash S., Bandoli G., Chemistry of the Strong Electrophilic Metal Fragment $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ (PXP = Diphosphine Ligand). A Novel Tool for the Selective Labelling of Small Molecules, *Journal of the American Chemical Society* vol 124, 38 11468 – 11479.
2. Cittanti C. et al., Whole Body Biodistribution and Radiation Dosimetry of the New Cardiac Tracer $^{99\text{m}}\text{Tc}\text{-N-DBODC}$. (2008), *J Nucl Med* 49, 1299 – 1304.
Bolzati C., Cavazza-Ceccato M., Agostini S., Tokunaga S., Bandoli G., Subcellular Distribution and Metabolism of the Potential Myocardial Imaging Agent $[\text{Tc}(\text{N})(\text{DBODC})(\text{PNP}5)]$. *J Nucl Med* (2008); 49: 1336 – 1344.
3. Bolzati C., Caporale A., Agostini S., Carta D., Cavazza-Ceccato M., Refosco F., Tisato F., Schievano E., Bandoli G., Avidin-biotin system: a small library of cysteine biotinylated derivatives designed for the $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ metal fragment, *Nuclear Medicine and Biology* 34 (2206) 511 – 522.

Sommario

Molti dei nuclidi usati nella preparazione di radiofarmaci sono metalli di transizione. Tra questi, il ^{99m}Tc , radionuclide gamma emittente ($t_{1/2}=6.02$ h; $E=141$ keV), prodotto attraverso l'uso di un generatore portatile di $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, è considerato il nuclide di elezione nella diagnosi SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*). La recente scoperta di un nuovo ed efficiente metodo per la produzione di complessi del ^{99m}Tc contenenti il legame multiplo terminale tecnecio-azoto [$^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$] $^{2+}$ ha aperto la possibilità di valutare l'attività biologica di diverse classi di azoturo complessi di ^{99m}Tc e di proporli come radiofarmaci di perfusione o recettore specifici. Il crescente interesse verso questa categoria di composti è proprio legato alla presenza del core [$^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$] $^{2+}$, che conferisce ai complessi elevata stabilità termodinamica e cinetica e resistenza ai processi ossido-riduttivi. Di conseguenza, diversi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -eterocomplessi sono stati sviluppati e valutati come potenziali agenti diagnostici. Esempi ne sono complessi simmetrici bi-sostituiti del tipo [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DTC})_2$] (DTC = ditiocarbammati), ed in particolare complessi asimmetrici bi-sostituiti del tipo [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{YZ})$] $^{+/0}$ (PNP = amminodifosfina; YZ = ditiocarbammati, derivati della cisteina come N-Acetil-Cys [O^-, S^-], Cys-OEt [NH_2, S^-]).

Tra questi, [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})$] $^+$ (DBODC = bis-(N-etossietil)ditiocarbammati; PNP5 = bis-(dimetossipropilfosfinoetil)etossietilammina) è il composto capostipite di una serie di derivati allo studio come potenziali agenti per l'imaging cardiaco e le cui caratteristiche biodistributive sono tali da consentire l'ottenimento di immagini di qualità diagnostica superiore a quelle ottenute con i traccianti attualmente in uso clinico (^{99m}Tc -Sestamibi e ^{99m}Tc -Tetrofosfin).

Studi di distribuzione sub-cellulare condotti sul miocardio isolato di ratto hanno evidenziato che [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})$] $^+$ analogamente a ^{99m}Tc -Sestamibi e ^{99m}Tc -Tetrofosfin è intrappolato nelle strutture mitocondriali grazie alla presenza di un potenziale di membrana negativo. Inoltre, studi di metabolismo condotti al fine di chiarire in meccanismo di rapida rimozione di tale complesso dagli organi non bersaglio hanno dimostrato che l'agente è eliminato nella sua forma nativa e che l'escrezione è mediata da trasportatori PgP/MDR-PgP, aspetti questi che lasciano intravedere la possibilità di ampliare l'ambito di applicazione di questo tracciante e dei suoi derivati.

L'introduzione in campo clinico di radiofarmaci ^{99m}Tc -target specifici contenenti piccoli peptidi, è estremamente limitato. Il punto focale nello sviluppo di questo tipo di traccianti, risiede nella necessità di disporre di un efficiente metodo di sintesi che non alteri la biospecificità della molecola nativa e che permetta di ottenere il radiofarmaco con una elevata attività specifica. In particolare, è stato dimostrato come la cisteina sia un efficiente sistema chelante per il frammento [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)$] $^{2+}$, portando alla formazione di complessi con alta attività specifica ($70 \text{ GBq}\cdot\text{mol}^{-1}$). La cisteina è quindi un buon chelante bifunzionale per la marcatura di molecole bioattive. In questo ambito, i peptidi sintetici grazie alle loro favorevoli caratteristiche farmacocinetiche rappresentano biomolecole di prima scelta per monitorare la variazione della popolazione e della funzionalità recettoriale associata ad una patologia tumorale, rispetto all'uso di proteine o anticorpi monoclonali. Di conseguenza è sufficiente aggiungere un residuo cisteinico terminale alla sequenza amminoacidica prescelta per ottenere un legante bifunzionale in grado di reagire selettivamente con il frammento [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)$] $^{2+}$ dando così origine al complesso finale [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)(\text{Cys-R})$] $^{+/0}$.

Negli ultimi anni, alcuni dei membri del gruppo di ricerca hanno riportato una nuova ed efficiente metodologia sintetica per la sintesi in alta resa di azoturo complessi di Tc(V) utilizzabili nella preparazione di radiofarmaci di perfusione e recettore specifici. Tale metodo si basa sulle proprietà chimiche del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{X}_2(\text{PNP})]^{+/0}$ (PNP = difosfinamina, X = OH₂, Cl, OH⁻). Nel frammento molecolare $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$ la presenza degli atomi di fosforo π-accettori determina l'aumento delle sue caratteristiche elettrofile rendendolo particolarmente reattivo verso specie nucleofile contenenti atomi π-donatori. In particolare, leganti bidentati (YZ) che contengono atomi coordinanti quali S, O, N hanno mostrato la più alta affinità per la specie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$, dando così origine ad una serie di composti asimmetrici del tipo $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{YZ})]^{+/0}$ caratterizzati dalla presenza di due diversi leganti bidentati coordinati allo stesso centro metallico. La possibilità di saturare in maniera non simmetrica la sfera di coordinazione del metallo apre la strada alla realizzazione di un'ampia varietà di radiocomplessi, le cui caratteristiche chimico-fisiche possono essere finemente modulate conferendo agli stessi particolari e desiderate proprietà farmacocinetiche. Lo scopo del presente lavoro è quello di verificare la possibilità di applicare questo paradigma di sintesi alla preparazione di composti di perfusione e alla marcatura di molecole biologicamente attive di comprovata o potenziale importanza clinica sia dal punto di vista diagnostico sia terapeutico e conseguentemente alla preparazione di ^{99m}Tc-radiofarmaci capaci di interagire in modo selettivo con recettori posti sulla superficie di cellule coinvolte in processi infiammatori, degenerativi o neoplastici.

Applicabilità alla preparazione di radiofarmaci di perfusione

A. Sintesi e valutazione biologica di una serie di ^{99m}Tc(N)-eterocomplessi e loro confronto con $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

Un ideale agente di perfusione cardiaca deve presentare alcuni importanti requisiti, quali: un'elevata e persistente captazione cardiaca (proporzionale al flusso nel più ampio intervallo di valori), una rapida clearance ematica, una rapida eliminazione dai tessuti non bersaglio critici (fegato e polmoni), un'elevata estrazione di primo passaggio. A dispetto dei molteplici sforzi condotti, un tracciante cardiaco in possesso dei requisiti sopra elencati deve ancora essere trovato. Nonostante l'elevato uso clinico, ^{99m}Tc-Sestamibi e ^{99m}Tc-Tetrofosfin si discostano da questi requisiti; in particolare il loro elevato accumulo epatico rende particolarmente difficile l'interpretazione delle immagini corrispondenti alla parete infero-apicale del miocardio. Di recente, utilizzando la chimica del frammento molecolare $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$, è stata proposta la realizzazione di nuovi traccianti di perfusione cardiaca. In particolare, il complesso monocationico $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ ha rivelato delle proprietà biologiche che si avvicinano a quelle ideali. Studi biodistributivi hanno evidenziato un elevato e persistente accumulo del tracciante nel tessuto cardiaco, con cinetiche d'eliminazione ematica, polmonare ed epatica estremamente rapide e quantitative; fattori questi che permettono l'acquisizione in tempi brevi d'immagini di elevata qualità diagnostica, superiore a quelle ottenute con i complessi monocationici ^{99m}Tc-Sestamibi e ^{99m}Tc-Tetrofosfin. In particolare tale favorevole combinazione permette una chiara visualizzazione di alterazioni che interessano la parete infero-apicale del miocardio. A queste promettenti caratteristiche si associano aspetti indesiderabili, tipici dei traccianti monocationici, quali una relativamente bassa estrazione di primo passaggio (ca. 60%) e una

trascurabile redistribuzione se comparati con quella di complessi neutri, non in uso clinico, come ^{99m}Tc -Teboroxime (88-91%) e ^{99m}Tc (N)-Noet (80-90%). Per questi ultimi composti, l'elevata estrazione di primo passaggio e la relativa redistribuzione sono correlate ad una maggiore mobilità dovuta alla elevata lipofilità del prodotto e all'assenza di carica.

Traccianti cardiaci caratterizzati da un'elevata estrazione di primo passaggio permettono, a tempi brevi dalla somministrazione, una corretta valutazione quantitativa dello stato dei singoli miociti e dell'efficienza della pompa cardiaca nel suo complesso anche nelle aree ipoperfuse.

In questa sezione del lavoro (*SEZIONE A*) si intende valutare la possibilità di migliorare le caratteristiche biologiche di $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$, in particolare di incrementare l'estrazione di primo passaggio mantenendo inalterate le sue favorevoli proprietà diagnostiche. Tale risultato potrà essere raggiunto variando alcuni parametri chimico-fisici, fondamentali quali il volume molecolare e la lipofilia. L'asimmetria del complesso consente infatti, attraverso l'introduzione di opportune variazioni indipendenti del legante difosfinamminico e di quello ditiocarbamminico, di ottimizzare il profilo farmacocinetico del complesso finale, permettendo così di realizzare versioni sperabilmente migliorate di $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$. Allo scopo sono utilizzati leganti ditiocarbamminici aliciclici contenenti diversi eteroatomi opportunamente funzionalizzati.

I nuovi leganti sono caratterizzati mediante analisi elementare, tecniche spettroscopiche e di spettrometria di massa. La preparazione dei nuovi complessi con ^{99m}Tc e la relativa caratterizzazione è eseguita tramite analisi cromatografiche quantitative TLC e HPLC. La stabilità in vitro è condotta valutando la resistenza alla transchelazione in presenza di eccessi di glutatione e cisteina. I traccianti di maggiore interesse sono valutati nel loro profilo biodistributivo e nella loro capacità diagnostica.

A. $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$: dalla cardiologia nucleare all'imaging tumorale

^{99m}Tc -Stestamibi è stato uno dei primi traccianti, originariamente sviluppati come radiofarmaci per imaging cardiaco, ad essere utilizzato nella diagnosi di alcuni tipi di tumore e validato come substrato *MDR-PgP* (*multidrug resistance proteins*), e quindi come tracciante nella visualizzazione in vivo attraverso l'uso di tecniche tomografiche dell'espressione di *MDR-PgP*. Tale utilizzo è possibile grazie al meccanismo di accumulo del tracciante all'interno delle strutture mitocondriali, guidato da un processo di diffusione passiva e sostenuto da un gradiente elettrico generato da un elevato potenziale di transmembrana mitocondriale, che ne determina un intrappolamento irreversibile. Il suo accumulo è particolarmente pronunciato, fino a dieci volte maggiore, in cellule tumorali sensibili che presentano una densità mitocondriale superiore rispetto a quella di cellule normali, in virtù di una maggiore differenza di gradiente elettrico (60 mV). Una riduzione dell'accumulo intracellulare di questo tracciante può essere correlata a diversi fenomeni biologici, alcuni dei quali sono associati alla sovra-espressione di particolari glicoproteine trans-membrana *MDR-PgP*, ATP dipendenti, prodotte dal gene *MDR-1*. Queste proteine regolano l'efflusso di numerosi agenti ad azione citotossica (con caratteristiche strutturali e funzionali diverse), rendendo in questo modo le cellule tumorali resistenti all'azione di diversi farmaci. In queste cellule l'accumulo di ^{99m}Tc -Sestamibi è inversamente proporzionale ai livelli di espressione di *PgP*, come dimostrato dall'aumentata captazione

del tracciante dopo esposizione delle stesse a modulatori di MDR (verapamil, ciclosporina A, elacridar e valsopodar). Queste sostanze, bloccando la funzione delle Pgp, inducono un aumento della concentrazione del tracciante all'interno delle cellule.

Dal punto di vista clinico, la valutazione in vivo dell'espressione e della funzionalità delle MDR-Pgp, permette di selezionare pazienti che possono beneficiare di trattamenti terapeutici (chemioterapici); di distinguere se la farmaco resistenza che si è instaurata è mediata da Pgp o meno e quindi selezionare pazienti che possono beneficiare del trattamento con inibitori delle Pgp. Inoltre, misure funzionali che definiscono lo stato di MDR-Pgp mediante l'applicazione di tecniche non invasive quali possono essere la SPECT rappresentano un maggior vantaggio rispetto alle tecniche di valutazione convenzionali in vitro che necessitano di prelievi biotici.

Analogamente a quanto osservato per ^{99m}Tc -Sestamibi, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ si localizza irreversibilmente nelle strutture mitocondriali in forza di un gradiente elettrico trans-membrana negativo come dimostrato da studi di distribuzione subcellulare, condotti su miocardio isolato di ratto. Inoltre, studi di metabolismo condotti al fine di chiarire il meccanismo di rapida rimozione di tale complesso dagli organi non bersaglio hanno dimostrato che $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ è eliminato nella sua forma nativa e che l'escrezione è mediata da trasportari Pgp/MDR-Pgp, aspetti questi che lasciano intravedere la possibilità di estendere l'applicabilità diagnostica di questo nuovo tracciante al monitoraggio e visualizzazione di alcune forme neoplastiche (benigne e maligne), caratterizzate da una elevata densità mitocondriale, nonché alla valutazione della refrattarietà delle cellule al suo accumulo.

In questa sezione (*SEZIONE B*), è valutata in vitro la cinetica di accumulo di $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ a 4 ° e 37 °C, in alcune linee cellulari quali 2008 (*human ovarian cancer*) e MCF-7 (*human breast cancer*) e nelle corrispondenti linee farmaco-resistenti (C13 e MCF-7/MDR⁺), in presenza e non di opportuni MDR modulatori, utilizzando ^{99m}Tc -Sestamibi come riferimento.

Applicabilità alla preparazione di radiofarmaci *target*-specifici

Lo scopo (*SEZIONE C*) di questa parte del lavoro consiste nel verificare la possibilità di applicare il frammento molecolare $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$ alla marcatura di molecole biologicamente attive mantenendo inalterate le proprietà biologiche di queste ultime. Come già riportato, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$ può essere coordinato in modo efficiente e versatile dall'amminoacido cisteina a formare complessi neutri o cariche del tipo $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)(\text{Cys-R})]^{+/0}$, caratterizzati da una elevata attività specifica. Nel caso di peptidi, l'aggiunta di un residuo cisteinico terminale alla sequenza amminoacidica prescelta consente di ottenere un chelante bifunzionale in grado di reagire selettivamente con il frammento molecolare dando così origine al complesso finale. Poiché l'aggiunta ulteriore di un amminoacido ad una catena peptidica costituisce una modificazione naturale la struttura chimica del peptide risultante non è significativamente perturbata e, in questo modo, è possibile mantenere quasi inalterate le proprietà biologiche originarie. Questa parte del lavoro è stata organizzata come segue:

1. sintesi e modificazione di selezionate sonde molecolari con cisteina. Molecole di interesse sono derivati dell'ormone α -MSH, in grado di legare con elevata specificità e selettività

recettori della melanocortina-1 (MC-1), sovraespressi sulla superficie di cellule melanomatose. I peptidi così ottenuti sono stati coniugati al frammento molecolare $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$ ottenendo complessi asimmetrici monocationici $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)(\text{Cys-NS})]^+$, o neutri $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_n)(\text{Cys-OS})]$.

1. preparazione dei corrispondenti complessi con ^{99m}Tc e ^{188}Re .
2. studi di stabilità in vitro e di transchelazione con cisteina e glutatione dei complessi radiomarcanti.
3. Valutazione biologica in vitro ed in vivo.

Abstract

Synthesis and biological evaluation of a series of new $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -heterocomplexes and comparison with $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

Over the last few years, using $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ technology, some members of my research unit proposed a new series of myocardial tracers, characterized by the presence of a terminal technetium - nitrogen multiple bond. In particular, the monocationic $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ complex shows original imaging properties approaching the ideal behavior. Animal studies revealed a high and persistent myocardial uptake as well as rapid blood, lungs and liver clearance thus exhibiting unprecedented imaging characteristics with respect to the commercially available myocardial imaging agents, ^{99m}Tc -Sestamibi and ^{99m}Tc -Tetrofosmin. In particular, this favorable combination permits clear visualization of the presence of myocardial infer apical wall alterations.

Tracers with higher first-pass extraction will accurately track blood flows over a wider range than tracers with lower first-pass extraction and thus may potentially be more sensitive for the quantitative evaluation of milder flow-limiting coronary stenosis under stress conditions; in addition a non-linear behavior would be preferred for a qualitative assessment. Thus, modification of the $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ compound in order to increase its first pass extraction fraction, while keeping the remaining imaging properties unaltered, would be required. This goal can be achieved by varying some crucial physico-chemical parameters such as lipophilicity and molecular volume. The asymmetrical nature of these compounds permits, through the independent variation of the diphosphinoamine and the dithiocarbamate ligands, the fine tuning of its biological properties, thus obtaining an improvement of the favorable properties of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$. For this purpose aliphatic PNP ligands containing alkoxy-alkyl chains and alicyclic dithiocarbamate ligands appropriately modified and containing different heteroatoms will be used. This part of the project will be set up as follows:

1. Synthesis and physico-chemical characterization of the ligands by means of elemental analysis, spectroscopic methods (IR, NMR, X-Rays), mass spectrometry.
2. Synthesis of the corresponding complexes with $^{99/99m}\text{Tc}$ and their physico-chemical characterization in the solid state and in solution. Qualitative and quantitative chromatographic analysis, by TLC and HPLC, will also be performed.
3. In vitro stability and transchelation towards an excess of cysteine and glutathione of all synthesized compounds will be evaluated. Comparison of biodistribution data of these new compounds with the biological profiles of the $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ complex and of the commercially available ^{99m}Tc -agents is presented.

$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ from nuclear cardiology to tumor imaging

^{99m}Tc -Sestamibi has been one of the first tracers initially developed as myocardial imaging agents to be employed for the diagnosing of several kind of tumors and validated as suitable substrate for MDR-Pgp (multidrug resistance proteins), hence like a tracer for in vivo visualization of MDR-Pgp expression through tomography techniques. Such use was made possible by an

irreversible trapping mechanism of the tracer into the mitochondrial structures driven by a passive diffusion process also supported by an electric gradient due to a high mitochondrial transmembrane potential.

Analogously to ^{99m}Tc -Sestamibi, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ was irreversibly localized into the mitochondrial structure thanks to the negative mitochondrial transmembrane potential. In addition, metabolic studies aimed to clarify the reason behind the rapid excretion of the complex from non-target tissues revealed that the agent was eliminated in the native form and that the rapid excretion of the complex from the principal organs of metabolism is correlated to the Pgp / MDR-Pgp transport function of these sites as evidenced by the Pgp inhibition studies. This behavior suggests extending the clinical applications from cardiology to oncology.

In this part of the project it is planned to evaluate the feasibility of extending the diagnostic application of this agent to the imaging and monitoring of some benign and malignant neoplastic forms, as well as to the assessment of the cell resistance.

More in detail will be evaluated the uptake kinetic, at 4 and 37°C, of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ and some analogs in selected cell lines such as 2008 (human ovarian cancer) and MCF7 (human breast cancer) and the corresponding resistant cell lines, using ^{99m}Tc -Sestamibi as reference.

Applicability of $[\text{}^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ technology to the preparation of target specific agents

Recently some members of my research unit reported a new and efficient synthetic method for the preparation, in high yield, of asymmetrical Tc(V) and Re(V) nitrido complexes useful in the development of perfusion and target specific radiopharmaceuticals. This method is based on the chemical properties of the $[\text{M}(\text{N})\text{X}_2(\text{PNP})]^{0/+}$ complex ($\text{M} = ^{99/99m}\text{Tc}, ^{185/187/188}\text{Re}$, PNP=diphosphinamine, X=OH₂, Cl, OH⁻). In the $[\text{M}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ moiety the π-acceptor P atoms induce an enhancement of the electrophilic behavior, thus increasing the reactivity towards nucleophiles containing σ-donor atoms. In particular, bidentate ligands (YZ) containing O, N, S donor atoms showed high affinity for the $[\text{M}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ moiety, thus giving a series of asymmetrical compounds of the type $[\text{M}(\text{N})(\text{YX})(\text{PNP})]^{0/+}$ (YZ=dithiocarbamates or cysteine derivatives), featuring two different bidentate ligands coordinated to the same metal center. The opportunity of saturating asymmetrically the metal coordination sphere opens the avenue to the realization of a wide variety of radio-complexes whose physicochemical properties can be finely tuned to confer specific and desirable pharmacokinetic properties to the final complexes.

The aim of the present project is to verify the applicability of this synthetic paradigm for the labeling of known or potentially clinically relevant bioactive molecules either from the diagnostic or therapeutic point of view. The scope of this part of the project is to verify the opportunity to apply $[\text{M}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ technology to the labeling of bioactive molecules without altering their biological properties. The amino-acid Cys displays excellent coordinating properties toward the $[\text{M}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ providing a simple way to incorporate short peptide chains into a nitrido asymmetrical complex. Cys binds the $[\text{M}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ moiety to yield the corresponding mixed $[\text{M}(\text{N})(\text{Cys-R})(\text{PNP})]^{0/+}$ compound in high specific activity (70GBq/mol). Using peptides, the addition of a terminal cysteine residue to the selected amino acid sequence affords an efficient bifunctional chelate which selectively reacts with the molecular fragment producing the final asymmetrical complex. Since the addition of another amino acid to a peptide chain represents a natural modification, the chemical structure of the resulting peptide does not suffer from a significant

perturbation. In this way the native biological properties are preserved almost unmodified. Preliminary studies carried out using different peptides such as the CCK8¹ (active on the CCK2 receptor over-expressed in several tumors of neuroendocrin origin), gave a clear indication in this way.

Molecules that are taken into consideration in this shared research project are two α -MSH hormone derived peptide analogs with high specificity and selectivity toward melacortin-1 (MC-1) receptors over expressed on the surface of melanoma cells. Following this scheme it will be possible to obtain monocationic asymmetrical complexes.

This part of the project is organized in the following phases:

1. Synthesis of the corresponding complexes with ^{99m}Tc.
2. Binding and imaging studies in both healthy and tumor bearing mice/rats.

The second part of the project consist in the validation of PEGylated N-methyl-S-methyl dithiocarbazate as a new reagent for the high-yield preparation of nitrido ¹⁸⁸Re radiopharmaceuticals.

The current availability of efficient methods for the high-yield production of ^{99m}Tc and ¹⁸⁸Re compounds^[a] containing the terminal $[M(N)]^{2+}$ (M=^{99m}Tc, ¹⁸⁸Re) group at no-carrier-added (NCA) level^[b] has stimulated interest in the preparation of new ^{99m}Tc and ¹⁸⁸Re radiopharmaceuticals for diagnostic and therapeutic applications. Since the nitrido N³⁻ ligand is considered the strongest π -donor group, it can effectively impart a strong stabilization to metals in high oxidation states. Actually, the $[M\equiv N]^{2+}$ core (M=^{99m}Tc and ¹⁸⁸Re) exhibits a remarkable redox inertness and high stability over a wide range of pH values, a fact that makes it an interesting candidate for nuclear medicine applications^[c,d].

The route towards the efficient preparation of ^{99m}Tc nitrido $[^{99m}\text{TcN}]^{2+}$ compounds resulted unexpectedly from experiments involving the reaction of $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ with triphenyl-phosphine (PPh₃) and the Schiff base derivative of dithiocarbazic acid, S-methyl-3-(2-hydroxybenzylidene) dithiocarbazate (H₂L), under acidic conditions. In this reaction, H₂L played the role of both coordinating ligand and donor of nitrido (N³⁻) nitrogen atoms, and the unexpected product was the ^{99m}Tc nitrido complex $[^{99m}\text{Tc}(N)(L)(\text{PPh}_3)]$. Further studies showed that the simpler derivative N-methyl- S-methyl di thiocarbazate $[\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{S})\text{SCH}_3=\text{HDTCZ}]$ is a very powerful source of N³⁻ groups in the reaction with $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ as only a few micrograms of this reagent are required to afford the $[^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ core.

The prominent role of HDTCZ as a generator of N³⁻ groups was sharply confirmed by studies aimed at obtaining the analogous ¹⁸⁸Re $\equiv\text{N}$ group from the generator- produced $[^{188}\text{ReO}_4]^-$ ^[a]. The formation of this metallic core in physiological solution is far more difficult than for the ^{99m}Tc analogue because of the lower standard of reduction potential of rhenium complexes. Despite this, the reaction of $[^{188}\text{ReO}_4]^-$ with DTCZ, in the presence of sodium EDTA and standard amounts (≤ 1 mg) of SnCl₂, at room temperature, gave ¹⁸⁸Re-nitrido complexes in high yield. On the contrary, other N³⁻ donors, efficiently employed with $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$, yielded only incomplete conversion of $[^{188}\text{ReO}_4]^-$.

¹ Stefania Agostini, Cristina Bolzati, Eliana Didoné, Mario Cavazza Ceccato, Fiorenzo Refosco, Luigi Aloj, Claudio Arra, Michela Aurilio, Anna Lucia Tornesello, Diego Tesauro and Giancarlo 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.

The main driving force that makes HDTCZ an excellent reagent in the formation of the $[M\equiv N]^{2+}$ core ($M=^{99m}\text{Tc}$ and ^{188}Re) can be surely attributed to its combined ability to donate N^{3-} groups and, concomitantly, to stabilize the metal center by coordination as a bidentate ligand.

Indeed, a number of Tc and Re complexes have been isolated and characterized where HDTCZ is bound to the metal as a monoanionic bidentate ligand (DTCZ) through the neutral sulfur atom of the $-\text{C}=\text{S}$ moiety and the deprotonated terminal amino group, thus supporting the view that DTCZ coordination would be an important step in the mechanism of formation of the $M\equiv\text{N}$ group [e]. However, the good chelating properties of DTCZ become a disadvantage when exchange reaction by another ligand has to be carried out to obtain the desired final complex. Usually, this can be accomplished by increasing the amount of the exchanging ligand, but this constitutes an important limitation when high specific activities are required.

To overcome this major drawback, we attempt to validate a new dithiocarbazate derivative exhibiting a lower coordinating ability for the metal while preserving its N^{3-} donor properties. For this purpose², a sterically encumbering substituent, R, has been appended to the primary amine group of HDTCZ: a polyethyleneglycol (PEG, average Mn 600) conjugate of HDTCZ (HO2C-PEG600-DTCZ).

This second part of the project is organized in the following phases:

1. Validation of PEGylated N-methyl-S-methyl dithiocarbazate as a new reagent for the high-yield preparation of nitrido ^{188}Re radiopharmaceuticals.
2. The consequent possible preparation of a series of previously described mixed asymmetrical nitrido technetium and previously unreported rhenium compounds of the type $[M(\text{N})(\text{Cys-R})(\text{PNP})]^{0/+}$ (PNP=diphosphine ligand; Cys-R= α -MSH hormone derived peptide analogs with high specificity and selectivity toward melacortin-1 (MC-1) receptors).

References

- a. Boschi A, Bolzati C, Uccelli L, Duatti A., *High-yield synthesis of the terminal $^{188}\text{Re}\equiv\text{N}$ multiple bond from generator-produced $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$* , Nucl Med Biol 2003;30:381–7.
- b. Pasqualini R, Comazzi V, Bellande E, Duatti A, Marchi A., *A new efficient method for the preparation of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals containing the $\text{Tc}\equiv\text{N}$ multiple bond*, Int J Appl Radiat Isot 1992;43: 1329–33.
- c. Pasqualini R, Duatti A., *Synthesis and characterization of the new neutral myocardial imaging agent $[\text{}^{99m}\text{TcN}(\text{noet})_2]$ (noet=N-ethyl-N- ethoxydithiocarbamate)*, J Chem Soc Chem Commun 1992:1354–5.
- d. Zhang J, Wang X, Li CY., *Synthesis and biodistribution of a new ^{99m}Tc nitrido complex for cerebral imaging*, Nucl Med Biol 2002;29 (6):665–9.
- e. Marchi A, Duatti A, Rossi R, Magon L, Pasqualini R, Bertolasi V, et al., *Technetium(V)-nitrido complexes of dithiocarbazic acid derivatives. Reactivity of $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ core towards schiff bases derived from S-methyl dithiocarbazate. Crystal structures of $[\text{S-methyl 3-(2-hydroxyphenyl-methylene)dithiocarbazato}]$ nitrido (tri-phenylphosphine)technetium(V) and bis (S-methyl 3-isopropylidene-dithiocarbazato)nitridotechnetium(V)*, J Chem Soc Dalton Trans 1988:1743–9.

² Alessandra Boschi, Alessandro Massi, Licia Uccelli, Micol Pasquali and Adriano Duatti, *PEGylated N-methyl-S-methyl dithiocarbazate as a new reagent for the high-yield preparation of nitrido Tc-99m and Re-188 radiopharmaceuticals*, Nuclear Medicine and Biology 37 (2010) 927-934.

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. Il progetto propone un'attività di ricerca che si estende a diversi settori della Medicina Nucleare, quali la Cardiologia, l'*Imaging* Molecolare e la sintesi di nuovi radiofarmaci "metal-based".

- *Sezione A.*

In questa sezione sono riportati gli studi di sintesi e valutazione biologica di nitruro complessi di Tc-99m, quali potenziali agenti per scintigrafia di perfusione miocardica e il loro confronto con $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, "lead compound".

- *Sezione B.*

In questa sezione sono riportati gli studi di uptake cellulare di ^{99m}Tc -Sestamibi e $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, allo scopo di validare quest'ultimo come substrato di trasportatori PgP/MDR-PgP (*multidrug resistant proteins*), considerando la possibilità di estendere l'applicabilità diagnostica di questo complesso e dei suoi derivati dal campo cardiologico a quello oncologico.

- *Sezione C.*

In questa sezione sono riportati gli studi di sintesi e valutazione biologica di nitruro complessi di Tc-99m con i peptidi NAP-NS1 e NAP-NS2, quali potenziali agenti recettore-specifici utilizzabili in Medicina Nucleare molecolare per la visualizzazione di tessuti neoplastici esprimenti i recettori MC1.

In questa sezione sono inoltre riportati i tentativi mirati alla sintesi di nitruro complessi di Re-188, volti ad ampliare l'applicabilità del metodo del frammento metallico $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$, alla preparazione di composti utilizzabili in radioterapia recettore-specifica.

Indice

Frontespizio	I
Progetto di Dottorato, ciclo XXIV	V
Sommario	VII
Abstract	XI
Introduzione al lavoro	XVII
Questo Indice	XIX
Prefazione	1

Sezione A:

Sintesi e valutazione biologica di nuovi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -eterocomplessi e loro confronto con $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

A1. Obiettivo	7
A2. Introduzione	11
A2.1 Medicina Nucleare	11
A2.2 Radiofarmaci: definizione e classificazione	11
A2.3 Preparazione dei radiofarmaci di ^{99m}Tc più comunemente utilizzati	26
A2.4 Il core $[\text{Me}^{(v)}(\text{N})]^{2+}_{int}$ (Me: Tc, Re), il ruolo dei leganti PNP	33
A2.5 Cardiologia Nucleare	43
A2.6 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$	49
A3. Parte Sperimentale	53
A3.1 Materiali e Metodi	53
A3.2 Sintesi di una libreria di leganti ditiocarbamici aliciclici	54
A3.3 Preparazione dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	58
A3.4 Purificazione dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	59
A3.5 Studi di stabilità su $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	60
A3.6 Studi di biodistribuzione <i>ex-vivo</i> su $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	61
A4. Risultati e Discussione	63
A5. Conclusioni	77
A.6 Riferimenti bibliografici	79

Sezione B:

$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$: dalla Cardiologia Nucleare all'*Imaging* tumorale

B1. Obiettivo	87
B2. Introduzione	91
B2.1 Rilevanza della <i>Multi Drug Resistance</i> nei trattamenti chemioterapici	91
B2.2 Proteine appartenenti alla famiglia delle <i>ATP-Binding Cassette</i>	92
B2.3 Glicoproteina-P (P-gp/MDR1)	94
B2.4 Famiglia MRP	97
B2.5 Proteina resistente al cancro al seno (BCRP/ABCG2)	101
B2.6 Studi clinici sugli inibitori di MDR	102
B2.7 Trasporto di farmaci chemioterapici mediato dalla P-gp MDR1	116
B2.8 Agenti SPECT come tracciati dell'attività di trasporto della P-gp	116
B2.9 $[^{99m}\text{Tc}\text{-Sestamibi}]^+$ (MIBI), tracciante tumorale e di MDR	119
B2.10 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, dalla cardiologia all'oncologia	123
B3. Parte Sperimentale	131
B3.1 Materiali	131
B3.2 Strumentazioni e prodotti per cromatografia	131
B3.3 Linee cellulari	132
B3.4 Preparazione e purificazione di $^{99m}\text{Tc}\text{-Sestamibi}$	132
B3.5 Preparazione e purificazione di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$	132
B3.6 Studi di captazione cellulare	133
B4. Risultati e Discussione	135
B5. Conclusioni	169
B6. Riferimenti bibliografici	171

Sezione C:

Applicabilità della tecnologia $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ alla preparazione di radiofarmaci target specifici

C1. Obiettivo	177
C2. Introduzione	181
C2.1 Imaging Molecolare	181
C2.2 Radiofarmaci <i>target</i> specifici	182
C2.3 Imaging recettoriale con peptidi	183
C2.4 Analoghi radiomarcanti di $\alpha\text{-MSH}$: lo stato dell'arte	184
C2.5 Renio-186 e Renio-188	188
C2.6 Chimica di coordinazione del Renio	191
C2.7 Reattività dei complessi di Renio	193

C2.8	Strategie sintetiche di marcatura di biomolecole con ^{186}Re e ^{188}Re	194
C2.9	Radiofarmaci di Re-188	197
C3. Parte Sperimentale		199
C3.1	Materiali	199
C3.2	Sintesi del legante amminodifosfinico PNP43	200
C3.3	Sintesi dei derivati di α -MSH: NAP-NS1 e NAP-NS2	203
C3.4	Sintesi dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	205
C3.5	Studi in vitro dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	207
C3.6	Biodistribuzione dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	207
C3.7	Sintesi di [$^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})$] $^{+}$	208
C3.8	Sintesi di HOOC-PEG ₆₀₀ -DTCZ	209
C3.9	Sintesi di NOTA-NAP-NS1nc	209
C3.10	NOTA-NAP-NS1nc, marcatura con Cu-64 e Ga-68	210
C4. Risultati e Discussione		211
C5. Conclusioni		241
C6. Riferimenti Bibliografici		243
<i>Appendice: Sigle ed abbreviazioni</i>		247

Prefazione

La medicina nucleare: imaging (e terapia) molecolare

Gli organismi viventi, gli esseri umani primi tra tutti, sono fatti di biomolecole e la salute può essere considerata l'espressione dell'omeostasi, cioè della capacità dell'organismo di regolare il suo ambiente interno per riuscire a mantenere una stabile e costante condizione di "normalità". La vera essenza della vita è quindi identificabile in un fenomeno in cui, attraverso un equilibrio dinamico e multipli meccanismi di regolazione, è possibile garantire l'omeostasi. La maggior parte delle malattie sono il risultato del turbamento di tale stato, venendosi a caratterizzare attraverso una condizione, che possiamo chiamare di disequilibrio omeostatico, in cui un sistema molecolare perde il suo bilanciamento dinamico. Uno degli approcci più efficaci per diagnosticare e trattare le malattie deriva dalla capacità di seguire la cinetica delle biomolecole nello stato normale (fisiologia) e nella malattia (fisiopatologia). Questo potenziale può diventare realtà quando esiste la possibilità di tracciare questi percorsi, cioè quando sono disponibili traccianti specifici delle biomolecole che si vogliono studiare. I traccianti sono molecole o cellule che hanno lo stesso comportamento di quelle native, con la possibilità di essere rivelate dall'esterno. Questo avviene "etichettandole" con un *marker* che per la medicina nucleare è la radioattività, per la tomografia computerizzata (TC) è la variazione di densità, per la risonanza magnetica (RM) è la modifica delle caratteristiche magnetiche. Nel momento in cui diventa possibile rivelare la cinetica dei traccianti con sistemi esterni, questo approccio realizza un potentissimo strumento diagnostico, che è chiamato *imaging molecolare*.

Se vogliamo un'immagine funzionale di un sistema, cioè di un ambiente in cui le molecole sono collegate attraverso un'interazione biodinamica, non dobbiamo influenzare il sistema stesso. In altre parole, un processo molecolare può essere studiato solo utilizzando un numero di molecole traccianti significativamente più basso rispetto al numero totale delle molecole native coinvolte nel sistema stesso. Solo in questo modo possiamo evitare interferenze e/o effetti indesiderati sulla cinetica che dobbiamo analizzare. Partendo da questa premessa, la possibilità di ottenere un vero e rigoroso imaging molecolare è consentita oggi, nella grande maggioranza dei sistemi (e/o delle malattie), solo dalla medicina nucleare, che usa traccianti marcati con una microquantità di radioattività, e dall'imaging ottico, basato sui meccanismi della fluorescenza. Infatti, solo questi due approcci sono in grado di produrre immagini con quote "fisiologiche" (pico/nano molari), di tracciante; al contrario, la TC e la RM per eseguire questi processi hanno bisogno di quantità micro/milli molari di mezzo di contrasto, troppo elevate per consentire una valutazione funzionale rigorosa e priva di effetti collaterali.

Nonostante il suo ruolo nella ricerca di base, l'imaging ottico non è ancora pronto per un uso clinico, a causa della sua incapacità di analizzare le strutture profonde; può essere quindi utile, ad esempio, per studiare la cute, ma non il fegato. Pertanto, l'imaging molecolare negli esseri umani può essere quasi identificato con la medicina nucleare, che è nata e può esistere solo come tale. A dimostrazione di ciò, già dagli anni '40, il primo radio tracciante utilizzato clinicamente nell'uomo, lo iodio-131, si è dimostrato potente strumento diagnostico (e terapeutico) in pazienti con malattie della tiroide, proprio grazie al suo meccanismo di concentrazione. Potremmo oggi chiamare imaging molecolare della tiroide la vecchia scintigrafia tiroidea, perché attraverso la scintigrafia con

radioiodio è possibile dimostrare l'espressione in vivo del gene del trasportatore dello iodio sia nelle cellule normali, sia in quelle neoplastiche differenziate. Pertanto, la medicina nucleare è ed è sempre stata imaging molecolare e se questo termine suona nuovo, nato nel terzo millennio, è perché solo oggi, nell'era della genomica, la genetica e le biomolecole sono state messe al centro dell'universo della diagnostica e della terapia applicata alla clinica, non rimanendo confinati nel campo della ricerca. Un nuovo impulso alla diffusione di questo termine è stato dato all'evoluzione tecnologica delle apparecchiature; oggi è possibile studiare i fenomeni biologici con una risoluzione spaziale e temporale estremamente elevata, che consente di individuare e caratterizzare lesioni che arrivano, nell'imaging sull'animale da esperimento con macchine dedicate, a valori sub-millimetrici; si creano così i presupposti, fino a pochi anni fa impensabili, dello studio diretto del DNA in vivo nell'uomo.

La medicina nucleare diagnostica è un universo di diverse metodiche.

Tutte le molecole e le cellule possono essere radiomarcate per diventare traccianti utili a individuare e a meglio comprendere tutte le malattie. Così se si vogliono studiare gli angiomi si usano globuli rossi marcati, le infezioni sono studiate con i leucociti, le malattie della tiroide con il radioiodio o i suoi analoghi biologici. Oggi lo strumento migliore per l'imaging molecolare nell'uomo è la tomografia ad emissione di positroni (PET)-TC, che unisce all'informazione morfologica della TC un ampio spettro di risposte funzionali ottenute con lo scanner PET. Il più importante radio tracciante è quello del glucosio (F-18-fluorodeossiglucosio, FDG), che ha rivoluzionato la diagnostica oncologica, perché nei tumori maligni aumenta la glicolisi anaerobica. È importante sottolineare che tutta la medicina nucleare, anche nei suoi esami più antichi, dalla scintigrafie planari, fornisce informazioni funzionali, in grado di studiare la malattia attraverso la messa in evidenza delle alterazioni fisiopatologiche. Nascono così i presupposti per un'analisi delle patologie che può permettere una diagnosi precoce rispetto a quella acquisibile con una valutazione basata su metodiche strutturali. Sono anche meglio ottenibili informazioni legate alla valutazione prognostica e ai rapporti con la terapia, creando i presupposti per una valutazione tagliata su misura del singolo paziente. Tutto questo avviene alla presenza di un rapporto costo/beneficio molte volte favorevole e/o competitivo rispetto alle altre metodiche protagoniste dello scenario della diagnostica per immagini. Il favorevole rapporto, che determina i presupposti di un'ampia applicazione alla presenza di indicazioni cliniche giustificate, è ottenuto grazie anche al fatto che il costo e i rischi legate alle metodiche medico nucleari sono molto minori di quelle che si percepiscono come luogo comune, in conseguenza dei pregiudizi irrazionali nati dal collegamento con Hiroshima e Chernobyl. È determinante che ogni medico abbia la consapevolezza che il rapporto che esiste tra diagnostica radio isotopica e bomba atomica è lo stesso che esiste tra un farmaco e un veleno. I rischi sono minimi e stocastici, cioè non determinano necessariamente danno, ma possono rendersi concreti o no secondo eventi probabilistici. Si tratta di rischi comparabili a quelli presenti nella vita quotidiana, che non devono quindi assolutamente precludere l'utilizzazione di una metodica medico nucleare, alla presenza di un'indicazione clinica giustificata. In termini di rischi comparati è da ricordare come le metodiche radio isotopiche non abbiano controindicazioni assolute, come avviene diversamente per i mezzi di contrasto o per la RM. Inoltre, deve essere consapevolezza chiara a tutti il fatto che i rischi maggiori nella diagnostica per immagini sono quelli legati agli errori nella diagnosi o nella definizione di una corretta strategia terapeutica. In questo senso, ad esempio, se è vero che l'ecografia non impiega radiazioni ionizzanti, nel confronto tra ecografia e scintigrafia miocardica è quest'ultima che può determinare in un bilancio complessivo meno danni, per la maggior accuratezza diagnostica e prognostica nei pazienti con cardiopatia ischemica.

Al determinante ruolo nella diagnostica per immagini la medicina nucleare aggiunge uno spazio di applicazione sempre più ampio nel campo della terapia. A differenza della diagnostica, che utilizza dosi minime di radiazioni, la terapia medico nucleare è basata sulla somministrazione di alte dosi di radio tracciante marcato con radionuclidi caratterizzati dalla emissioni di radiazioni ad alto potere lesivo locale. L'enorme interesse verso la terapia medico nucleare è legata anche in questo caso ai meccanismi di concentrazione molecolare dei radio traccianti e al cosiddetto effetto cross-fire (fuoco incrociato). L'importanza del primo presupposto si comprende perché nel momento in cui si ha disponibilità di molecole traccianti a tropismo elettivo e/o prevalente verso il tessuto patologico si creano i presupposti per un'azione molto tossica sul bersaglio, alla presenza di ridotti effetti collaterali. L'esempio per radioiodio ad alte dosi nei pazienti con metastasi da carcinoma tiroideo differenziato è la chiara dimostrazione della potenza di questo approccio, che ha permesso la completa guarigione di pazienti affetti da malattia metastatica. Il motivo è legato alla capacità di distruggere tutte le lesioni captanti il radioiodio, anche se multiple e disseminate in tutto l'organismo. Questo pagando un basso costo in termini di effetti collaterali.

Il principio del *cross-fire* spiega invece la capacità di distruggere all'interno un tumore che concentra il radiocomposto, ma non esprime il bersaglio su tutte le cellule, la possibilità di distruggere tutte le cellule neoplastiche attraverso l'effetto citotossico sulle cellule senza target da parte delle radiazioni emesse da radio tracciante che si è concentrato in cellule neoplastiche adiacenti. Questo è un vantaggio peculiare della terapia medico nucleare nei confronti di quella con citostatici, che è in grado invece di distruggere esclusivamente le cellule che esprimono lo specifico bersaglio. La potenza della medicina nucleare trova poi un'altra consacrazione nella possibilità di predire l'efficacia di un'azione terapeutica prima di iniziarla. Questo avviene facendo procedere la somministrazione terapeutica dall'utilizzazione di una piccolissima dose di radio tracciante, marcata con radionuclidi a bassissimo potere lesivo locale e con una quantità di radioattività che non causa danno deterministico. Dopo questa valutazione faranno la terapia solo i pazienti nei quali il "tracciante diagnostico" ha dimostrato un'efficace distribuzione dell'agente terapeutico. Saranno quindi sottoposti a terapia solo quei pazienti in cui questa potrà risultare efficace evitandola a quelli, che non concentravano il tracciante a dosi diagnostiche e nei quali la tossicità dell'agente terapeutico non si sarebbe accompagnata alla capacità di curare la malattia.

Mille e altre cose si potrebbero dire per evidenziare i vantaggi e le peculiarità della medicina nucleare. Lascio una più ampia spiegazione ai capitoli successivi, dove le più importanti tecniche e metodiche sono corroborate da un lavoro di ricerca di base, necessario per lo sviluppo, il radicamento e l'affermazione di questa importante tecnica diagnostica e terapeutica. La speranza è che si tragga la consapevolezza dell'importanza di comprendere bene come la medicina nucleare, l'imaging e la terapia molecolare, possano diventare strumenti importanti nella definizione delle scelte diagnostiche e terapeutiche.

Sezione A

Sintesi e valutazione biologica di una serie di
nuovi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -eterocomplessi e loro confronto
con $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

A1 Obiettivo

La cardiologia nucleare, una delle sottospecialità in più rapida crescita nel campo delle malattie cardiovascolari, ha subito negli ultimi 30 anni una evoluzione da strumento di ricerca a ben definita disciplina clinica. Negli Stati Uniti vengono praticati ogni anno circa 5 milioni di esami, che rappresentano quasi un terzo di tutte le indagini di medicina nucleare eseguite. È un settore che ha raggiunto l'eccellenza nella valutazione e nella quantificazione non-invasiva di perfusione, funzione e metabolismo miocardici. A differenza degli approcci orientati alla anatomia, la potenza delle tecniche nucleari si basa su proprietà fisiologiche, biochimiche e molecolari. La capacità di definire con un solo esame perfusione e vitalità miocardiche e funzione ventricolare ne ha fatto un potente strumento diagnostico e prognostico. Per il suo importante contributo alla gestione e alla cura del paziente cardiopatico, la cardiologia nucleare è ora riconosciuta quale entità clinica distinta.

La cardiologia nucleare è stata definita disciplina per la prima volta all'inizio degli anni '70.

Un importante progresso nel settore fu compiuto con lo sviluppo di traccianti radioattivi di perfusione miocardica come il ^{201}Tl , che ha reso possibile l'identificazione non invasiva e la caratterizzazione fisiologica delle lesioni anatomiche coronariche. Lo sviluppo dell'angiografia di primo passaggio e all'equilibrio con radionuclidi ha permesso di valutare in maniera non-invasiva la funzione globale e regionale del ventricolo sinistro. Il campo è ulteriormente fiorito quando i concetti di fisiologia dell'esercizio fisico, mismatch domanda/offerta, riserva vasodilatatrice coronarica, e disfunzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro sono divenuti una realtà clinica. Farmaci vasodilatatori quali adenosina e dipiridamolo hanno esteso l'applicazione degli studi di perfusione miocardica a pazienti che non erano in grado di svolgere l'esercizio fisico, avevano sindromi coronariche acute non complicate o dovevano essere sottoposti a procedure di chirurgia non-cardiaca comportanti un rischio da intermedio ad alto. Successivamente, il campo è progredito dalla identificazione delle coronaropatie alla stratificazione del rischio e alla prognosi. Ora che ci si affida pressoché totalmente a cardiologi clinici per l'accurata selezione dei pazienti da trattare con la terapia medica o con quella interventistica, nonché al monitoraggio dell'efficacia di quella terapia, le procedure della cardiologia nucleare sono divenute il fondamento del processo decisionale. Progressi paralleli sia nei radiofarmaci che nella strumentazione hanno ulteriormente favorito la crescita della cardiologia nucleare. L'introduzione, negli anni '90, di traccianti di perfusione marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ha migliorato i conteggi e la qualità delle immagini degli studi di perfusione miocardica, che hanno consentito l'acquisizione ECG-gated e la simultanea valutazione della perfusione e della funzione miocardica regionale con un unico tracciante radioattivo. Poiché dopo l'iniezione presentano una redistribuzione nel tempo minima, alcuni traccianti di perfusione marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sono stati impiegati nel dipartimento di emergenza e nelle prime ore di un infarto, per stimare l'entità del miocardio a rischio. Uno studio di follow-up, eseguito dopo alcuni giorni, fornisce informazioni sulle dimensioni finali dell'infarto e sul salvataggio del miocardio. L'introduzione della PET ha allargato l'ambito dell'esame cardiaco dalle sole perfusione e funzione alla valutazione della utilizzazione dei substrati metabolici, alla occupazione dei recettori cardiaci, e alla funzione nervosa adrenergica. La capacità di dare l'immagine del passaggio dagli acidi grassi al glucosio, quale principale fonte miocardica di produzione di energia in situazioni di flusso ridotto, ha contribuito a spiegare la fisiopatologia della ibernazione. L'impatto terapeutico della PET ha esteso l'utilità delle procedure di cardiologia nucleare fino a includere pazienti con disfunzione

ventricolare sinistra ischemica cronica e insufficienza cardiaca per la valutazione della vitalità miocardica.

In questa Sezione l'attività è rivolta allo studio struttura-attività di complessi monocationici dissimetrici del tipo $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTC-L}_n)(\text{PNP}_x)]^+$, ove DTC-L_n è un generico ditiocarbammato derivato da ammine secondarie alicicliche e PNP_x 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 A1.1, con formula generale $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$ 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).

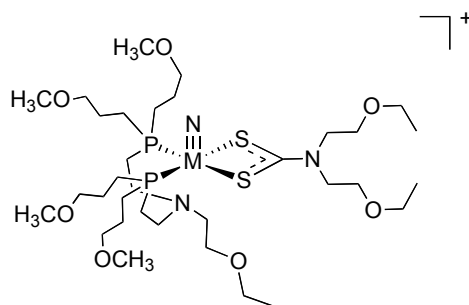


Figura A1.1. Complesso $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DBODC})]^+$ e $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ 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, $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ presenta 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 $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{NOET}$ (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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, incrementando l'estrazione di primo passaggio e mantenendo inalterate le favorevoli 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$.

Sono quindi stati sintetizzati complessi del tipo $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$, dove il legante ditiocarbammico DBODC è sostituito da ditiocarbammati ottenuti da ammine secondarie alicicliche. I complessi, di struttura generica riportata in Figura A1.2, sono stati oggetto di valutazione biologica al fine di chiarirne l'eventuale migliore natura rispetto a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$.

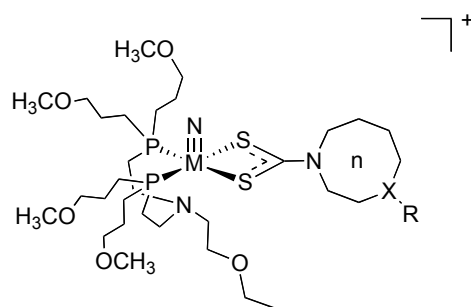


Figura A1.2. Struttura generica dei complessi $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ oggetto di studio nella presente sezione: il legante ditiocarbammico è derivato da un'ammina secondaria aliciclica.

I leganti amminodifosfinici utilizzati in questo studio, sono rappresentati in Figura A1.3.

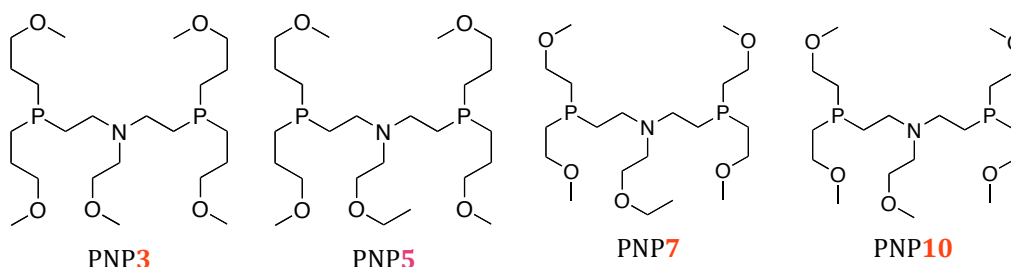


Figura A1.3. Leganti amminodifosfinici PNP_x utilizzati nel presente lavoro.

A.2 Introduzione

A2.1	Medicina Nucleare	11
A2.2	Radiofarmaci: definizione e classificazione	11
A2.3	Preparazione dei radiofarmaci di ^{99m}Tc più comunemente utilizzati	26
A2.4	Il core $[\text{Me}^{(v)}(\text{N})]^{2+}_{int.}$ (Me: Tc, Re), il ruolo dei leganti PNP	33
A2.5	Cardiologia Nucleare	43
A2.6	$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$	49

A2.1 Medicina Nucleare

La Medicina Nucleare (MN) è una disciplina medica che permette di ottenere immagini del corpo umano rappresentative di processi biochimici e fisiologici. Si basa sulla somministrazione di un tracciante radioattivo al paziente, la rivelazione delle radiazioni emesse e la formazione di immagini (scintigrafie), che rappresentano la distribuzione del tracciante radioattivo utilizzato nel distretto anatomico in esame. Dipendentemente dal tracciante utilizzato, si possono ottenere immagini rappresentative di funzioni diverse (es. immagini di perfusione, metabolismo). I traccianti radioattivi sono marcati con isotopi radioattivi emittenti radiazioni gamma, il più usato è il ^{99m}Tc . La rivelazione delle radiazioni e la formazione delle immagini avviene mediante un'apparecchiatura dedicata, la gamma camera.

A2.2 Radiofarmaci: definizione e classificazione

Per *radiofarmaco* si intende “qualsiasi medicinale che, quando è pronto all'uso, include uno o più radionuclidi incorporati a scopo sanitario” (DL n. 178, 29/05/1991). Poiché lo stesso decreto definisce *medicinale* “ogni sostanza o composizione presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane o animali, nonché ogni sostanza o composizione da somministrare all'uomo o all'animale allo scopo di stabilire una diagnosi medica o di ripristinare, correggere o modificare funzioni organiche dell'uomo o dell'animale”, ne consegue che una qualunque sostanza o composizione contenente uno o più radioisotopi, ed utilizzata in medicina per la somministrazione sull'uomo o animale, è considerata un radiofarmaco.

In base al loro utilizzo clinico, i radiofarmaci possono essere classificati nelle due seguenti categorie:

1. *radiofarmaci per la diagnostica,*
2. *radiofarmaci per la terapia.*

La prima categoria di radiofarmaci si riferisce all'uso di sostanze contenenti radionuclidi che emettono principalmente radiazioni γ (gamma). Queste radiazioni sono costituite da *fotoni* (particelle di luce), di energia assai elevata che sono in grado di attraversare i tessuti dell'organismo senza essere assorbiti in modo significativo poiché hanno poche probabilità di interagire con la materia. Quando il radiofarmaco è introdotto nell'organismo utilizzando una via adeguata di somministrazione (nella maggior parte dei casi, per mezzo di una iniezione endovenosa), i raggi γ emessi fuoriescono e sono rilevati da appositi strumenti di rilevazione (gamma camera), generando, in questo modo, una serie di segnali. La successiva elaborazione dei segnali raccolti, eseguita per

mezzo di algoritmi matematici, permette di ottenere un'immagine che rappresenta la distribuzione spazio-temporale della sostanza radiomarcata all'interno dell'organismo.

Nella seconda categoria di radiofarmaci sono comprese quelle sostanze che contengono radionuclidi emettitori di particelle dotate di massa come radiazioni β^- (elettroni) o α (nuclei di ^4He composti da due protoni e due neutroni). Questi tipi di radiazione interagiscono fortemente con la materia e sono, quindi, rallentati e facilmente assorbiti dal mezzo in cui si trovano rilasciando completamente l'energia posseduta. Ne deriva, di conseguenza, che questi radiofarmaci possono svolgere un'azione terapeutica se, una volta introdotti nell'organismo, si depositano in modo selettivo all'interno delle cellule di un tessuto in cui si è instaurato un processo patologico (ad esempio, un tessuto neoplastico). L'accumulo del radiofarmaco permette alla radiazione emessa di trasferire la quasi totalità della sua energia al tessuto malato provocandone la distruzione.

Poiché il nuclide radioattivo costituisce l'ingrediente essenziale per determinare il modo d'azione (diagnostico o terapeutico), di un radiofarmaco, appare evidente come sia sempre necessario preparare i radiofarmaci prima dell'uso e somministrarli entro un tempo sufficientemente breve da evitare l'attenuazione eccessiva, nonché la scomparsa dell'emissione radioattiva.

Meccanismi d'azione dei radiofarmaci

Sebbene dal punto di vista legislativo i radiofarmaci siano classificati in modo analogo ai farmaci convenzionali, esistono differenze fondamentali tra queste due categorie di sostanze. In primo luogo, occorre sottolineare che, in un radiofarmaco, l'agente effettivo che produce il risultato finale non è la forma chimica da cui esso è costituito, bensì l'emissione radioattiva proveniente dal radionuclide incorporato. Infatti, è solo attraverso il rilevamento e l'analisi della radioattività γ emessa che è possibile ottenere un'immagine diagnostica dei tessuti interni di un organismo. Similmente, l'effetto distruttivo indotto sulle cellule di un tessuto malato è prodotto dalla sua interazione con le particelle massicce ad alta energia generate dal decadimento del radionuclide e non dalla forma chimica del radiofarmaco in cui esso è contenuto. Appare, dunque, evidente che il ruolo della specie chimica in cui si trova legato il radionuclide è solamente quello di fungere da trasportatore della radioattività sul tessuto bersaglio. Proprio per ottenere questo scopo, è opportuno che, nel tragitto che separa il punto di iniezione dal sito bersaglio, il radiofarmaco non interagisca significativamente con altri tessuti, mantenendo un'affinità selettiva solo per le cellule del tessuto in cui deve depositarsi. In altre parole, a differenza di un farmaco convenzionale, l'effetto farmacologico di un radiofarmaco deve essere pressoché inesistente o, comunque, trascurabile. L'esistenza di un'azione farmacologica sui tessuti provocherebbe, infatti, la loro alterazione pregiudicando il riconoscimento del sito bersaglio da parte del radiofarmaco.

Il generale, la strategia più efficiente, che è comunemente utilizzata per sviluppare un radiofarmaco con un'affinità selettiva per un tessuto di interesse, si basa sulla possibilità di produrre un'opportuna specie chimica radiomarcata capace di interagire con qualche processo biofisico o biomolecolare che avviene nel sito bersaglio. Sono stati sfruttati numerosi processi biologici per guidare il radiofarmaco verso un bersaglio selezionato e le metodologie che sono state impiegate per progettare la sua struttura chimica sono essenzialmente due:

1. il *metodo integrato*,
2. il *metodo bifunzionale*.

Il *metodo integrato* consiste nel produrre una specie contenente il radionuclide le cui caratteristiche chimico-fisiche e strutturali intrinseche gli permettono di essere riconosciuta come substrato adeguato da parte di un particolare processo biologico. Poiché, generalmente, risulta assai difficile conoscere *a priori* quali sono le caratteristiche essenziali necessarie ad impartire specifiche proprietà biologiche ad una particolare specie chimica, alcune importanti classi di radiofarmaci sono state scoperte *a posteriori*, cioè solo dopo aver studiato sperimentalmente le loro proprietà biologiche nei sistemi viventi.

Il *metodo bifunzionale* richiede, invece, la selezione preliminare di un composto di cui sono note in anticipo le proprietà di affinità nei confronti di uno specifico tessuto. Tale specie può essere una macromolecola di origine biologica come una proteina, oppure una piccola molecola di origine sintetica come un peptide od un farmaco. Il radiofarmaco finale si ottiene legando il radionuclide alla specie biologicamente attiva in modo tale da non alterarne le proprietà biologiche originarie. Le procedure chimiche che si impiegano per questo scopo dipendono, ovviamente, dal tipo di radionuclide utilizzato.

Alcuni dei più importanti meccanismi che caratterizzano il comportamento biologico dei radiofarmaci sono elencati di seguito.

- *Processi di diffusione e sequestro di nanoparticelle.*

Nanoparticelle costituite da macroaggregati di albumina o da colloidali hanno un diametro che varia da alcune decine a centinaia di nanometri. Queste specie possono restare intrappolate in capillari con un diametro inferiore a quello delle particelle stesse oppure diffondere nel sistema linfatico ed essere sequestrate dai macrofagi. Meccanismi di questo genere sono stati, quindi, sfruttati per inviare particelle radiomarcate in tessuti ricchi di capillari o per visualizzare la rete linfonodale.

- *Comportamenti mimetici.*

La possibilità di produrre composti radiomarcati che, in base alle loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche e strutturali sono 'riconosciuti' dall'organismo come analoghi di specie biologicamente attive sia di origine endogena sia esogena (*metodo integrato*), costituisce sicuramente una delle strategie più eleganti ed efficienti per l'indagine *in vivo* dei processi biomolecolari che avvengono all'interno di un tessuto, come illustrato dagli esempi che seguono.

Alcuni radionuclidi somministrati sotto forma ionica mostrano un comportamento mimetico di ioni presenti nei sistemi biologici. Ad esempio, la scoperta che l'anione *pertecnato* è selettivamente captato dalle cellule della tiroide ha condotto ad usarlo fin dall'inizio come agente diagnostico per questo particolare organo. Il meccanismo biologico responsabile di questo comportamento è stato, in seguito, interpretato attribuendo all'anione [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ la capacità di 'simulare' le proprietà chimico-fisiche dello ione ioduro, I $^-$. Infatti, l'anione *pertecnato* possiede la stessa carica negativa di I $^-$, ed ha dimensioni simili. Per questo, esso è riconosciuto dalla stessa proteina che trasporta lo ione ioduro (*simporto Na/I*), ed accumulato nel tessuto tiroideo con un'efficienza addirittura superiore ad I $^-$.

In modo simile, gli ioni monopositivi Tl $^+$ e Rb $^+$ sono riconosciuti dalla pompa Na $^+$ /K $^+$ -ATPase come analoghi dello ione K $^+$ e, per questo, sono captati dalle cellule del miocardio (*miociti*). Somministrati come radioisotopi tallio-201 (^{201}Tl) e rubidio-82 (^{82}Rb), questi ioni sono divenuti importanti agenti per la diagnostica del cuore.

Un comportamento biologico simile a quello dello ione Ca^{2+} è mostrato dallo ione bivalente Sr^{2+} . Di conseguenza, esso entra a far parte dei processi che avvengono nella matrice ossea in fase di formazione e rinnovamento. Come radioisotopo stronzio-89 (^{89}Sr), lo ione Sr^{2+} è utilizzato nella terapia delle metastasi ossee.

Un classico esempio di proprietà mimetiche di molecole di origine biologica è fornito dal composto *metaiodobenzilguanidina* (MIBG), che mostra un comportamento analogo a quello della noradrenalina e, quindi, si accumula nei tessuti ricchi di terminazioni adrenergiche.

Sono stati osservati comportamenti mimetici anche di composti di uso farmaceutico. Ad esempio, è noto che i difosfonati, costituiti da gruppi fosfato ($-\text{PO}_3\text{H}_2$), uniti da ponti di eteroatomi, possiedono un'affinità elevata per gli ioni Ca^{2+} ed intervengono nel metabolismo del tessuto osseo. Quando questi composti si combinano con un radiometallo, come $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{153}Sm , essi conservano la loro capacità di legarsi allo ione Ca^{2+} ed, in questo modo, possono essere utilizzati per trasportare la radioattività nello stesso tipo di tessuto. I composti del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con difosfonati, infatti, costituiscono ancor'oggi un'importante classe di agenti diagnostici del sistema scheletrico e, recentemente, un composto del ^{153}Sm con il derivato etilendiamminotetraetilfosfonato (EDTMD) è stato introdotto in terapia quale efficace agente per il trattamento delle metastasi ossee.

- *Interazioni con gradienti elettrostatici di membrana.*

È stato scoperto che certi composti del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ recanti una singola carica positiva (*complessi monocationici*), sono in grado di penetrare le cellule del miocardio per diffusione passiva e, successivamente, di essere catturati dal potenziale negativo presente sulla membrana mitocondriale. Questa proprietà ha permesso di sviluppare una nuova classe di agenti di *perfusione cardiaca*. La quantità di questi traccianti che si accumula nel miocardio risulta proporzionale al flusso ematico che lo attraversa e consente, quindi, di valutare la *funzionalità* del cuore.

- *Interazione con proteine.*

Alcuni composti del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ privi di carica elettrica (*neutri*) hanno mostrato un'elevata captazione cardiaca seguita da un'eliminazione dal cuore che può richiedere alcuni minuti o delle ore. Il comportamento biologico di queste specie è stato spiegato ammettendo che esse possano interagire con proteine di membrana poste sulla superficie delle cellule del tessuto cardiaco. Questa interazione non appare essere specifica, ma determinata dalla struttura molecolare e dal grado di *lipofilità* (solubilità nei solventi apolari) di questi composti.

La capacità dei composti monocationici del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ di localizzarsi sulle superficie della membrana mitocondriale è stata anche sfruttata in campo oncologico per la diagnosi di quelle neoplasie in cui l'attività mitocondriale risulta particolarmente importante. Tuttavia, l'applicazione diagnostica più importante è stata ottenuta quando si è scoperto che questi composti potevano essere riconosciuti come substrati dalle proteine responsabili della resistenza al trattamento chemioterapico. Infatti, il mancato accumulo della specie monocationica indica che l'agente diagnostico è stato trasportato all'esterno del tessuto neoplastico da parte della proteina espressa dalle cellule divenute resistenti (*proteine PgP*). Viceversa, l'accumulo del tracciante nel tessuto neoplastico è una chiara indicazione che le cellule sono ancora sensibili al trattamento chemioterapico.

- *Processi metabolici e di trasporto.*

La possibilità di alcuni composti radiomarcanti di essere riconosciuti da proteine di trasporto che, normalmente, hanno il compito di far passare attraverso la membrana cellulare specifici substrati biologici come glucosio o amminoacidi, ha permesso di sviluppare categorie molto importanti di radiofarmaci. In modo analogo, sono stati sviluppati radiofarmaci che si comportano come substrati attivi per particolari enzimi e, per questo, subiscono reazioni di metabolizzazione una volta giunti all'interno del tessuto bersaglio. Nei casi più interessanti, il radiofarmaco è prima riconosciuto da una proteina trasportatrice e, dopo aver raggiunto l'interno della cellula, è coinvolto in un processo metabolico che ne modifica la struttura chimica ed, in questo modo, impedisce alla radioattività di uscire dal tessuto. In altri casi, la penetrazione cellulare avviene per semplice diffusione passiva favorita dal carattere *lipofilo* del tracciante e dal gradiente di concentrazione. Questo processo, tuttavia, deve essere subito seguito dalla trasformazione metabolica necessaria a bloccare il radiocomposto nel tessuto bersaglio. Quest'ultimo meccanismo è stato utilizzato per lo sviluppo di alcune classi di agenti di *perfusione cerebrale* e per lo studio del *metabolismo degli acidi grassi* e dei *fenomeni ipossici* del tessuto cardiaco.

- *Interazioni recettoriali.*

L'interazione di radiocomposti con specifici recettori situati sulla membrana delle cellule del tessuto bersaglio è un meccanismo che è stato ampiamente sfruttato per lo sviluppo di nuovi traccianti. In particolare, lo studio dei recettori del sistema nervoso centrale è stato condotto con l'impiego di radiofarmaci ottenuti marcando piccole molecole di origine biologica (neurotrasmettitori), farmaceutica (farmaci ipnotici) o sintetica con radionuclidi emettitori di positroni. In generale, questi composti hanno dimensioni molecolari assai ridotte e sono, quindi, in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e di interagire con il recettore di interesse. L'affinità di certe sequenze peptidiche per alcuni recettori espressi nei tessuti neoplastici è stata, invece, utilizzata per sviluppare un'ampia classe di agenti diagnostici in campo oncologico marcati con differenti radionuclidi.

- *Marcature cellulari.*

Sfruttando la capacità di alcuni radiocomposti lipofili di penetrare la membrana cellulare per diffusione passiva, è possibile trasferire la radioattività all'interno di alcuni componenti cellulari del sangue come linfociti e globuli rossi. Una volta superata la membrana cellulare, il radiocomposto subisce una parziale modificazione chimica che ne impedisce la diffusione all'esterno, rimanendo così stabilmente intrappolato all'interno della cellula. In questo modo, è possibile utilizzare le cellule risultanti come agenti per la diagnostica di processi infiammatori (linfociti) o per misurare il volume ematico circolante (globuli rossi).

Radiofarmaci per la diagnostica

L'emissione di fotoni γ da parte dei radionuclidi impiegati nella diagnostica può avvenire attraverso due processi fisici distinti conosciuti come (a) *transizione nucleare* e (b) *annichilazione particella-antiparticella*.

Nel primo caso, la radiazione γ è generata dalla perdita di energia (diseccitazione) del nucleo atomico del nuclide radioattivo, che passa da uno stato ad energia superiore ad uno ad energia inferiore. Ad ogni transizione, è emesso dal nucleo un solo fotone, per cui si parla di emissione di

fotone singolo. Nel secondo caso, l'emissione γ è generata da un processo più complesso in cui il nuclide radioattivo decade inizialmente attraverso l'emissione di una particella β^+ che corrisponde ad un *elettrone positivo* o *positrone*. Un positrone costituisce l'antiparticella di un elettrone e, pur possedendone la stessa massa, mostra i valori di tutte le altre proprietà fisiche (ad esempio, la carica elettrica), esattamente al contrario. Una legge fisica fondamentale stabilisce che, quando una particella incontra la sua corrispondente antiparticella, la loro massa è completamente convertita in energia (*processo di annichilazione*), provocando l'emissione di due raggi γ che si muovono su traiettorie esattamente opposte l'una all'altra. L'energia di ciascun fotone γ è pari a 511 keV, che corrisponde esattamente alla massa di ognuna delle particelle scomparse. Nel caso di un radiofarmaco, poiché l'emissione di un positrone avviene all'interno di un mezzo ricco di elettroni, dopo un breve cammino, la particella β^+ emessa subirà un repentino processo di annichilazione, dovuto all'interazione con un elettrone circostante, da cui avranno origine i due fotoni γ con un'energia di 511 keV.

I due differenti modi di produzione di raggi γ descritti sopra hanno permesso di sviluppare due tecniche distinte di ricostruzione spaziale delle immagini diagnostiche ottenute attraverso la somministrazione di un radiofarmaco. Queste tecniche di ricostruzione permettono di ottenere immagini in tre dimensioni (*tomografia*) del tessuto in cui il radiofarmaco si localizza e prendono rispettivamente il nome di *tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo* (in inglese, *single photon emission computed tomography*, abbreviato *SPECT*) e *tomografia ad emissione di positroni* (in inglese, *positron emission tomography*, abbreviato *PET*). I radiofarmaci per la diagnostica sono, quindi, suddivisi ulteriormente nelle due categorie composte dai *radiofarmaci SPECT* e dai *radiofarmaci PET*.

Radionuclidi per la diagnostica SPECT

Esistono numerosi radionuclidi che sono attualmente impiegati nella diagnostica SPECT. In Tabella A2.1 sono elencati i radioisotopi più importanti assieme ai loro modi di produzione e decadimento, ad alle loro caratteristiche nucleari.

Radionuclide	Emissione	Energia (keV)	$t_{1/2}$ (ore)
^{99m}Tc	γ	142	6.06
^{123}I	γ	159	13.2
^{111}In	γ	172, 245	67.9
^{67}Ga	γ	91, 93, 185, 296, 388	78.26
^{201}Tl	γ, X	135, 167 (γ), 69-83 (X)	72

Tabella A2.1. Principali radionuclidi impiegati nella diagnostica SPECT

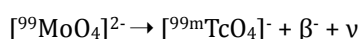
Per il loro impiego in diagnostica, un radionuclide deve possedere alcune caratteristiche fisiche essenziali. Nel caso ideale, esso dovrebbe emettere una radiazione γ monocromatica e di energia adatta a poter essere facilmente misurata dagli attuali misuratori rivelatori composti da cristalli di ioduro di sodio o di ossidi metallici. Inoltre, il tempo di emivita dovrebbe essere sufficientemente

lungo da permettere la preparazione del radiofarmaco e l'esecuzione dell'indagine diagnostica, ma abbastanza breve da rendere minimo il rischio radiologico per il paziente.

Un'altra caratteristica importante di cui occorre tenere conto nella scelta di un radionuclide da impiegare nella diagnostica SPECT riguarda il suo modo di produzione. Infatti, il tipo di processo nucleare utilizzato determina la facilità più o meno elevata di approvvigionamento del radionuclide e la possibilità di ottenerlo con un'elevata purezza radionuclidica ed alta attività specifica. I radioisotopi SPECT possono essere artificialmente prodotti (a) in un *reattore nucleare* come sottoprodotti della reazione di fissione dell'uranio-235 (^{235}U), (b) in una *reattore nucleare* attraverso reazione di cattura neutronica, (c) in un *acceleratore di particelle* mediante il bombardamento di un bersaglio opportuno con particelle cariche e (d) in un *generatore trasportabile* sfruttando la trasformazione di un radionuclide precursore (*madre*), che decade spontaneamente in un radionuclide finale (*figlio*) di interesse per la diagnostica SPECT.

È evidente che i primi tre modi di produzione possono essere realizzati solo all'interno di apposite installazioni e, quindi, il radionuclide può essere fornito solo su richiesta in una forma adatta alla somministrazione immediata nel paziente, oppure per la successiva manipolazione chimica necessaria ad effettuare la preparazione del radiofarmaco finale. Al contrario, l'uso di generatori per la produzione di radionuclidi risulta particolarmente vantaggioso. Questi sistemi, infatti, permettono di prelevare quotidianamente la quantità di radioattività necessaria ad effettuare l'indagine diagnostica in un luogo pressoché adiacente a quello in cui si trova il paziente e per un periodo di tempo prolungato (dell'ordine delle settimane). In generale, il loro funzionamento si basa sull'identificazione di un conveniente radionuclide madre che, per successivo decadimento radioattivo, si trasforma nel radionuclide figlio impiegato nella diagnostica. Se il tempo di dimezzamento del radionuclide madre è assai più lungo di quello del radionuclide figlio, si raggiunge uno *stato di equilibrio transitorio* in cui la quantità prodotta del radionuclide figlio non dipende dal suo tempo di dimezzamento (più breve), bensì da quello del radionuclide madre (più lungo). Un altro requisito indispensabile che deve essere soddisfatto per assicurare il funzionamento di un generatore è che la forma chimica in cui si trova il radionuclide padre sia facilmente separabile da quella in cui si trova il radionuclide figlio. In generale, un generatore è costruito facendo adsorbire il radionuclide madre sopra una colonna cromatografica. In seguito alla trasformazione nucleare, la specie chimica contenente il radionuclide madre perde alcune caratteristiche chimico-fisiche che la rendevano stabilmente legata alla colonna permettendo così il recupero del radionuclide figlio mediante il passaggio attraverso il sistema di un'opportuna fase liquida (*eluente*), in cui la nuova specie chimica formatasi risulta più solubile.

Fra i radioisotopi utilizzati nella diagnostica SPECT, un ruolo fondamentale è stato svolto dal tecnezio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), poiché questo radionuclide mostra proprietà nucleari assai vicine a quelle ideali (Tabella A2.1). Un ulteriore vantaggio dell'impiego del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ deriva dalla sua larga disponibilità e relativamente basso costo dovuti al modo di produzione che utilizza il *generatore portatile di $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$* . In questo generatore, il radionuclide madre è adsorbito su di una colonna cromatografica di allumina come ione molibdato $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$. Il nuclide ^{99}Mo decade a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ per interazione debole attraverso l'emissione di di un elettrone negativo (β^-) ed un antineutrino secondo la reazione



Il tempo di emivita del nuclide ^{99}Mo è di 66 ore, quindi circa dieci volte più lungo di quello del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6.06 ore). In conseguenza del processo di decadimento, l'anione molibdato dinegativo $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$ è convertito nell'anione pertecnetato mononegativo $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$, che risulta, quindi, meno

trattenuto dal supporto solido di allumina a causa della scomparsa di una carica negativa. Facendo passare una soluzione fisiologica sterile e apirogena attraverso la colonna è possibile raccogliere l'anione pertecnato con un'elevatissima purezza radiochimica e pronto per essere utilizzato nella produzione di radiofarmaci del ^{99m}Tc .

I radioisotopi dello iodio ^{131}I e ^{123}I costituiscono un'altra classe molto importante di radionuclidi per la SPECT. Il primo è prodotto per mezzo di un reattore nucleare, mentre la produzione del secondo richiede l'uso di un acceleratore di particelle (ciclotrone). Sebbene la disponibilità più elevata dell'isotopo ^{131}I abbia inizialmente favorito il suo impiego, il successivo sviluppo della tecnologia dei ciclotroni ha consentito di disporre di una quantità sempre maggiore di ^{123}I . Questo fatto, unito alle favorevoli proprietà nucleari, ha gradualmente condotto alla sostituzione di ^{131}I con ^{123}I per la produzione dei corrispondenti radiofarmaci per la diagnostica SPECT.

Altri radionuclidi che occupano una posizione di rilievo nella diagnostica SPECT sono il tallio-201 (^{201}Tl), l'indio-111 (^{111}In) ed il gallio-67 (^{67}Ga). Questi radioisotopi sono prodotti per mezzo di acceleratori di particelle.

Radiofarmaci SPECT

Sebbene il numero di radiofarmaci SPECT studiati negli ultimi decenni sia particolarmente rilevante, nel seguito saranno brevemente trattate solamente quelle categorie di composti che hanno mostrato le proprietà biologiche più interessanti ed, in particolare, quei traccianti che sono comunemente impiegati nelle principali procedure diagnostiche.

Come già accennato in precedenza, i *radiofarmaci del ^{99m}Tc* costituiscono una delle classi più importanti di traccianti per la diagnostica SPECT. Questi composti sono preparati facendo reagire l'anione pertecnato [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻, prodotto dal generatore di $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, con reagenti opportuni che sono in grado di eliminare, in tutto o in parte, gli atomi di ossigeno che circondano l'atomo di tecnezio nel [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻ (*agenti riducenti*) e, quindi, di permettere il legame da parte di altre specie molecolari (*leganti*) che, per questo, daranno origine al radiofarmaco finale. Generalmente, i reagenti necessari sono forniti in forma liofilizzata all'interno di una fiala sterile a cui occorre semplicemente aggiungere l'anione [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻ per dare luogo alla formazione del radiofarmaco finale (*kit radiofarmaceutico*).

Un'altra categoria molto importante di radiofarmaci è quella dei composti marcati con radioisotopi dello iodio. Generalmente, l'atomo di iodio radioattivo è introdotto attraverso la reazione con opportuni gruppi chimici funzionali presenti nella specie chimica di cui è costituito il radiofarmaco (*sostituzioni nucleofile ed elettrofile*). Queste preparazioni sono comunemente eseguite in officine farmaceutiche autorizzate e da qui il radiofarmaco finale è distribuito presso i centri diagnostici per l'uso sul paziente.

Il radionuclide ^{67}Ga , disciolto in una soluzione di acido citrico, è impiegato nello studio dei processi infiammatori, mentre il radionuclide ^{111}In , legato ad un frammento peptidico che mostra un'elevata affinità per i recettori della somatostatina, è utilizzato nella diagnostica medica.

Il Tabella A2.2, è riportato un elenco di radiofarmaci che hanno trovato applicazione nella diagnostica SPECT e che sono, quindi, disponibili commercialmente, assieme a composti che, pur non essendo stati introdotti sul mercato, hanno mostrato caratteristiche biologiche peculiari e potenzialmente utili. Nella stessa Tabella A2.2 sono riportati la struttura chimica del radiofarmaco, il campo diagnostico di applicazione, il meccanismo di azione biologico e l'abbreviazione del nome chimico più comunemente utilizzata.

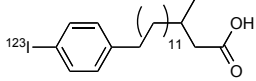
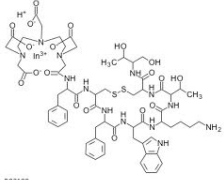
Radiofarmaco	Settore diagnostico	Meccanismo d'azione	Acronimo
	Cardiologia	β -Ossidazione	^{123}I -BMIPP
	Oncologia	Interazione con i recettori della somatostatina	^{111}In -Octreotide (Octreoscan TM)

Tabella A2.2. Principali radiofarmaci impiegati nella diagnostica SPECT.

Radionuclidi per la diagnostica PET

Le caratteristiche nucleari dei principali radionuclidi impiegati nella diagnostica PET con i loro metodi di produzione sono elencati nella Tabella A2.3. Tutti questi radioisotopi decadono per emissione di un positrone e mostrano tempi di emivita che variano da alcune ore fino a pochissimi minuti. La maggior parte dei radionuclidi PET è prodotto per mezzo di un *ciclotrone*, una macchina che può accelerare protoni, deuteroni o ioni idrogeno negativi e scagliarli contro un opportuno bersaglio. Solo pochissimi radionuclidi PET sono attualmente prodotti attraverso generatori trasportabili. Gli esempi più importanti sono il gallio-68 (^{68}Ga), che è utilizzato per la marcatura di biomolecole ed il rubidio-82 (^{82}Rb) che, sotto forma di ione Rb^+ , è impiegato nella diagnostica cardiologica.

Il radionuclide più utilizzato in diagnostica PET è il fluoro-18 (^{18}F) e ciò è conseguenza delle sue favorevoli proprietà nucleari. In particolare il tempo di emivita di 110 minuti permette la distribuzione dei radiofarmaci marcati con ^{18}F dal sito di produzione a centri diagnostici sufficientemente contigui.

Radionuclide	Decadimento	Energia (keV)	$t_{1/2}$ (minuti)
^{18}F	β^+	634	109.8
^{11}C	β^+	1982	20.4
^{13}N	β^+	2220	10.2
^{15}O	β^+	2754	2.07
^{68}Ga	β^+	770, 1880	68.3
^{82}Rb	β^+	3150	1.25

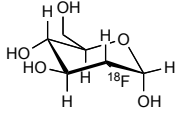
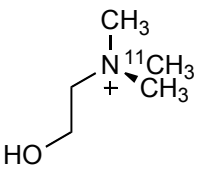
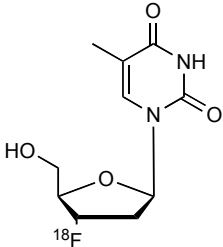
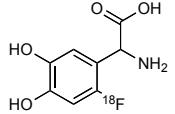
Tabella A2.3. Principali radionuclidi per la diagnostica PET.

Radiofarmaci PET

La quasi totalità dei radiofarmaci PET è stata sviluppata attraverso la marcatura di molecole di cui erano note in anticipo le proprietà biologiche. Ad esempio, il radiofarmaco PET di gran lunga più

importante è il [^{18}F]2-fluoro-deossi-glucosio (^{18}F -FDG), che ha trovato un impiego fondamentale soprattutto nella diagnostica oncologica. Questo tracciante è stato ottenuto a partire dal derivato 2-deossi-glucosio (DG) e sostituendo un gruppo ossidrilico in posizione 2 con un atomo di fluoro. Infatti, era noto che la specie DG è stessa proteina che trasporta il glucosio (GLUT1) e che, dopo essere penetrata in questo modo nella cellula, a differenza del glucosio, subisce una sola reazione di fosforilazione (trasferimento di un gruppo fosfato), da parte dell'enzima esochinasi, rimanendo così intrappolata dentro la cellula. La sostituzione di un gruppo OH^- con lo ione F^- , di dimensioni assai ridotte, non altera le caratteristiche biologiche della molecola originarie e, di conseguenza, il tracciante [^{18}F -FDG] mostra esattamente lo stesso comportamento biologico.

Sono stati composti centinaia di radiocomposti marcati con radionuclidi emettitori di positroni a partire da semplici molecole come acqua, ammoniaca, amminoacidi e piccole sostanze di origine farmaceutica, per giungere a macromolecole come proteine e frammenti di acidi nucleici (DNA, RNA). I recenti sviluppi hanno condotto alla messa a punto di sistemi di sintesi composti da un insieme di micropompe e piccoli reattori chimici (*moduli di sintesi*) che, a partire dalla forma chimica di un certo radionuclide, prodotto da un ciclotrone o da un generatore, permettono di ottenere i radiocomposti finali attraverso un processo chimico, che può essere a volte assai complesso, ma che è stato automatizzato e reso controllabile in modo remoto da un elaboratore elettronico. Un elenco dei radiofarmaci PET più importanti, comprendente anche le loro formule molecolari ed il meccanismo d'azione, è riportato in Tabella A2.4.

Radiofarmaco	Applicazione diagnostica	Meccanismo d'azione	Acronimo
	Oncologia, Neurologia, Cardiologia	Metabolismo glucidico	^{18}F -FDG
	Oncologia	Metabolismo dei fosfolipidi di membrana	^{11}C -Colina
$^{13}\text{NH}_3$	Cardiologia	Perfusione Cardiaca	^{13}N -Ammoniaca
	Oncologia	Sintesi acidi nucleici	^{18}F -FLT
	Neurologia, Oncologia	Trasmissione dopaminergica	^{18}F -FDOPA

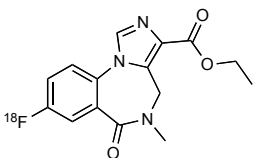
Radiofarmaco	Applicazione diagnostica	Meccanismo d'azione	Acronimo
	Neurologia	Interazione con i recettori delle benzodiazepine	¹¹ C-Flumazenil
¹⁵ OH ₂	Neurologia, Oncologia	Flusso sanguigno	¹⁵ O-Acqua
⁸² Rb ⁺	Cardiologia	Analogo dello ione K ⁺	Generatore di ⁸² Rb (CardioGen-82®)

Tabella A2.4. Principali radiofarmaci per la diagnostica PET.

Radiofarmaci per la terapia

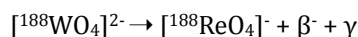
Il radionuclide ¹³¹I, sotto forma di ione ioduro, è stato uno dei primi radioisotopi utilizzati in terapia per il trattamento delle neoplasie della tiroide. Poiché la specie I⁻ costituisce un componente essenziale per il funzionamento degli ormoni tiroidei, l'accumulo di [¹³¹I]I⁻ nella tiroide è una conseguenza del tutto normale del suo naturale comportamento biologico. Negli ultimi anni, un numero rilevante di nuovi radiocomposti marcati con differenti radioisotopi è stato studiato al fine di sviluppare nuovi agenti per quella che viene chiamata terapia interna con radionuclidi (RIT).

Le considerazioni fatte per i radiofarmaci per la diagnostica possono essere estese ai radiofarmaci per la terapia, anche se, in questo caso, la selettività ed affinità verso il tessuto bersaglio devono essere assai elevate per consentire di depositare una dose di radioattività sufficiente a distruggere le cellule malate. In modo simile, la radioattività residua che non si localizza sul bersaglio deve essere rapidamente eliminata dall'organismo principalmente attraverso l'apparato urinario per diminuire il rischio radiologico nei confronti dei tessuti sani.

Radionuclidi per la terapia

Un elenco dei radionuclidi più importanti e delle loro caratteristiche nucleari è riportato in Tabella A2.5. Fra i parametri nucleari più importanti da considerare per la scelta di un radionuclide per la terapia, il tipo di particella emessa nel decadimento radioattivo e la sua energia, assieme al tempo di dimezzamento, sono sicuramente quelli critici. Infatti, un'energia troppo bassa associata ad un tempo di emivita troppo breve può impedire il rilascio di una dose insufficiente ad ottenere qualsiasi effetto terapeutico. Al contrario, un'energia assai elevata può produrre la particella emessa a percorrere un cammino molto lungo all'interno dei tessuti prima di essere assorbita, causando un irraggiamento dannoso dei tessuti circostanti il tessuto malato.

La maggior parte dei radionuclidi impiegati nella terapia è prodotto per mezzo di reazioni nucleari condotte presso centri specializzati ed, in seguito, inviato agli utilizzatori. Solo pochi radionuclidi sono attualmente prodotti con un generatore trasportabile, fra i quali, l'esempio più importante è fornito dal radionuclide renio-188 (¹⁸⁸Re), che è prodotto da un generatore di ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re sotto forma di anione perrenato, [¹⁸⁸ReO₄]⁻. In questa reazione, il wolframio-188 (¹⁸⁸W, chiamato anche tungsteno-188), si trasforma in ¹⁸⁸Re, secondo la reazione:



Meccanismi d'azione

Come già notato, le considerazioni esposte per i radiofarmaci per la diagnostica valgono anche per quelli impiegati in terapia. Nel seguito sono illustrati alcuni esempi di agenti radiomarcanti per la terapia che sono stati già introdotti nell'uso clinico o che sono in fase di valutazione preclinica.

- *Anticorpi monoclonali radiomarcanti*

Il primo radiofarmaco per la terapia approvato per l'uso clinico è composto da un anticorpo monoclonale (ibritumomab), marcato con ^{90}Y per il trattamento dei linfomi (nome commerciale, ^{90}Y -Zevalin). Il radionuclide è legato all'interno di un gruppo chelante costituito dall'acido etilendiamminopentacetico (DTPA), che a sua volta è collegato all'anticorpo mediante la formazione di un legame tioammidico [-NH-C(=S)-] con un gruppo -NH₂ terminale appartenente ad un amminoacido posto sulla superficie della macromolecola proteica. Il composto risultante prende il nome di *radioimmunoconiugato*. Occorre notare che l'anticorpo non marcato stesso possiede una spiccata attività terapeutica poiché è in grado di interagire con i recettori CDA20 posti sulla superficie dei globuli bianchi e, quindi, anche sulle cellule neoplastiche del linfoma bloccandone la crescita. Tuttavia, è stato mostrato che l'introduzione del radionuclide ^{90}Y permette non solo di mantenere l'affinità recettoriale dell'anticorpo, ma di indurre un'ulteriore effetto terapeutico che aumenta la qualità della risposta del paziente.

- *Peptidi radiomarcanti*

Un numero rilevante di sequenze peptidiche marcate con differenti radionuclidi sono state studiate per il trattamento di vari tipi di neoplasie. I peptidi selezionati devono necessariamente mostrare una spiccata affinità per almeno uno dei recettori espressi dalle cellule della particolare neoplasia che si vuole curare. È evidente che più elevata è la specificità del recettore selezionato, minore la possibilità che il radioimmunoconiugato possa depositarsi sui tessuti normali.

Il radiofarmaco peptidico che è stato più ampiamente studiato è costituito da un peptide derivato dalla somatostatina marcato con ^{90}Y (^{90}Y -DOTATOC). Questo radiocomposto interagisce con alcuni sottotipi del recettore della somatostatina espresso da tessuti neoplastici di origine neuroendocrina. Il radionuclide è contenuto all'interno di un gruppo chelante ciclico (DOTA) che, a sua volta, è collegato alla sequenza peptidica attraverso un legame ammidico. Recentemente, è stato prodotto un derivato analogo in cui il radionuclide ^{90}Y è stato sostituito con il radionuclide ^{177}Lu .

- *Composti mimetici*

Come già ricordato per l'anione ioduro, ^{131}I , la capacità di alcuni composti radiomarcanti di comportarsi come 'surrogati' di prodotti naturali presenti nell'organismo, permette di sfruttare questa proprietà per indurre un effetto terapeutico. Uno degli esempi più rilevanti è fornito dal radiofarmaco [^{131}I]metaiodobenzilguanidina ([^{131}I]-MIBG), che mostra caratteristiche che mimano il comportamento biologico del neurotrasmettitore noradrenalina. Ecco si concentra, quindi, nei gangli simpatici ed, in generale, nei tessuti ad innervazione adrenergica. Questo permette di utilizzare questo radiofarmaco per il trattamento delle neoplasie di origine endocrina.

- *Agenti per l'ipossia*

Alcuni composti del rame (^{64}Cu -ATSM) mostrano proprietà chimiche che li rendono sensibili alla concentrazione di ossigeno presente all'interno dei tessuti. In particolare, questi composti sono trattenuti nei tessuti in cui la pressione dell'ossigeno è inferiore al valore normale (*ipossia*), mentre sono eliminati dai tessuti in cui tale pressione appare normale. Questi agenti possono, quindi, essere impiegati per il trattamento di quelle lesioni neoplastiche che contengono estese regioni ipossiche.

- *Microparticelle*

È stata sviluppata una metodologia specifica per poter utilizzare composti radiomarcati per la terapia con radionuclidi del carcinoma epatocellulare. La somministrazione del radiofarmaco, infatti, non avviene per via sistemica, ma per mezzo di un catetere introdotto nell'arteria epatica. In questo modo, sfruttando l'elevata vascolarizzazione della massa tumorale, è possibile coinvolgere e depositare la radioattività proprio in corrispondenza della lesione. Prima del passaggio all'interno del catetere, tuttavia, l'agente radiomarcato deve essere opportunamente adsorbito oppure disciolto in un mezzo opportuno che funge da vettore della radioattività. Sono stati sperimentati principalmente due tipi di vettori.

Il primo è costituito da un olio di origine naturale che, una volta fatto reagire con lo iodio, è comunemente utilizzato come mezzo di contrasto nella radiografia del fegato (Lipiodol). Questa sostanza è capace di estrarre e sciogliere stabilmente al suo interno quei radiocomposti che mostrano un'elevata solubilità nei solventi apolari (lipofilicità). Questo tipo di vettore fisico è stato impiegato, in modo esteso, per veicolare composti lipofilici del Re-188.

Un secondo tipo di vettore fisico è costituito da microsfele di resina o vetro del diametro di alcuni micron, in cui è introdotta una certa quantità di ^{89}Y . Le microsfele così ottenute sono sottoposte ad un flusso di neutroni che trasformano una parte di ^{89}Y nell'isotopo radioattivo ^{90}Y . In questa forma, la radioattività è, infine, depositata sulla massa tumorale attraverso il catetere.

- *Il metodo 'pretargeting'*

Gli anticorpi monoclonali sono stati sempre considerati un vettore ideale per il trasporto della radioattività verso un particolare tessuto bersaglio e ciò proprio a causa della loro elevatissima selettività e specificità. Tuttavia, l'impiego di queste macromolecole per la produzione di radiofarmaci per la terapia presenta anche notevoli inconvenienti il più importante dei quali è dovuto alla loro bassa velocità di diffusione che non permette il raggiungimento del bersaglio in tempi brevi, provocando, in questo modo, il rilascio di una dose elevata di radioattività ai tessuti circostanti. Questo effetto è anche amplificato dal fatto che la permanenza prolungata dell'anticorpo nel sangue ne causa la progressiva degradazione con conseguente deposizione della radioattività nei tessuti sani. Per superare questi ostacoli, sono stati proposti dei metodi che sfruttano l'affinità di alcune piccole molecole nei confronti di alcuni substrati biologici e che, proprio a causa delle loro piccole dimensioni, possono essere utilizzati come veloci trasportatori del radionuclide.

Il primo metodo proposto sfrutta la grande affinità della biotina (vitamina H), per la macromolecola avidina. Nella sua forma più semplice, il metodo consiste nel combinare l'anticorpo all'avidina e, successivamente, somministrarlo al paziente. Dopo aver fatto trascorrere un tempo sufficiente a permettere all'anticorpo di raggiungere il bersaglio, è somministrata la biotina radiomarcata che, in un tempo molto breve, può raggiungere il sito

in cui si è accumulato il complesso anticorpo-avidina, ed infine legarsi fortemente ad esso attraverso la sua interazione specifica con l'avidina.

Recentemente è stato proposto un metodo alternativo che, tuttavia, è basato sugli stessi principi del metodo avidina-biotina. In questa versione, si utilizza un anticorpo bifunzionale che consiste di due differenti sezioni delle quali la prima mostra affinità per il tessuto bersaglio, mentre la seconda risulta affine nei confronti di una particolare sequenza peptidica. Anche in questo caso, l'anticorpo bifunzionale è somministrato all'inizio così da permettere il raggiungimento del bersaglio in un tempo sufficientemente lungo. Successivamente, è introdotto il peptide radiomarcato che, a causa della sua affinità per l'altra parte dell'anticorpo, può legarsi ad esso trasferendo, in questo modo, la radioattività sul sito bersaglio.

La preparazione dei radiofarmaci e i controlli di qualità

Come già detto in precedenza, i radiofarmaci sono considerati medicinali e quindi per essi devono essere adeguatamente garantiti i requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia. Tale qualità garantisce la corretta esecuzione dell'indagine diagnostica e conseguentemente il massimo vantaggio per il paziente. A questo scopo, le *Norme di Buona Preparazione* dei Radiofarmaci in Medicina Nucleare individuano, nell'adozione di un Sistema di Assicurazione della Qualità, un valido strumento utile a mantenere costantemente sotto controllo la conformità di questi prodotti radiofarmaceutici alle relative specifiche di qualità. A questo scopo è necessario:

- Garantire la preparazione dei radiofarmaci secondo gli standard qualitativi tipici delle preparazioni farmaceutiche in genere.
- Garantire la tracciabilità delle operazioni di produzioni e dei risultati ottenuti.
- Definire gli standard tecnici minimi per la produzione di radiofarmaci (attrezzature, laboratori, personale).
- Definire i criteri di gestione della documentazione inerente la produzione di radiofarmaci.

Generatore di $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Al fine di ridurre la quantità dell'isotopo a lunga vita ^{99}Tc , presente negli eluati, il primo eluato ottenuto da un nuovo generatore non deve essere utilizzato per la preparazione dei radiofarmaci di $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Inoltre, le eluizioni successive devono essere effettuate ad intervalli minimi di 24 ore. Negli intervalli fra le eluizioni è necessario che gli aghi del generatore siano protetti seguendo le istruzioni del fornitore. Deve essere eseguito un periodico controllo dei generatori di $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Il controllo è effettuato almeno valutando i seguenti parametri:

- rilascio di ^{99}Mo nel primo eluato di ogni generatore di $^{99\text{m}}\text{Tc}$;
- resa di eluizione calcolata seguendo le istruzioni d'uso del generatore. La resa di eluizione deve essere compresa tra il 110% ed il 90% della resa nominale del generatore;
- la presenza di ioni alluminio nel primo eluato impiegato per la preparazione, nel caso di radiofarmaci le cui caratteristiche possano essere danneggiate dalla presenza di questi ioni.

I risultati di questi controlli devono essere inclusi nel fascicolo della preparazione (*batch record*).

A2.3 Preparazione dei radiofarmaci di ^{99m}Tc più comunemente utilizzati

La sintesi dei radiofarmaci di ^{99m}Tc generalmente avviene in uno step di reazione direttamente dopo l'eluizione di $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ dal generatore. Il solvente di reazione è una soluzione iniettabile di NaCl. I reagenti dovrebbero essere non tossici e la soluzione iniettata sterile e apirogena. La concentrazione dei leganti e del riducente sono in eccesso rispetto alla concentrazione del $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$, questi agenti sono i normali costituenti dei *kit* di marcatura.

Costituenti generali del "kit" di marcatura:

- *Legante*

Agente complessante, che darà origine al radiofarmaco coordinandosi con il ^{99m}Tc .

- *Eccipienti*

Antiossidanti, tamponi, agenti solubilizzanti, etc., la cui funzione è quella di garantire oltre alla maggiore stabilità dei complessi finali, una maggiore velocità e resa di reazione.

- *Riducente*

Con l'eccezione del pertecnetato, tutti i radiofarmaci del tecnezio contengono il metallo in uno stato di ossidazione inferiore a +7: la riduzione dello ione pertecnetato rappresenta infatti un requisito fondamentale. Nella preparazione dei radiofarmaci di ^{99m}Tc più comunemente utilizzati, l'agente riducente è solitamente $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Il meccanismo generale di formazione prevede la preliminare rimozione degli atomi di ossigeno dall'anione pertecnetato attraverso la formazione di specie $\text{Sn}(\text{OH})_n$, in cui lo stagno si lega all'ossigeno del gruppo OH^- allontanandolo dal ^{99m}Tc , che è quindi libero di coordinarsi al legante *L*. Quest'ultimo coordinandosi forma il complesso finale (radiofarmaco) e stabilizza fortemente il metallo in modo da evitare l'ossidazione a pertecnetato o la formazione di biossido di ^{99m}Tc ($^{99m}\text{TcO}_2$) insolubile.

I radiofarmaci tecneziati attualmente impiegati nei reparti di Medicina Nucleare possono essere classificati in base al loro campo principale di applicazione clinica e diagnostica. Eccone una rassegna:

- *Radiofarmaci per lo studio della perfusione cardiaca: i COMPLESSI MONOCATIONICI*

La ricerca iniziata da Deutsch sull'utilizzo di leganti difosfinici per la preparazione di complessi monocationici di ^{99m}Tc fu ulteriormente sviluppata da Kelly e coll., che allo scopo di diminuire la riduzione enzimatica in vivo dei complessi difosfinici, sintetizzarono complessi monocationici di ^{99m}Tc in cui il metallo si trova in uno stato di ossidazione maggiore, quindi più difficilmente riducibile, del tipo $^{99m}\text{TcO}_2\text{L}_2^+$, in cui il metallo, oltre ad essere legato a due leganti difosfinici, è legato anche a due atomi di ossigeno per formare il raggruppamento più stabile TcO_2^+ . In questo periodo è anche iniziata da Deutsch una serie di traccianti per ovviare al problema della riduzione *in vivo*. Egli sintetizzò una classe di composti conosciuti con il nome dei *Q*, in cui le difosfine sono sostituite da monofosfine e i rimanenti siti da basi di Schiff. Solo il *Q12* ebbe l'approvazione in alcuni paesi europei. Gli studi di questi anni permisero di stabilire il ruolo effettivo della carica monocationica di questi complessi.

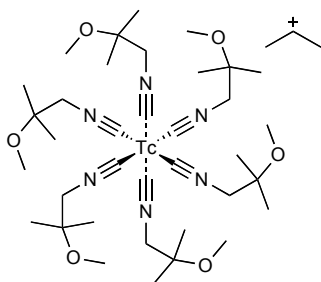
In particolare si scoprì che la localizzazione dei complessi avviene a livello dei mitocondri e che il meccanismo di accumulo non dipende dalla pompa Na^+/K^+ -ATPase, come il Tallio. I complessi monocationici di Tc superano le membrane dei miociti per semplice diffusione passiva, dovuta al loro carattere lipofilo. Una volta entrato nella cellula cardiaca il

complesso rimane stabilmente trattenuto all'interno della membrana mitocondriale a causa dell'interazione tra la carica positiva e il gradiente di potenziale negativo esistente all'interno della membrana stessa. Si conferma comunque l'importanza della carica monocationica. Questa caratteristica ha permesso di utilizzare radiofarmaci di perfusione cardiaca come il *Sestamibi* ed il *Tetrofosfin* anche per la visualizzazione di lesioni neoplastiche in cui i complessi metallici e monocationici sono utilizzati come indicatori positivi tumorali perché presentano una spiccata fissazione cellulare. In realtà, i meccanismi di localizzazione sono differenti. Ciò è stato mostrato dal ^{99m}Tc -NOET, un composto neutro che, nonostante questa caratteristica, persiste localizzato a livello cardiaco per molto tempo. La localizzazione è probabilmente dovuta ad interazione di questa molecola lipofila con specifiche proteine situate sulla membrana esterna dei miociti.

Attualmente in uso clinico sono i due radiofarmaci *Sestamibi* e *Tetrofosfin*:

Sestamibi: protocollo di marcatura

1-3 ml di $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, pertecnetato sodico;
 Agitare sino a completa dissoluzione;
 10 min a 100 °C;
 Raffreddare a RT;
 Stabile 10 h.



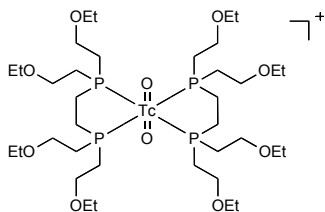
Contenuto del kit di marcatura:

$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$: 300 mCi (in 1-3 ml);
 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.075 mg
 $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4](\text{BF}_4)$: 1.0 mg
 $\text{Na}_3(\text{citrato}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2.6 mg
 L-Cys·HCl·H₂O: 1.0 mg
 Mannitolo: 20.0 mg
 pH: 5.5

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: etanolo > 95%; fase stazionaria: striscie Baker-Flex di ossido di alluminio 1-B; Rf=1 per ^{99m}Tc -Sestamibi, Rf=0.5 per $[\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]]$, Rf=0 per $^{99m}\text{TcO}_2$.

Tetrofosfin: protocollo di marcatura

4-8 ml di $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, pertecnetato sodico;
 Agitare sino a completa dissoluzione;
 10 min a RT;
 Stabile 10 h a 2-8 °C.



Contenuto del kit di marcatura:

$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$: 240 mCi (8.8 GBq) in 5 ml;
 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 30.0 mg
 TETROFOSMIN: 0.23 mg
 Na_2 -Sulfosalicilato: 0.32 mg
 Na-D-gluconato: 1.0 mg
 NaHCO_3 : 1.8 mg

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: etanolo > 95%; fase stazionaria: striscie Baker-Flex di ossido di alluminio 1-B; Rf=0.5 per ^{99m}Tc -Tetrofosmin, Rf=1 per $[\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]]$, Rf=0 per $^{99m}\text{TcO}_2$.

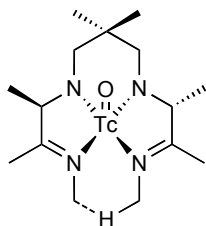
- *Radiofarmaci per lo studio del SISTEMA NERVOSO CENTRALE*

Si distinguono due gruppi di radiofarmaci, a seconda della loro capacità di attraversare la barriera ematoencefalica intatta: non diffusibili (ioni, molecole polari, la cui localizzazione dipende dall'alterazione della permeabilità cerebrale: [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻, Sestamibi, DTPA), e diffusibili: traccianti di perfusione che si distribuiscono nel tessuto cerebrale proporzionalmente al flusso, oppure traccianti recettoriali che interagiscono selettivamente con specifici recettori. La distribuzione di questi ultimi dipende dalla concentrazione dei recettori in specifiche aree cerebrali.

Leonard, Neirinckx e Volkert svilupparono il primo degli agenti tecneziati di perfusione cerebrale approvato dalla FDA per l'uso nell'uomo nei primi anni ottanta, il ^{99m}Tc -HMPAO. In seguito, Kung studiò un altro indicatore, il ^{99m}Tc -ECD; entrambi i radiofarmaci sono attualmente utilizzati in clinica.

HMPAO: protocollo di marcatura

Generatore eluito non più di 24 ore prima;
 Eluizione recente (max 2 h): 5 ml di $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$;
 Agitare sino a completa dissoluzione;
 Somministrare entro 30 min.



Contenuto del *kit* di marcatura:

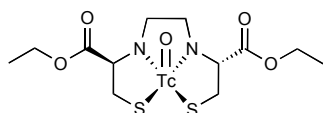
$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$: 30-60 mCi (in 5 ml);
 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 7.6 mg
 HMPAO: 0.5 mg
 NaCl: 4.5 mg
 pH: 8.0 - 9.8

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: MetilEtilChetone (MEK); fase stazionaria: ITLC-SG; $R_f=0.8 - 1$ per ^{99m}Tc -HMPAO, [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻, $R_f=0$ per $^{99m}\text{TcO}_2$. Fase mobile: fisiologica; fase stazionaria: ITLC-SG; $R_f=0$ per ^{99m}Tc -HMPAO, $^{99m}\text{TcO}_2$, $R_f=0.8 - 1$ per [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻. Purezza radiochimica richiesta > 80%.

ECD: protocollo di marcatura

Risospendere B con 2 ml di pertecnetato (100 mCi);
Risospendere A con 3 ml di fisiologica;
Trasferire 1 ml di A in B;
Agitare e attendere 30 min;
Stabile 8 h.

Contenuto del *kit* di marcatura:



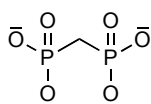
L,L-ECD: 0.90 mg
SnCl₂·2H₂O: 0.072 mg
Na₂EDTA·2H₂O: 0.36 mg
Mannitolo: 24 mg
HCl
Soluzione fisiologica: 3 ml

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: EtilAcetato; fase stazionaria: Backer-Flex, Silica Gel IB-F; camera cromatografica: tubo falcon da 50 ml con coperchio; Rf=0.9 - 1 per ^{99m}Tc-ECD, Rf=0 per [^{99m}TcO₄], ^{99m}TcO₂, ^{99m}Tc-EDTA. Purezza radiochimica richiesta > 90%.

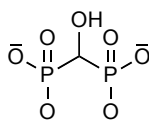
- *Radiofarmaci per l'apparato osteoarticolare: i ^{99m}Tc-DIFOSFONATI*

I polifosfati si legano alle proteine seriche e sono rimossi dal circolo ematico per fissazione ossea e per eliminazione renale. La fissazione ossea rimane costante per diverse ore, mentre quella del fondo diminuisce lentamente. Il rapporto osseo/fondo quindi migliora con il tempo ed è massimo dopo un certo tempo dalla somministrazione del tracciante, tempo che è funzione anche della clearance renale dei fosfati. In passato, per migliorare la qualità delle immagini, si studiarono molecole che mostrassero un comportamento simile ai polifosfati, ma che avessero un miglior rapporto tra captazione ossea e fondo. Discreti risultati si ottennero con i polifosfati, che tuttavia, ben presto, furono sostituiti dai ^{99m}Tc difosfonati per la superiore qualità delle immagini.

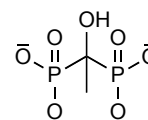
Composti organici caratterizzati dal legame P-C-P hanno mostrato rispetto ai fosfati, caratterizzati dal gruppo P-O-P, una maggiore stabilità in vivo. Infatti, mentre sui fosfati è attivo l'enzima fosfatasi, sui fosfonati no. Inoltre, essi mostrano una più rapida eliminazione renale, che consente di ottenere una migliore qualità di immagini, anche dopo tempi nettamente più brevi dalla somministrazione. Le diverse formulazioni illustrate in figura sono state studiate proprio con lo scopo di migliorare l'eliminazione renale e ottenere un maggior rapporto osso/tessuto molle.



MDP
Metilendifosfonato



HMDP
Metilendrossidifosfonato



HEDP
Etilidrossidifosfonato

Tra questi composti l'MDP è il più utilizzato, anche se certi autori suggeriscono che la presenza di un ossidrilico in posizione alfa rispetto al carbonio, consente una più rapida eliminazione della frazione circolante. I leganti bi- e tri-dentati per MDP⁴⁻, HMDP⁴⁻, HEDP⁴⁻

mostrano un'elevata affinità per il calcio e i radiofarmaci che li contengono sono utilizzati come agenti diagnostici del tessuto scheletrico e del tessuto miocardico infartuato. La diversa affinità per il calcio dipende dai sostituenti del carbonio che influenzano:

- l'ingombro sterico (un gruppo ingombrante diminuisce la capacità di coordinazione);
- la capacità chelante (si possono ottenere leganti bi o tri-dentati);
- gli effetti elettronici (sostituenti elettron-donatori favoriscono la coordinazione).

Studi condotti sul ^{99m}Tc -difosfonato mostrano un'affinità coordinativa crescente: HEDP>MDP>HMDP nei confronti del calcio.

La struttura dei complessi risulta difficilmente determinabile a causa della varietà dei composti che si formano durante la sintesi. Deutsch, in seguito ad analisi di diffrazione dei raggi X, ha proposto per il ^{99m}Tc -MDP una struttura polimerica. Ogni atomo di tecnezio è approssimativamente ottaedrico, con i due ponti ad ossigeno in posizione *cis*, legato a due difosfonati contemporaneamente condivisi da due atomi metallici. Il rapporto Tc/MDP nel polimero è 1:1.

I fosfonati sono agenti chelanti piuttosto deboli e i complessi di tecnezio tendono a degradarsi sotto l'azione di ossidanti dando nuovamente origine all'anione pertecnetato. Nle kit, oltre alla presenza dello stagno, è presente un antiossidante (l'acido paraamminobenzoico), la cui azione permette di limitare la quantità di ione stannoso presente nel kit, rendendo più improbabile la formazione di stagno idrossido colloidale.

Il ruolo dello stagno in questi composti è particolarmente importante, non solo perché lo ione stannoso ha la funzione di riducente. Recentemente è stato infatti ipotizzato che lo Sn^{4+} , originatosi nel processo di ossido-riduzione del pertecnetato, formi specie polimeriche Tc-DP-Sn-DP di varie dimensioni, ma tutte dotate di affinità al tessuto osseo.

MDP: protocollo di marcatura

1-6 ml di $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, pertecnetato sodico;
Agitare pochi secondi sino a completa dissoluzione;
Utilizzare entro 8 h, tenere a riparo dalla luce.

Contenuto del *kit* di marcatura:

^{99m}Tc -MDP
(struttura non determinata)

$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$: 500 mCi (in 1-6 ml);
 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.21 mg
MDP: 10 mg
Acido p-amminobenzoico (PABA): 2 mg
pH: 6.5 - 7.5

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: 1.0M Acetato di Sodio; fase stazionaria: ITLC-SG; $R_f=0.8 - 1$ per ^{99m}Tc -MDP, $[\text{O}_4]^-$, $R_f=0$ per $^{99m}\text{TcO}_2$. Purezza radiochimica richiesta > 95%.

- *Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario: ^{99m}Tc -DMSA*

La fissazione avviene a livello parenchimale e dopo 2 ore è costante e stabile. Poiché la concentrazione del tracciante nel parenchima renale è stabile, la rivelazione scintigrafica statica dopo 2-3 ore permette di valutare accuratamente il contributo funzionale dei due reni separati. Si possono effettuare studi morfologici della corticale renale.

La struttura chimica del complesso non è definita. Esso presenta un'emivita nel sangue di circa 1 ora, si localizza nella regione corticale del rene dove si fissa alle cellule del tubulo

contorto prossimale e raggiunge la sua massima concentrazione dopo 3-6 ore dalla somministrazione. Nella preparazione del radiofarmaco ha un'importanza fondamentale il pH di reazione che deve essere compreso tra 2.5 e 3.5. Se la marcatura fosse fatta avvenire a pH alcalino si formerebbe un'altra specie, il $^{99m}\text{Tc(V)}\text{-DMSA}$ con caratteristiche farmacocinetiche completamente diverse. Il $^{99m}\text{Tc-DMSA}$ pentavalente è stato utilizzato per molti anni per lo studio dei carcinomi midollari, primitivi o secondari della tiroide. Il suo meccanismo d'azione è probabilmente legato ad alterazioni nelle cellule neoplastiche del metabolismo fosfocalcico.

MDP: protocollo di marcatura

1-6 ml di $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, pertecnetato sodico;
Agitare pochi secondi sino a completa dissoluzione;
Attendere 20 min a RT;
Utilizzare entro 4 h, tenere a riparo dalla luce.

Contenuto del *kit* di marcatura:

$^{99m}\text{Tc-DMSA}$ (struttura non determinata)	$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$: 60 mCi (in 1-6 ml); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.21 mg DMSA: 1.0 mg Acido ascorbico, HCl, NaOH; pH: 2.5 - 3.5
---	--

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: MetilEtilChetone (MEK); fase stazionaria: ITLC-SG; camera cromatografica: tubo falcon da 50 ml; $R_f=1$ per $[\text{C}^{99m}\text{TcO}_4]$, $R_f=0$ per $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{Tc-DMSA}$.

- *Radiofarmaci per lo studio della funzionalità renale: $^{99m}\text{Tc-MAG3}$, Mercapto-acetil-glicina*

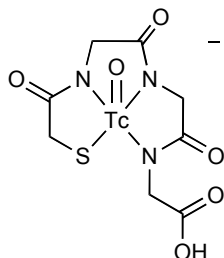
È utilizzato per lo studio della capacità funzionale di ciascun rene.

Le immagini sono registrate in sequenza nei primi 20-30 minuti dalla somministrazione. La presenza di un gruppo carbossilico terminale non coordinato sembra avere un ruolo importantissimo per favorire l'escrezione urinaria.

Questo radiofarmaco è caratterizzato da un'elevata eliminazione tubulare, tanto che dopo 3 ore dall'iniezione oltre il 90% dell'attività iniettata è eliminata, mentre la restante permane associata nel fegato, nella colecisti e nell'intestino. La captazione in queste aree è dipendente dal carattere lipofilo del complesso. In più l'estrazione renale del MAG3 è 2-3 volte superiore al DTPA e consente misure accurate anche in pazienti la cui funzione renale risulta compromessa.

MAG3: protocollo di marcatura

10 ml di Na^[99mTcO₄], pertechnetato sodico;
Agitare pochi secondi sino a completa dissoluzione;
Riscaldare a 100 °C per 10 min;
Riportare a RT;
Utilizzare entro 6h.



Contenuto del kit di marcatura:

Na^[99mTcO₄]: 30 mCi (in 10 ml);
SnCl₂·2H₂O: 0.04 mg
Betiatide: 1.0 mg
Sodio Tartrato·2H₂O: 16.9 mg
pH: 5.0 - 6.0

Procedura per il controllo di qualità: fase mobile: 55/45/1, Fisiologica/Metanolo/Acido acetico glaciale; fase stazionaria: RP-C18; camera cromatografica: tubo falcon da 50 ml con coperchio; R_f=0.8-0.9 per ^[99mTcO₄], R_f=0 per ^{99mTcO₂}, R_f=0.35-0.45 per ^{99mTc}-MAG3. Purezza radiochimica richiesta > 95%.

Lettere consigliate

- Bailey DL, Townsend DW, Peter E, et al., *Positron Emission Tomography: Basic Sciences*, Springer-Verlag, 2005.
- Comet M, Vidal M., *Radiopharmaceutiques: Chimie de Radiotraceurs et Applications Biologiques*, Presses Universitaires de Grenoble, 1998.
- Dondi M, Giubbini R, *Medicina Nucleare nella Pratica Clinica*, Patron Editore 2003.
- Pascali C, Bogni A, Crippa F, et al., *Concetti Generali sulla Produzione di Radiofarmaci Emettitori di Positroni*, Aretré S.r.l., 1999.
- Ruth T.J., *Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry*, Wiley-Blackwell, 2008.
- Kowalsky R.J., Falen S.W., *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy & Nuclear Medicine*, Amer Pharmacists Assn, II[^] edition, 2004.
- Saha G.B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer Verlag, 5th Edition, 2003.
- Sampson C.B., *Textbook of Radiopharmacy: Theory and Practice*, Taylor & Francis, 1998.
- Schwochau K., *Technetium: Chemistry and Radiopharmaceuticals*, Wiley VCH 2000.
- Taillefer R., Tamaki N., *New radiotracers in Cardiac Imaging: Principles and Applications*, MCGraw-Hill, 1998.
- Welch M.J., Redvanly C.S., *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, John Wiley & Sons Inc., 2003.

A2.4 Il core $[\text{Me}^{(V)}(\text{N})]^{2+}_{int}$ (Me: Tecnezio, Renio), il ruolo dei leganti PNP^[1]

Il Tecnezio per la configurazione elettronica $[\text{Kr}]4d^55s^2$, ovvero $[\text{Kr}]4d^65s^1$, può presentare diversi stati di ossidazione da -1 (d^8), come nel complesso $[\text{Tc}(\text{CO})_5]$; a +7 (d^0), come nel $[\text{TcO}_4]$; 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 A2.5).

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+} ; $\text{Tc}_2\text{O}_3^{4+}$; TcN^{2+} ; TcS^{3+} ; TcNR^{3+}
4+	Tc^{4+} ; TcP_2^{4+} ; $\text{TcO}(\text{OH})^+$; $\text{Tc}(\text{OH})_2^{2+}$
3+	TcP_3^{3+} ; Tc^{3+}
2+	Tc^{2+}
1+	Tc^+ ; $\text{Tc}(\text{CNR})_6^+$; $\text{Tc}(\text{CO})_3^+$
0	Tc ; Tc_2
1-	Tc^-

Tabella A2.5. 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 A2.6); gli agenti riducenti maggiormente utilizzati sono cloruro di stagno (II), cloruro di ferro (II), acido cloridrico, acido ascorbico e sodio boridruro. 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 sia 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 A2.6. 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, [(CH₃)₂PCH₂CH₂P(CH₃)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.

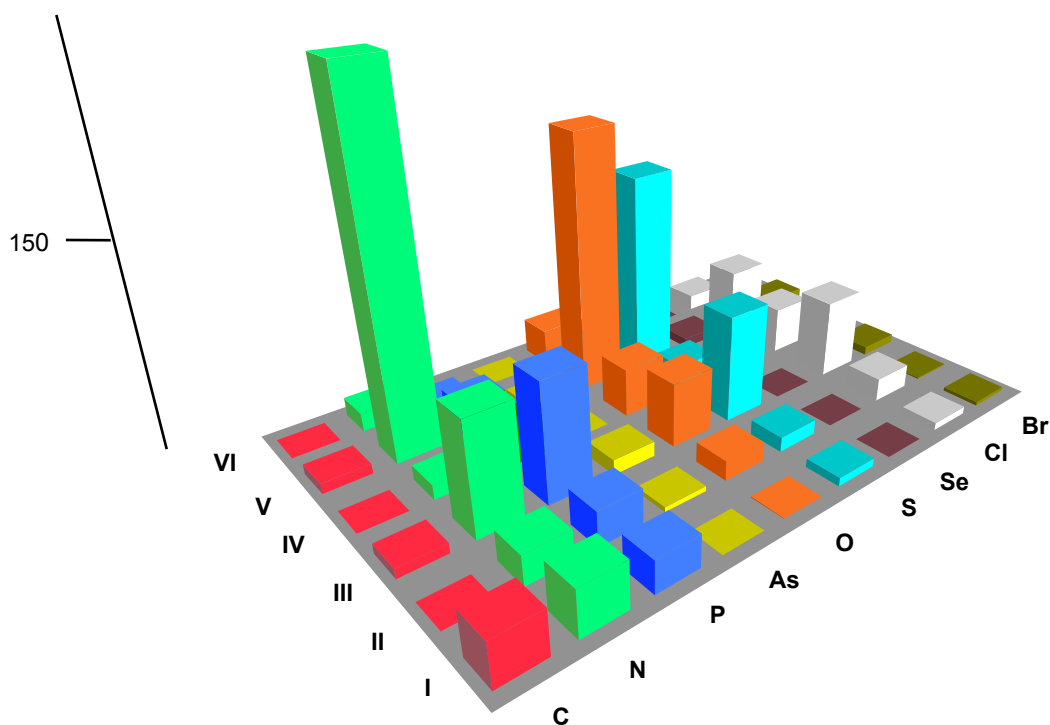


Figura A2.1. Atomi coordinanti rispetto al numero di ossidazione del Tecnezio

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 A2.1, 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 bipyramidale 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 idrofilo-lipofilo, 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.

Il core $[\text{Me}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}_{\text{int}}$ (Me: Tecnezio, Renio)

Complessi che contengono il core nitrato $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ sono oggetto di studio del presente lavoro .

Il gruppo nitrato è tra i più forti donatori di elettroni π , agendo come legante terminale ha un ordine di legame formale corrispondente ad un triplo legame formato da un legame σ e due legami π costituiti per sovrapposizione degli orbitali 2p occupati dell'azoto con due orbitali 4/5d vuoti, di appropriata simmetria, del metallo. Questa condizione è soddisfatta dal metallo negli alti stati di ossidazione: si conoscono complessi contenenti il core nitrato del Me(V), Me(VI), come nel complesso $[\text{Me}^{\text{VI}}(\text{N})\text{Cl}_4]^-$, e Me(VII). Il legante nitrato è in grado di stabilizzare questi stati e i complessi che si formano, rendendo il metallo inerte nei confronti di reazioni ossidoriduttive. La figura seguente riporta una razionalizzazione del triplo legame metallo azoto, riferendosi alla descrizione dell'orbitale molecolare. Con l'asse z definito sulla direttrice individuata dal legame metallo-azoto, l'orbitale d_{xz} si combina con l'orbitale p_x , mentre l'orbitale d_{yz} si combina con

l'orbitale p_y costituendo entrambe le componenti π . L'orbitale d_{xy} , a carattere di non legame, è a minor energia rispetto all'orbitale π^* ed è correlato principalmente al centro metallico.

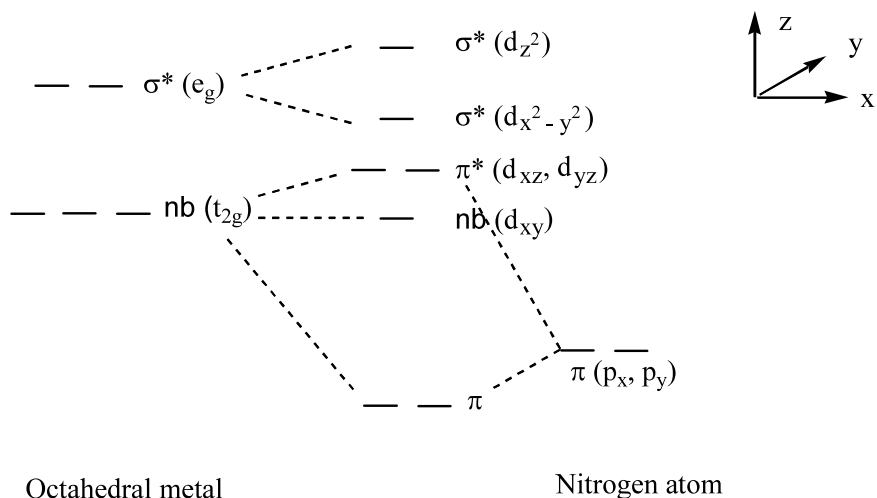


Figura A2.2. Descrizione dell'orbitale molecolare del legame Tecnezio-Azoto in un complesso ottaedrico (R.A. Eikey, M.M. Abu-Omar / Coordination Chemistry Reviews 243 (2003) 83-124).

La chimica del core $[\text{Me}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ 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 ($2,66 \div 3,0 \text{ \AA}$). La situazione è simile a quella dell'oxo core con il quale l'nitruro risulta isoelettronico ed isostrutturale, anche se in questo caso il legante determina la geometria e la carica residua dei complessi senza modificare l'unità $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$, come invece accade per $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O})]^{3+}$ che può diventare dioxo.

Il core nitruro può essere sintetizzato in modo semplice ed efficiente in presenza di un'adatta sorgente di gruppi nitruro N^{3-} , quale può essere un'azide, un'idrazina o un ditiocarbazato. Il primo procedimento, utilizzato da Baldas per la formazione del core nitruro, prevede l'uso di sodio azide in ambiente acido per acido cloridrico e a pressione ridotta, partendo da $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ed ottenendo $[\text{^{99m}Tc}^{\text{VI}}(\text{N})\text{Cl}_4]$. 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 ottiene 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 nitruro. Diversamente, l'utilizzo di leganti, quale S-metilditiocarbazato, porta alla sintesi diretta del core nitruro.

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

Il core Tc-99m è ottenibile in alta resa in tampone fosfato dopo 15 minuti e a temperatura ambiente da pertecnetato, in presenza di stagno cloruro quale riducente, e di diidrazide succinica, idrosolubile e poco tossica, come donatore di N^{3-} . Il core $[\text{Me}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ presenta, rispetto al core oxo, una minore reattività e quindi una maggiore stabilità nei confronti delle reazioni di ossido riduzione e in situazioni di pH variabile: 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:

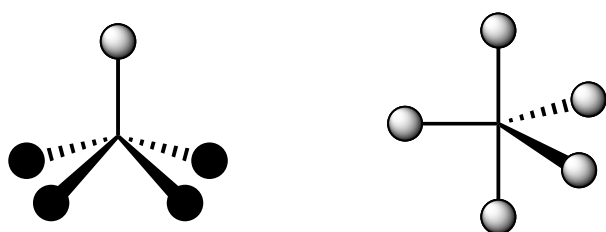
- la lunghezza di legame, $\text{Tc} \equiv \text{N}$ più corto di $\text{Tc} = \text{O}$; la maggiore probabilità di formazione di

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;
- per quanto attiene alla base di Lewis, che complessa il metallo, composti contenenti l'unità osso sono coordinati stabilmente da leganti sia soft sia hard, mentre quelli con il core azoturo prediligono leganti soft, come fosfine e ditiocarbammati.

Coordinazione del core $[\text{Me}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$

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



Piramidale quadrata, (*sp*)

Bipiramide trigonale, (*tbp*)

Figura A2.3. Possibili strutture di nitruro-complessi pentacoordinati.

Si hanno complessi a geometria piramidale a base quadrata (*sp*) quando gli atomi coordinanti sono basi di Lewis π -donatrici uguali in natura, 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 bipyramidale (*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 nitruro le posizioni equatoriali.

Il core nitruro, 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 nitruro tecnezio "simmetrici" sono ad esempio $[\text{Tc}(\text{N})(\text{DTC})_2]$, con DTC ditiocarbammato, a geometria piramidale a base quadrata oppure $[\text{Tc}(\text{N})$

(PS)₂], con PS fosfino-tiolo, a geometria bpiramidale trigonale.

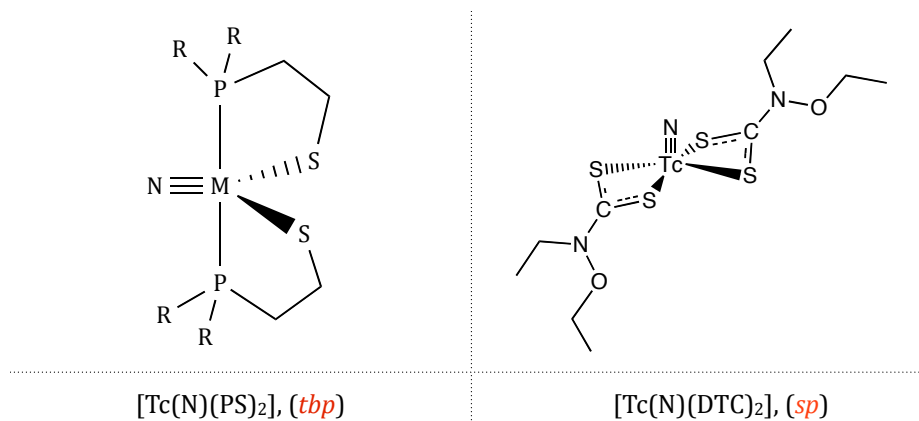


Figura A2.4. Strutture di [Tc(N)(PS)₂] e di [Tc(N)(DTC)₂].

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 bpiramide trigonale e la piramide a base quadrata (pseudo *tbp*).

Nei complessi di nitruro tecnezio è possibile produrre una distorsione progressiva dalla geometria piramidale a base quadrata a quella bpiramidale 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 nitruro complesso di Me(V) pentacoordinato.

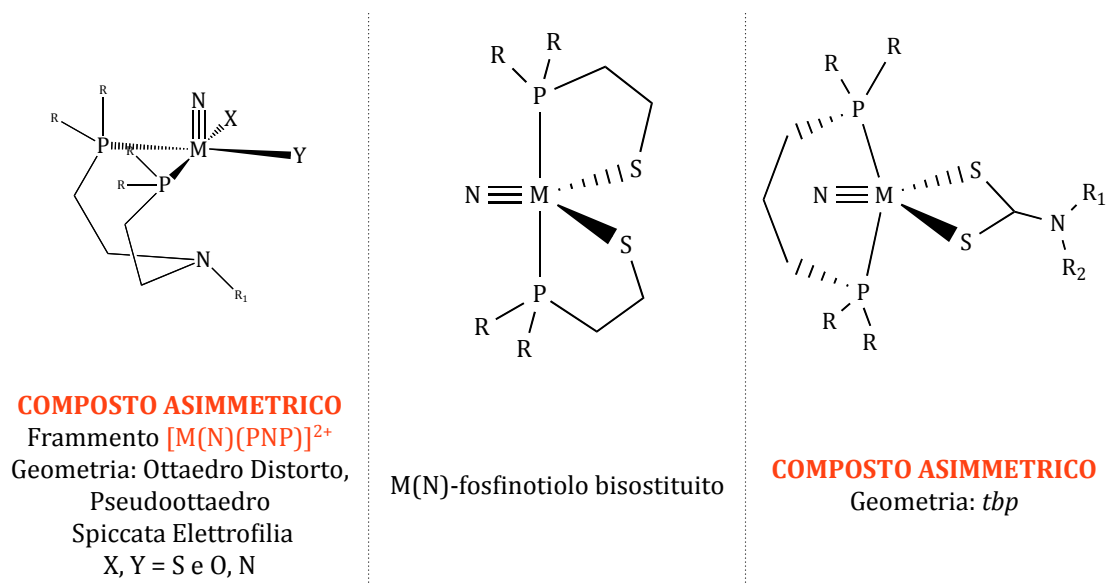


Figura A2.5. Differenti geometrie dei complessi di nitruro tecnezio indotte dai leganti.

Sperimentalmente si è osservato che il tipo di legante difosfinico in un frammento molecolare formato dal gruppo $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ 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 bipyramidale trigonale.

L'inserimento di eteroatomi (X) nella catena carboniosa che separa gli atomi di fosforo (III) del legante difosfinico permette, nella coordinazione al core nitrato, la formazione di complessi del tipo $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})\text{Cl}_2]$ di struttura non più trigonale bipyramidale 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 $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ 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 $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})\text{Cl}_2]$ 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.

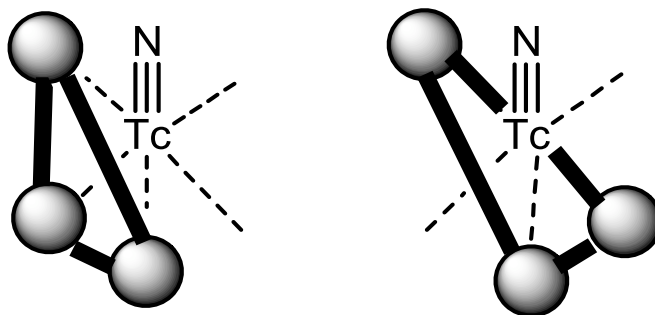


Figura A2.6. Disposizione fac e mer di $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})(\text{L})_2]^n$

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

Con il termine di "frammenti metallici reattivi" è 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/lipofile 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.

Il Frammento metallico $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$, la cui geometria è stata precedentemente discussa^[32,33], consiste di approccio sintetico, basato sulla produzione di azoturo complessi dissimmetrici di Tc(V) in alta resa.

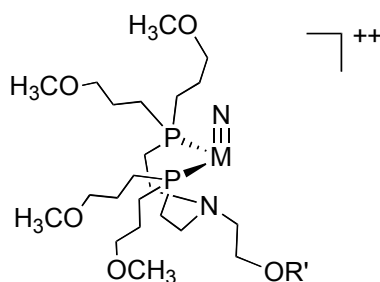


Figura A2.7. Rappresentazione del frammento metallico $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$.

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 elettronefiche 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 $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$, $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{CysNAc})(\text{PNP})]$ e $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{CysOEt})(\text{PNP})]^+$, 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 ($\sim 70 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$)^[34] (Figura A2.8).

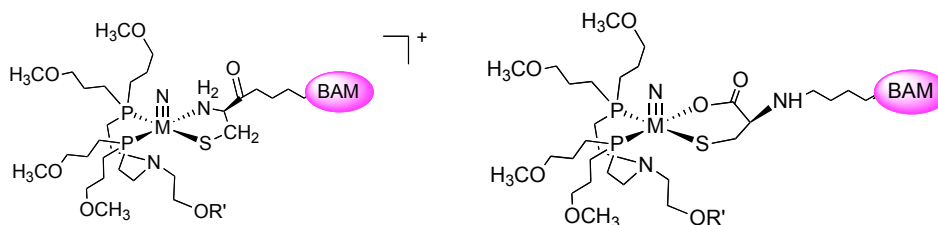


Figura A2.8. Coordinazione della Cisteina al frammento $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$. BAM=biomolecola.

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.

Generalità sui leganti fosfinici

Vari studi hanno dimostrato che i leganti amminodifosfinici, PNP, rivestono un ruolo cruciale nella chimica di coordinazione di nitruro 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 A2.9. 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.

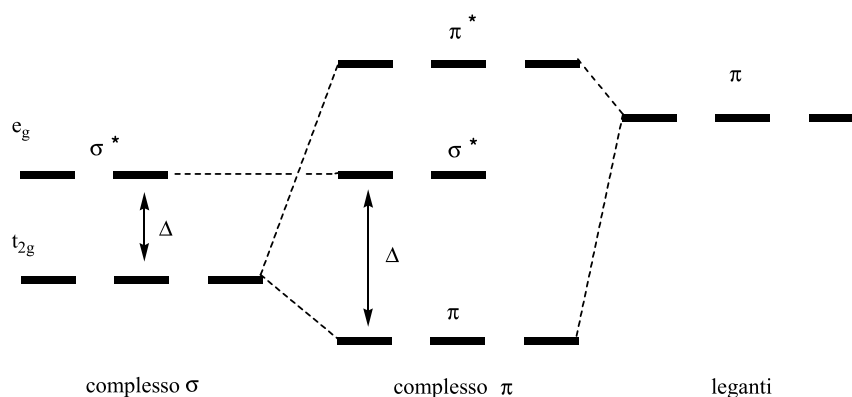


Figura A2.9. Diagrammi dei livelli energetici degli orbitali molecolari π in complessi ottaedrici.

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 A2.10)

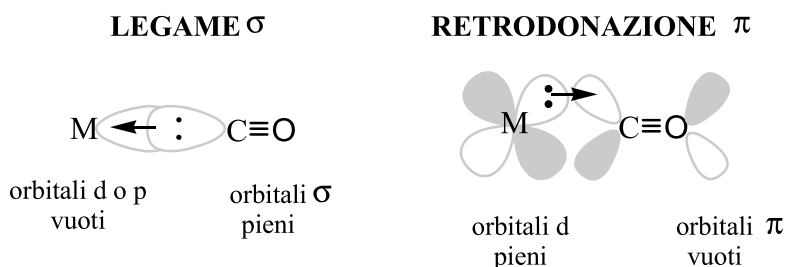


Figura A2.10. Raffigurazione dell'interazione tra orbitali nel fenomeno della retrodonazione.

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 pertecnato 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.

A2.5 Cardiologia Nucleare

L'avvento della SPECT alla fine degli anni '70 e della PET negli anni '80 ha profondamente modificato l'utilità clinica della tecnica dei radiotraccianti per la valutazione della perfusione e della vitalità del miocardio. Per ottenere le immagini topografiche del cuore, entrambe le tecnologie SPECT e PET usano un analogo processo di ricostruzione. Esse differiscono tuttavia nel tipo di radiofarmaci e di strumentazione impiegati per acquisire le immagini cardiache. La SPECT permette di valutare in maniera non-invasiva il flusso ematico miocardico mediante traccianti estraibili, come il ^{201}Tl , e di perfusione marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La PET, d'altro canto, permette la valutazione non-invasiva del flusso ematico, della funzione e del metabolismo regionali usando substrati fisiologici preparati con isotopi positrone-emittenti, quali ad esempio, carbonio, ossigeno, azoto e fluoro. Dopo danno miocardico acuto e riperfusione coronarica, le tecniche SPECT e PET rendono possibile la determinazione non-invasiva dell'entità del recupero del miocardio, distinguendo quello stordito da quello necrotico. Analogamente, nei pazienti con coronaropatia cronica e disfunzione ventricolare sinistra, queste tecniche consentono di distinguere in maniera non-invasiva tra miocardio ipoperfuso ma vitale (ibernazione) e miocardio ipoperfuso e cicatriziale nelle regioni disfunzionali. Questa differenziazione del miocardio in vitale (reversibile) e non-vitale (danneggiato irreversibilmente) con le tecniche di SPECT e PET è stata utilizzata per guidare le decisioni terapeutiche riguardo alla vascolarizzazione.

I radioisotopi usati comunemente nella SPECT emettono raggi gamma di varie energie e hanno emivite fisiche relativamente lunghe. La localizzazione dei raggi gamma emessi da traccianti radioattivi a emissione di un singolo fotone nel cuore viene compiuta da una camera a scintillazione di Anger (gamma camera) che converte i raggi gamma in fotoni luminosi per mezzo di rivelatori a scintillazione di ioduro di sodio. La gamma camera limita la direzione dei fotoni che penetrano nel rivelatore mediante un collimatore e poi posiziona elettronicamente ogni evento. Pertanto, i radioisotopi usati per la registrazione scintigrafica ottimale con la SPECT sono limitati a quelli che emettono raggi gamma con un range di energia adatto per la gamma camera e per i relativi dispositivi a singolo fotone, ad esempio ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{123}I . La risoluzione spaziale del sistema SPECT è di 12-15 mm. Sebbene clinicamente utili, le stime del flusso ematico miocardico relativo per mezzo della SPECT sono notevolmente influenzate da artefatti di attenuazione.

I radioisotopi positroni-emittenti impiegati nella PET emettono due raggi gamma, di 511 KeV ciascuno, e hanno emivite fisiche relativamente brevi. Quando vengono emessi da un nucleo, i positroni ad alta energia viaggiano per brevi distanze ed entrano in collisione con un elettrone. Il risultato è la completa annichilazione sia dell'uno sia dell'altro e la conversione delle loro masse combinate in energia sotto forma di radiazione elettromagnetica (due raggi gamma di 511 KeV ciascuno). Poiché i raggi gamma sono perfettamente collineari (scaricati a 180° l'uno dall'altro) e viaggiano in direzione opposta, i rivelatori PET possono essere programmati in modo da registrare soltanto eventi in coincidenza temporale di fotoni che colpiscono direttamente rivelatori opposti, con il risultato di una migliore risoluzione, sia spaziale (4 - 6 mm) che temporale. Inoltre, il sistema PET è più sensibile di quello SPECT (conteggi più elevati) e offre la possibilità di correggere l'attenuazione. Conseguenza di questi suoi vantaggi è la possibilità di quantificare la concentrazione del tracciante in unità assolute.

I radioisotopi usati comunemente nella SPECT sono elementi non presenti in natura, impiegati per studi di fisiologia. Pur essendo il radioisotopo più adatto per le scintigrafie con gamma camera, il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ non si lega covalentemente a ossigeno, carbonio e azoto in molecole organiche e di solito richiede sistemi di legame più complessi per marcare substrati organici in forma chelata. Al

contrario, gli isotopi di elementi presenti in natura, ad esempio ^{11}C , ^{15}O e ^{13}N , sono tutti positroni-emittenti e perciò possono marcare substrati molecolari senza significative alterazioni della specificità di substrato. Il ^{18}F , positrone emittente, può spostare l'idrogeno molecolare senza alterare la specificità di substrato per una reazione catalizzata da enzimi.

Pertanto, una distinzione seria tra SPECT e PET risiede nello sviluppo di radioligandi che marchino i principali substrati del metabolismo energetico e i sottotipi dei recettori di membrana nel cuore, senza alterare in modo significativo la specificità di substrato.

Tecniche SPECT e PET	
<i>Gravità della riduzione della perfusione miocardica</i>	<i>Riserva contrattile</i>
Traccianti SPECT	Ecocardiografia da stress farmacologico con dobutamina
^{201}Tl , traccianti marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$	RM da stress con dobutamina
Traccianti PET	Angioscintigrafia da sforzo o da stress farmacologico con dobutamina
$^{82}\text{Rb}^+$, $^{13}\text{NH}_3$, $^{15}\text{OH}_2$	Gated-SPECT da stress farmacologico con dobutamina
	Gated-PET da stress farmacologico con dobutamina
<i>Integrità della membrana sarcolemmatica</i>	<i>Metabolismo</i>
Tecniche SPECT	Traccianti SPECT
Ridistribuzione del ^{201}Tl	Acidi grassi marcati con ^{123}I
Tecniche PET	Traccianti PET
Washout del $^{82}\text{Rb}^+$	^{18}F -fluorodeossiglucosio
	^{11}C -acetato
	^{11}C -palmitato
	Intrappolamento metabolico della $^{13}\text{NH}_3$

Tabella A2.7. Tecniche SPECT e PET. L'impiego di traccianti radioattivi che indagano la gravità della riduzione del flusso ematico del miocardio, l'integrità delle membrane cellulari, la riserva contrattile o il metabolismo delle cellule potrebbe consentire di distinguere nei pazienti con disfunzione ventricolare sinistra ischemica cronica, tra miocardio vitale e miocardio cicatriziale.

Tecniche SPECT: Tallio-201

- *Tallio-201*

Catione monovalente con proprietà biologiche simili al potassio.

Emissione di raggi Xmercury 80 keV, emivita fisica 74 h.

Elevata frazione di estrazione di primo transito (~85%).

Trasporto attraverso la membrana sarcolemmatica della cellula muscolare mediante il sistema di trasporto Na-K-ATPasi e per diffusione facilitata.

Picco della concentrazione miocardica entro 5 min dalla iniezione endovenosa.

Rapida clearance dal compartimento intravascolare.

La redistribuzione ha inizio 10-15 minuti dopo l'iniezione.

L'estrazione miocardica del ^{201}Tl dipende dall'utilizzazione dell'energia, dall'adenosin-trifosfatasi (ATPasi) di membrana e dal trasporto attivo. Il ^{201}Tl non si concentra attivamente nelle aree di miocardio infartuato o cicatriziale. Pertanto la sua ridotta captazione da parte del miocardio subito dopo l'iniezione potrebbe essere causata o da un diminuito flusso ematico regionale o da un infarto. Studi sperimentali con il ^{201}Tl hanno dimostrato che l'estrazione cellulare del tracciante radioattivo non è influenzata dalla ipossia, a meno che non sia presente un danno irreversibile. Analogamente, le condizioni fisiopatologiche di ipoperfusione cronica (ibernazione) e la disfunzione post-ischemica

(stordimento), in cui la funzione contrattile regionale è compromessa in presenza di vitalità del miocardio, non modificano negativamente l'estrazione del ^{201}Tl .

Tecniche SPECT: traccianti di perfusione marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

A partire dal 1981 sono state sviluppate numerose nuove classi di complessi marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ per l'imaging di perfusione miocardica. Questi traccianti sono captati dal miocardio in proporzione al flusso ematico regionale. Trial clinici multicentrici hanno indicato che l'accuratezza di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Teboroxima, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina nella identificazione delle coronaropatie è analoga a quella del ^{201}Tl . Se anche questi traccianti di perfusione marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ forniscano sulla vitalità del miocardio informazioni simili a quelle che si ottengono con ^{201}Tl è oggetto di controversie. L'esperienza clinica con la Teboroxima, la Tetrofosmina e il NOET nella valutazione della vitalità del miocardio è limitata.

- *Sestamibi e Tetrofosmina marcati con $^{99\text{m}}\text{Tc}$*

Composti cationici liposolubili.

Energia al fotopicco 140 keV, emivita fisica 6 h.

Elevata frazione di estrazione al primo transito (~60%).

Captazione passiva, attraverso le membrane mitocondriali.

All'equilibrio, sono ritenuti all'interno dei mitocondri, a causa di un notevole potenziale transmembrana negativo.

Clearance dal compartimento intravascolare attraverso l'escrezione epatobiliare.

Ridistribuzione minima, rispetto al ^{201}Tl .

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi (isonitrile) (MIBI) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina (difosfina), sono entrambi complessi cationici, lipofili, con cinetiche di captazione miocardica e clearance ematica simili. Tuttavia, la clearance polmonare ed epatica della Tetrofosmina è più rapida di quella del Sestamibi, il che può migliorare la risoluzione delle immagini cardiache e ridurre il carico totale di radiazioni. Sia il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi, sia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina sono captati attraverso membrane sarcolemmatiche e mitocondriali dei miociti per diffusione passiva e trattenuti dai mitocondri all'equilibrio, a causa di un grande potenziale transmembrana negativo. Studi sperimentali con il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi hanno dimostrato che la captazione e la clearance miocardiche del tracciante sono in relazione al potenziale transmembrana mitocondriale e non differiscono tra regioni ischemiche e non ischemiche.

- *$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Teboroxima*

Composto neutro, lipofilo

Energia al fotopicco 140 keV, emivita fisica 6 h.

Frazione di estrazione al primo transito, in condizioni iperemiche (~91%).

L'estrazione miocardica rimane lineare anche in condizioni di flusso elevato.

Clearance miocardica rapida, a una velocità proporzionale al flusso ematico regionale.

Captazione e wash-out sono indipendenti dallo stato metabolico delle cellule miocardiche.

Il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Teboroxima è un composto BATO (*boronic acid adducts of technetium di oxime*), neutro, lipofilo, con una riportata estrazione di primo transito dell'88% e del 91% in condizioni iperemiche. A differenza di quelle del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi e di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, la clearance miocardica della teboroxima è rapida e la velocità di wash-out è proporzionale al flusso ematico. In studi sperimentali è stato osservato che la clearance avviene per circa i due terzi della sua attività dal cuore, con una emivita di 3.6 minuti. Pertanto, sia la

captazione, sia la clearance miocardiche della teboroxima sono proporzionali al flusso ematico regionale e non sono disturbate dal metabolismo tissutale o da altre caratteristiche di legame all'interno del miocardio. Questo composto è quindi particolarmente adatto più come tracciante del flusso ematico che della vitalità.

- ^{99m}Tc-NOET

Composto neutro, lipofilo.

Elevata estrazione di primo transito in condizioni iperemiche (~85%).

Dopo diffusione passiva, si lega alle proteine della membrana lipidica dei miociti.

Il legame avviene in associazione con i canali del calcio di tipo L ed è indipendente dal contenuto di ATP.

Non si accumula nelle frazioni citosolica o mitocondriale.

Lenta clearance miocardica e lunga ritenzione nel miocardio normale.

Clearance dal compartimento intravascolare attraverso escrezione urinaria e fecale.

Ridistribuzione nel tempo, prevalentemente per *wash-out* differenziale.

Il ^{99m}Tc-NOET, (bis[N-etossi-etil ditiocarbamato] nitrido tecnezio[V]) è un composto neutro, lipofilo, caratterizzato dalla presenza di un gruppo con triplo legame Tc-N. La frazione di estrazione di primo transito del NOET è del 75% a riposo e dell'85% in condizioni di iperemia. Si ritiene che, dopo diffusione passiva, il meccanismo della sua captazione sia il legame alle proteine della membrana lipidica di miociti isolati. Analogamente al ^{99m}Tc-Sestamibi e alla ^{99m}Tc-Tetrofosmina, la clearance miocardica del NOET è lenta, con una ritenzione più lunga nel miocardio normale. Tuttavia, a differenza degli altri due, il NOET presenta con il tempo una significativa redistribuzione, prevalentemente da wash-out differenziale. Poiché captazione e ritenzione dipendono dalla integrità strutturale della membrana cellulare, il NOET può essere un tracciante potenzialmente utile per valutare sia il flusso ematico regionale (immagini precoci), sia la vitalità del miocardio (immagini di redistribuzione).

Tecniche PET: flusso, metabolismo e prognosi

I vantaggi della PET sulla SPECT includono un metodo accettato di correzione della attenuazione, una elevata risoluzione spaziale e immagini con una accresciuta densità di conteggi. I traccianti radioattivi per la PET cardiaca disponibili per l'impiego clinico rientrano in due vaste categorie: quelli che valutano il flusso ematico miocardico e quelli che valutano specifiche vie metaboliche.

Marcando vari composti di interesse fisiologico, è possibile avere validi panorami delle vie biochimiche e del metabolismo tissutale nel miocardio funzionale e disfunzionale. Poiché le stime sia del flusso ematico sia del metabolismo miocardici possono essere ottenute in termini assoluti, oltre alla diagnosi di disfunzione ischemica del ventricolo sinistro, la PET rende possibile monitorare in questi pazienti sia la progressione della malattia sia l'effetto dei vari trattamenti.

Le applicazioni cardiache della PET e dei traccianti radioattivi positroni-emittenti trovano applicazione della valutazione del flusso ematico miocardico e del metabolismo miocardico.

Applicazioni cardiache della PET e traccianti radioattivi positroni-emittenti

FLUSSO EMATICO MIOCARDICO

Rubidio-82	Emivita 75 s, prodotto in generatore dallo Stronzio-82
¹⁵ O-acqua	Emivita 2 min; prodotta dal ciclotrone
¹³ N-ammoniaca	Emivita 10 min; prodotta dal ciclotrone

METABOLISMO MIOCARDICO

¹¹ C-palmitato	Emivita 20 min; prodotta dal ciclotrone
¹¹ C-acetato	Emivita 20 min; prodotta dal ciclotrone
[¹⁸ F]-desossiglucosio	Emivita 110 min; prodotta dal ciclotrone

- *Tecniche PET: Rubidio-82*

Catione positroni-emittente con proprietà biologiche simili a quelle del potassio.

Emette due raggi gamma, ciascuno di 511 keV, con una breve emivita fisica di 75 s.

Trasportato attraverso la membrana sarcolemmatica attraverso il sistema Na⁺/K⁺-ATPase.

La captazione iniziale riflette il flusso ematico miocardico.

La cinetica di captazione della fase di wash-out può essere usata come indice di vitalità.

Il ⁸²Rb è prodotto in generatore, è un catione positroni emittente a emivita breve, con proprietà biologiche simili a quelle del potassio e del ²⁰¹Tl. Analogamente a questi, la captazione intracellulare di ⁸²Rb attraverso la membrana sarcolemmatica riflette il trasporto attivo di cationi da parte del sistema della Na⁺/K⁺-ATPase. Nei pazienti con coronaropatia cronica, la captazione miocardica del ⁸²Rb è conservata nelle aree vitali e gravemente ridotta in quelle cicatriziali. In situazioni di lesione miocardica acuta e di riperfusione, la captazione iniziale del ⁸²Rb riflette il flusso ematico.

- *Tecniche PET: ¹⁵O-acqua*

L'acqua marcata con ¹⁵O è un tracciante liberamente diffusibile che correla strettamente con la perfusione, come valutato mediante microsferi, con una estensione di primo transito vicina all'unità.

- *Tecniche PET: ¹³N-ammoniaca*

L'ammoniaca marcata con ¹³N è il tracciante di perfusione estraibile più comunemente usato nella PET. A pH fisiologico, l'ammoniaca si trova nella sua forma cationica, con una emivita fisica di 10 minuti. La sua distribuzione miocardica è correlata inversamente e in funzione non lineare con il flusso ematico. Sebbene l'esatto meccanismo del suo trasporto attraverso la membrana della cellula muscolare non sia ancora definitivamente chiarito, è stato ipotizzato che l'ammoniaca marcata con ¹³N possa attraversare la membrana cellulare per diffusione passiva o come ione ammonio (¹³NH₄⁺), per mezzo del meccanismo di trasporto attivo sodio potassio, influenzato dal gradiente di concentrazione attraverso la membrana cellulare. Una volta penetrato nel miocita, la ritenzione miocardica dell'ammoniaca marcata coinvolge prevalentemente la sua conversione e quella dell'acido glutammico a ¹³N-glutammina, mediata dall'ATP e dalla glutammina sintetasi.

- *Tecniche PET: ¹¹C-palmitato*

Acquisizione delle immagini a partire dalla iniezione in bolo di 15-20 mCi del tracciante e continua per 40-60 minuti.

Captazione e distribuzione iniziali nel miocardio sono determinate principalmente dal flusso ematico regionale.

Nel citosol, l'¹¹C-palmitato è esterificato a ¹¹C-Acil-CoA con la mediazione della tiochinasi, una reazione che dipende dall'energia e ha come conseguenza l'intrappolamento del tracciante nel miocardio.

In seguito, l' ¹¹C-Acil-CoA o entra nel pool lipidico endogeno come ¹¹C-gliceridi e ¹¹C-fosfolipidi, oppure si trasferisce nei mitocondri (attraverso la navetta della carnitina, dove la rapida degradazione per β-ossidazione dà origine ad anidride carbonica.

Il principio di usare un tracciante metabolico per l'imaging del miocardio si basa sul concetto che i miociti vitali nelle regioni ipoperfuse e disfunzionali sono metabolicamente attivi, mentre il tessuto cicatriziale o fibrotico è metabolicamente inattivo. In condizioni di digiuno e di anaerobiosi, gli acidi grassi a catena lunga sono il combustibile preferenziale nel cuore, in quanto forniscono il 65-70% dell'energia al cuore che lavora, mentre il 15-20% dell'apporto energetico totale deriva dal glucosio.

Nel miocardio normalmente perfuso, la frazione di estrazione dell'¹¹C-palmitato è del 40%.

- *Tecniche PET: ¹¹C-acetato*

La captazione iniziale del tracciante fornisce una stima indiretta del flusso ematico miocardico regionale.

Nel citosol, l'¹¹C-palmitato è convertito direttamente a ¹¹C-Acil-CoA e ossidato nei mitocondri dal ciclo di Krebs degli acidi tricarbossilici a ¹¹C-anidride carbonica e H₂O.

Poiché la velocità di wash-out dell'¹¹C-acetato dal miocardio è direttamente correlata al flusso ossidativo nel ciclo di Krebs, esso rappresenta un indicatore ideale del metabolismo ossidativo miocardico.

L'¹¹C-acetato è un acido grasso a corta catena che è avidamente captato dal miocardio con una estrazione di primo transito del 63% ed è metabolizzato prevalentemente dal metabolismo ossidativo mitocondriale. Una volta penetrato nel citosol, il tracciante è convertito ad acetil-coenzima A (acetil-CoA) e ossidato nei mitocondri a ¹¹C-anidride carbonica e acqua nel ciclo di Krebs degli acidi tricarbossilici. Pertanto, la velocità del wash-out dell'¹¹C-acetato dal miocardio è direttamente in rapporto al flusso ossidativo del ciclo di Krebs.

Dati gli stretti legami tra questo e la fosforilazione ossidativa, il turnover e la clearance miocardici dell'¹¹C-anidride carbonica possono riflettere il metabolismo ossidativo globale e fornire elementi sulla funzione mitocondriale del mitocondrio vitale.

- *Tecniche PET: [¹⁸F]-fluorodeossiglucosio*

Analogo del glucosio che compete con esso per l'esochinasi.

È fosforilato dalla esochinasi a FDG-6-fosfato.

Intrappolato nei miociti, impermeabile al sarcolemma, cattivo substrato per l'ulteriore metabolismo.

Lenta defosforilazione.

La captazione miocardica è influenzata dall'ambiente metabolico e ormonale.

L'FDG è un analogo del glucosio impiegato nell'imaging PET della utilizzazione del glucosio miocardico. Dopo iniezione endovenosa di 5-10 mCi di FDG, questo si scambia rapidamente attraverso i capillari e le membrane cellulari ed è fosforilato dalla esochinasi. Una volta fosforilato, FDG non è ulteriormente metabolizzato nella via glicolitica, nello shunt fruttosio-pentosio o nella glicogenosintesi. Poiché la sua defosforilazione avviene, l'FDG rimane essenzialmente nel miocardio, concedendo un tempo adeguato per l'imaging PET o SPECT della captazione regionale del glucosio.

A2.6 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

Negli ultimi anni, è stata sviluppata una serie di complessi monocationici di formula generale $[^{99m}\text{TcN}(\text{L})(\text{PNP})]^+$ aventi un core azoturo e due diversi leganti bidentati, dove L è un legante monoanionico del tipo ditiocarbammato e PNP, un ligante aminodifosfinico. Tra i diversi complessi $[^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})]^+$ (DBODC= N,N-bis-etossietilditiocarbammato; PNP5=N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]etossietilammina) ha rivelato interessanti caratteristiche farmacocinetiche, vicine a quelle ideali, e pertanto è stato selezionato come potenziale agente di imaging cardiaco. [14][15][16]

Studi di biodistribuzione ex vivo hanno dimostrato che il complesso $[^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})]^+$ è rapidamente estratto dal tessuto cardiaco dove permane per un tempo prolungato. Inoltre, esso presenta una rapida clearance ematica, polmonare ed epatica. In particolare, è interessante notare che la captazione epatica è transitoria e l'eliminazione da questo organo è rapida e quantitativa; infatti, l'attività iniziale è completamente escreta nell'intestino dopo un'ora dall'iniezione (Figura A2.11).

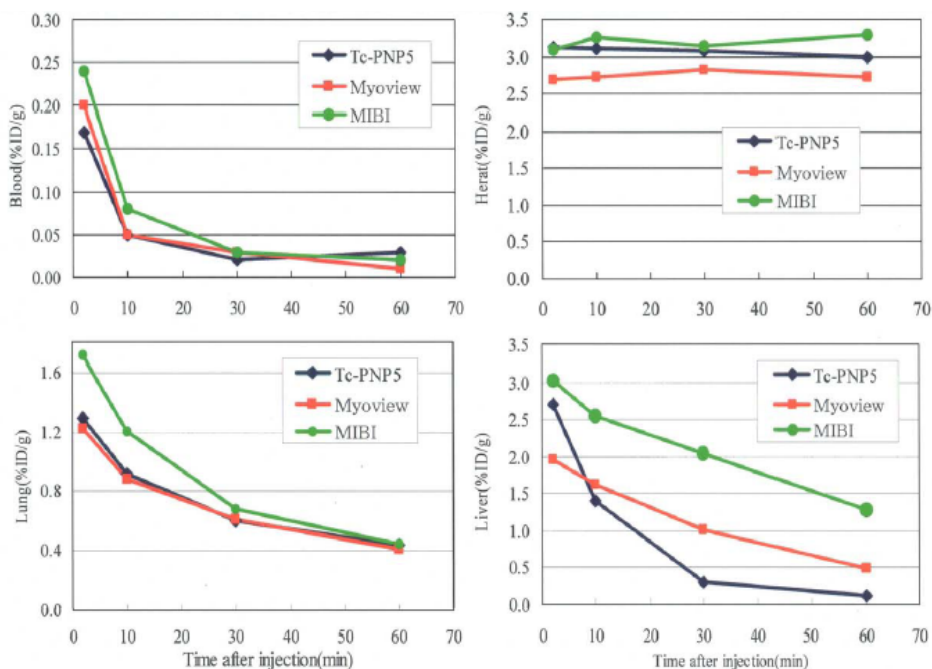


Figura A2.11. Risultati di biodistribuzione in ratti (sangue, cuore, polmoni, fegato)

In Figura A2.11 sono riportate le cinetiche di distribuzione del complesso $[^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})]^+$ nei diversi compartimenti ed esse sono confrontate con quelle dei radiofarmaci attualmente in commercio (^{99m}Tc -Sestamibi e ^{99m}Tc -Tetrofosmin).

In figura A2.12 sono invece raffigurate le curve che descrivono la variazione dei rapporti cuore/polmoni e cuore/fegato in funzione del tempo dei diversi radiofarmaci.

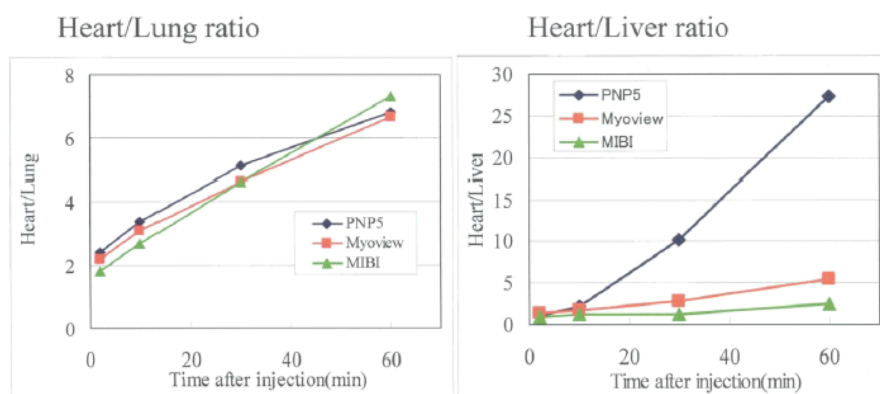


Figura A2.12 Rapporto cuore/polmoni (A) e cuore/fegato (B) in funzione del tempo per ^{99m}Tc -Sestamibi, ^{99m}Tc -Tetrofosmin, [$^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})$] $^{+}$.

Come mostrato dalla Figura 18 il rapporto cuore/polmoni per i tre complessi, non evidenzia particolari differenze ed infatti le curve sono sovrapponibili. Al contrario, nel rapporto cuore/fegato è evidente una significativa variazione a favore di [^{99m}Tc](N)DBODC(5). Tale rapporto aumenta in modo esponenziale nel tempo, divenendo molto elevato nell'intervallo tra 60-120 minuti dopo l'iniezione, come risultato dal confronto con i corrispondenti valori per ^{99m}Tc -Tetrofosmin e ^{99m}Tc -Sestamibi. Queste ottimali caratteristiche farmacocinetiche permettono, a un'ora dall'iniezione, un'ottima visualizzazione dell'intero tessuto cardiaco, in particolar modo della parete infero-apicale.^[17]

Ciò è ben evidenziato nelle immagini seguenti. (Figure A.13).

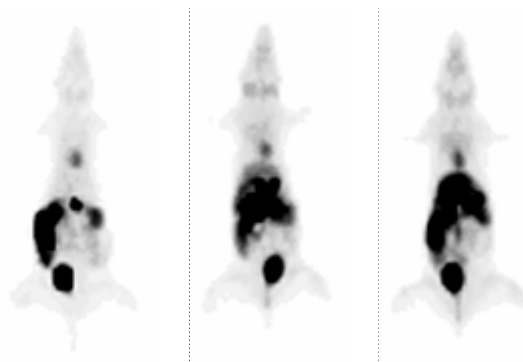


Figura A.13. Immagini planari SPET in vivo di ratti Sprague Dawley, 60 minuti dopo l'iniezione, da sinistra a destra, di: [$^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})$] $^{+}$, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, e [^{99m}Tc]-Sestamibi.

Le diapositive sono ordinate partendo dalla coda del ratto (in alto a sinistra) verso la testa (in basso a destra); l'intensità dei colori è proporzionale ai pixel di attività (espressa come colpi o disintegrazioni per secondo). Mentre per ^{99m}Tc -sestamibi e ^{99m}Tc -tetrofosmin il picco di massima attività è localizzato nella regione addominale, associato all'elevata captazione epatica, per il complesso [$^{99m}\text{TcN}(\text{DBODC})(\text{PNP5})$] $^{+}$ il picco di massima attività è posizionato esattamente nell'area miocardica e l'attività epatica è trascurabile. Di conseguenza si ha una chiara visualizzazione della regione cardiaca, in accordo con i risultati ottenuti dalla biodistribuzione.

Studi di biodistribuzione in modello canino hanno confermato quanto precedentemente osservato in ratti.^[18]

Studi preclinici, condotti su volontari sani, hanno confermato anche nell'uomo il comportamento distributivo di questo nuovo agente. Di seguito sono riportate una serie di immagini planari valutate in condizioni di riposo o dopo stress ergometrico, dopo somministrazione di 10 mCi di tracciante.

In condizioni di riposo, a 5 min p.i. l'uptake cardiaco, polmonare ed epatico è, rispettivamente, di $1,97 \pm 0,37\%$, $1,99 \pm 0,55\%$ e $9,57 \pm 1,82\%$ della dose somministrata. L'attività epatica si riduce rapidamente ($4,26 \pm 1,44\%$ a 60 min p.i; $3,01 \pm 1,02\%$ a 240 min p.i.), mentre l'attività cardiaca si mantiene pressoché costante; solo un leggero washout si osserva a 240 min dalla somministrazione ($1,24 \pm 0,28\%$).

In condizione di stress l'attività cardiaca è significativamente più elevata ($2,25 \pm 0,10\%$), se comparata a quella ottenuta in condizioni di riposo. Durante l'esercizio l'attività nel tessuto scheletrico si presenta aumentata.

In entrambi i casi si ottengono immagini di ottima qualità a partire dai 5 min dopo l'iniezione. Questi dati fanno del [^{99m}TcN(DBODC)(PNP5)]⁺ un promettente agente per l'imaging cardiaco.^[19]

La rapida clearance epatica, inoltre, può ridurre i tempi dei protocolli di imaging, diminuendo i problemi di scatter fotonico che derivano dall'attività epatica e permettendo, quindi, una migliore visualizzazione della parete infero apicale del miocardio.

A3 Parte Sperimentale

A3.1	Materiali e Metodi	53
A3.2	Sintesi di una libreria di leganti ditiocarbammici aliciclici	54
A3.3	Preparazione dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	58
A3.4	Purificazione dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	59
A3.5	Studi di stabilità su $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	60
A3.6	Studi di biodistribuzione <i>ex-vivo</i> su $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$	61

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].

$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$ in soluzione fisiologica è stato ottenuto da un generatore $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ 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 ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ sono stati raccolti con uno spettroscopio Bruker AMX 300, usando tetrametilsilano come riferimento interno per ^1H . I campioni sottoposti ad analisi NMR sono di concentrazione $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 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 $0.22\ \mu\text{m}$ 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 Performance 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 di una libreria di leganti ditiocarbammici aliciclici

I leganti ditiocarbammici sono stati sintetizzati attraverso vie di sintesi che prevedono il trattamento in ambiente alcalino per alcali inorganici forti a bassa temperatura dell'ammina ciclica opportunamente selezionata con disolfuro di carbonio (Pasqualini R., Duatti A., Bellande E., Comazzi V., Brucato V., Hoffschir D., Fagret D., Comet M., *Bis(ditiocarbammato) nitrido technetium-99m radiopharmaceuticals: a class of neutral myocardial imaging agents*, J. Nucl. Med. 35, 334.341). Sono stati valutati quattro paradigmi di sintesi. La scelta del metodo è stata basata su criteri di resa, cinetica di reazione, work-up.

1. Metodo 1

In un pallone a due colli immerso in bagno di ghiaccio, a 1.6 mmoli di ammina ciclica sospesi in 10 ml di acqua distillata sono lentamente aggiunti 1.6 mmoli (1.5 ml) di una soluzione acquosa di sodio idrossido NaOH 1N, seguiti da 1.6 mmoli di disolfuro di carbonio CS₂ (100 µl, 4×25 µl), goccia a goccia. La miscela di reazione è mantenuta in agitazione per 1 h. Si osserva il viraggio da incolore a giallo-arancio. Il solvente è rimosso per evaporazione ed il risultante residuo grezzo è cristallizzato in una miscela etanolo/etere etilico. Si ottengono dei cristalli bianchi corrispondenti al ditiocarbammato corrispondente.

2. Metodo 2

Una soluzione acquosa ottenuta per dissoluzione di 50 mmoli di ammina ciclica in 75 ml di acqua deionizzata è aggiunta ad una soluzione di 50 mmoli di bario idrato (Ba(OH)₂) in 100 ml di acqua deionizzata. Il disolfuro di carbonio (60 mmoli) vi è quindi aggiunto goccia a goccia, mantenendo la miscela di reazione in costante agitazione per 12 h a 40 °C. La soluzione è successivamente concentrata tramite evaporatore rotante a circa un terzo del volume originario ed aggiunta a 500 ml di alcohol etilico assoluto. Si osserva l'immediata formazione di un precipitato corrispondente al sale barico del ditiocarbammato desiderato, che in seguito a filtrazione potrà essere purificato per ridissoluzione in acqua e successiva precipitazione in alcohol etilico.

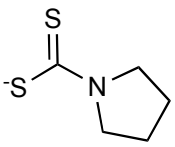
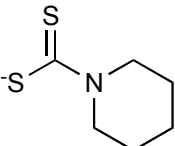
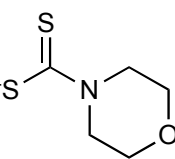
3. Metodo 3

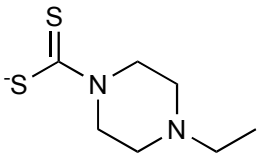
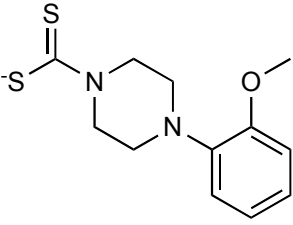
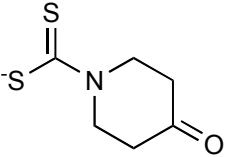
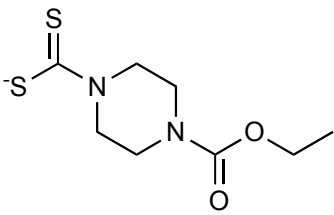
In un pallone a due colli immerso in bagno di ghiaccio, sono disciolte 2.0 mmol di ammina ciclica e 2.0 mmoli di sodio idrossido in 6 ml di alcohol etilico assoluto. Alla soluzione sono aggiunte 2.0 mmoli di disolfuro di carbonio goccia a goccia, mantenendo in agitazione la miscela per 2-3 h, ad una temperatura compresa tra 0 e 5 °C. Da subito si osserva un'intorbidimento della soluzione dovuto alla precipitazione del sale sodico del ditiocarbammato desiderato. Trascorse 3 h dall'aggiunta di CS₂ si tratta la miscela con 40 ml di Etere Etilico, agitando con vigore. Si decanta il solido, mentre il supernatante è eliminato. Il precipitato è lavato con 10 ml di Etere Etilico (2 × 10 ml) ed essiccato a pressione ridotta per una notte.

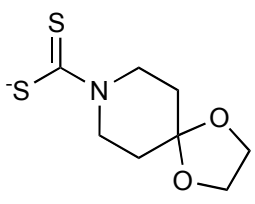
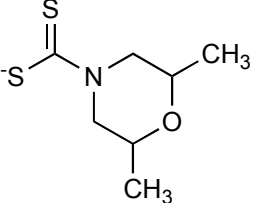
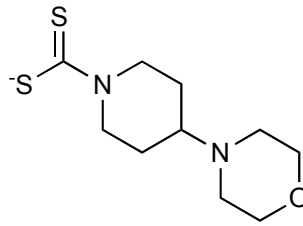
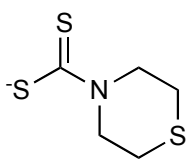
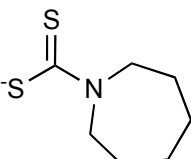
4. Metodo 4

L'ammina ciclica (9 mmoli) e CS₂ (4 ml, in eccesso) sono disciolti in DMSO anidro (35 ml). Alla soluzione così costituita sono aggiunte trifenilfosfina (2.2 g, 9 mmoli) e successivamente diisopropil azadicarbossilato (1,23 ml, 9 mmoli, reagente di Mitsunubo), goccia a goccia. Alla miscela di reazione si aggiunge infine 2-feniletalcol (1 ml, 9 mmoli), mantenendo in costante agitazione per 2.5 ore. Eliminato il solvente organico, il solido grezzo è ripreso con acqua distillata (50 ml) ed il prodotto desiderato è estratto da etile acetato. Le fasi organiche riunite, anidificate con sodio solfato, sono concentrate permettendo di ottenere il ditiocarbammato S-alchilato. (Devdutt Chaturvedi, Suprabhat Ray, *An efficient, one-pot, synthesis of dithiocarbamates from the corresponding alcohols using Mitsunubo's reagent*, Tetrahedron Letters 47 (2006) 1307-1039).

La seguente Tabella riporta la libreria dei ditiocarbammati prodotti. Per ciascuno sono indicati: la formula di struttura, il protocollo sintetico seguito, il peso molecolare della specie anionica, la resa di reazione e la caratterizzazione ESI-MS, ¹H-NMR e ¹³C-NMR.

Struttura e denominazione	Caratterizzazione
 <p>DTC-L₁</p>	<p>Prodotto da Sigma Aldrich</p>
 <p>DTC-L₂</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ PM: 183.27 Resa: 41%</p> <p>Caratterizzazione: analisi elementare per C₆H₁₀NNaS₂ (MW 183.27): C 39.32, H 5.50, N 7.64, S 34.99. Sperimentale: C 40.97, H 6.01, N 7.56, S 35.24. IR (KBr cm⁻¹) 2930 (-CH₂); 2852 (-CH₂); 1449 (CH₂); 1409 (C-N); 1218 (C=S). ¹H NMR (D₂O) δ: 4.19-4.15 (t, 4H, J=5.3 Hz -CH₂CH₂CH₂N-), 1.72-1.65 (m, 4H, -CH₂CH₂-CH₂N-), 1.58-1.64 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂N-). ¹³C NMR (D₂O) δ: 202.2 (C=S), 52.6 (CH₂CH₂CH₂N-), 25.2 (-CH₂CH₂-CHN-), 21.9 (CH₂CH₂CHN-).</p>
 <p>DTC-L₃</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ PM: 185.25 Resa: 48%</p> <p>Caratterizzazione: analisi elementare per C₅H₈NNaOS₂ (MW 185.25): C 32.42, H 4.35, N 7.56, O 8.64, S 34.62. Sperimentale: C 31.97, H 4.58, N 7.06, O 8.94, S 35.24. IR (KBr cm⁻¹) 2930 (-CH₂); 1418 (C-N); 1219 (C=S). ¹H NMR (D₂O) δ: 4.24 (m, 4H, -OCH₂CH₂N-), 3.62 (m, 4H, -OCH₂CH₂N-). ¹³C NMR (D₂O) δ: 212.0 (C=S), 68.91 (-OCH₂-CH₂N-), 54.15 (-OCH₂CH₂N-).</p>

Struttura e denominazione	Caratterizzazione
 <p data-bbox="371 584 459 613">DTC-L4</p>	<p data-bbox="616 304 866 333">Protocollo sintetico: 1</p> <p data-bbox="616 336 759 365">Catione: Na⁺</p> <p data-bbox="616 367 746 396">PM: 212.04</p> <p data-bbox="616 398 738 427">Resa: 60%</p> <p data-bbox="616 430 1356 714">Caratterizzazione: analisi elementare per C₇H₁₃N₂NaS₂ (MW 212.04): C 39.60, H 6.17, N 13.19, S 30.21. Sperimentale: C 40.97, H 7.58, N 13.86, S 30.54. IR (KBr cm⁻¹) 2969(-CH₃); 2818 (-CH₂); 1415 (C-N); 1227 (C=S). ¹H NMR (D₂O) δ: 4.32-4.16 (m, b, 4H, CH₂CH₂N(CS₂)), 2.52 (m, b, 4H (CH₃CH₂)NCH₂CH₂N-), 2.47-2.39 (q, b, 2H, J=7.3 Hz CH₃CH₂N <), 1.05-0.98 (t, 3H, CH₃CH₂N <); ¹³C NMR (D₂O) δ: 202,10 (C=S), 50,91 ((CH₃CH₂)NCH₂CH₂), 50.75 (CH₃CH₂N <), 49.81 (-CH₂-CH₂N(CS₂)), 10.00 (CH₃CH₂N <).</p>
 <p data-bbox="371 1048 459 1077">DTC-L5</p>	<p data-bbox="616 745 866 775">Protocollo sintetico: 1</p> <p data-bbox="616 777 759 806">Catione: Na⁺</p> <p data-bbox="616 808 746 837">PM: 290.05</p> <p data-bbox="616 840 738 869">Resa: 76%</p> <p data-bbox="616 871 1356 1126">Caratterizzazione: analisi elementare per C₁₂H₁₅N₂NaOS₂ (MW 290.05): C 49.63, H 5.21, N 9.65, O 5.51, S 22.08. Sperimentale: C 50.97, H 5.99, N 9.89, O 5.94, S 23.24. IR (KBr cm⁻¹) 1464 (F, C-N); 1236 (F, C=S). ¹H NMR (D₂O) δ: 7.01-6.96 (m, 4H, Ar), 4.37 (m, 4H, CH₂CH₂N(CS₂)), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.95 (m, 4H, CH₂CH₂N-Ar). ¹³C NMR (D₂O) δ: 214,10 (C=S), 155.21, 143.42 (2C, -Ar) 125.35-115.53 (4C, -Ar), 62.03 (2C, CH₂CH₂N(CS₂)), 57.95 (-OCH₃), 53.21 (-CH₂CH₂N-Ar).</p>
 <p data-bbox="371 1361 459 1391">DTC-L15</p>	<p data-bbox="616 1155 866 1184">Protocollo sintetico: 2</p> <p data-bbox="616 1187 759 1216">Catione: Ba²⁺</p> <p data-bbox="616 1218 852 1247">ESI-MS: [M⁻]=174.26</p> <p data-bbox="616 1249 738 1279">Resa: 82%</p> <p data-bbox="616 1281 1356 1413">Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 3.23 (t, 4H, -CH₂-N-CH₂-); 2.21 (t, 4H, -CH₂-CH₂-N-CH₂CH₂-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 214.56 (s, (S₂)CN); 210.288 (s, C=O); 49.168 (s, -CH₂-N-CH₂-); 39.742 (s, -CH₂-(C=O)-CH₂-).</p>
 <p data-bbox="371 1709 459 1738">DTC-L16</p>	<p data-bbox="616 1447 866 1476">Protocollo sintetico: 1</p> <p data-bbox="616 1478 759 1507">Catione: Na⁺</p> <p data-bbox="616 1509 852 1538">ESI-MS: [M⁻]=233.33</p> <p data-bbox="616 1541 738 1570">Resa: 50%</p> <p data-bbox="616 1572 1356 1765">Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 4.13 (t, 2H, -OCH₂CH₃); 3.22 (m, 4H, -CH₂-N-CH₂); 2.9 (m, 4H, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 1.05 (t, -CH₃). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 207.436 (s, (S₂)CN); 177.8 (s, C=O); 62.65 (s, -OCH₂CH₃); 50.974 (s, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 43.255 (s, -CH₂-N-CH₂-); 13.532 (s, -OCH₂CH₃).</p>

Struttura e denominazione	Caratterizzazione
 <p>DTC-L17</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ ESI-MS: [M⁻]=217.7 Resa: 78% Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 3.95 (s, 4H, -OCH₂CH₂O-); 4.35 (m, 4H, -CH₂-N-CH₂); 1.75 (m, 4H, -CH₂-C-CH₂-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 208.661 (s, (S₂)C_N); 107.504 (s, O-C-O); 64.471 (s, -OCH₂CH₂O-); 49.413 (s, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 34.093 (s, -CH₂-C-CH₂-).</p>
 <p>DTC-L19</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ ESI-MS: [M⁻]=190.30 Resa: 73% Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 2.7, 3.7 (m, 4H, -CH₂-N-CH₂); 4.1, 4.35, 5.5 (m, 2H, CH(CH₃)O CH(CH₃)); 1.15 (2 s, 6H, -CH₃-C-CH₃-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 210.025, 209.130 (s, (S₂)C_N); 72.401, 67.720 (s, C-O-C); 56.415, 55.744 (s, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 17.834, 16.857 (s, -CH₃-C-CH₃-).</p>
 <p>DTC-L20</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ ESI-MS: [M⁻]=245.30 Resa: 80% Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 3.85 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂); 2.75 (m, 4H, -CH₂-N-CH₂); 5.7 (m, 1H, CH-N); 3.2 (m, 4H, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 2.05, 1.6 (m, 4H, -CH₂-CH₂-N(CS₂)-CH₂-CH₂-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 207.117 (s, (S₂)C_N); 66.641 (s, C-O-C); 61.386 (s, C-N); 50.807 (s, -CH₂-N-CH₂-); 49.307 (s, -CH₂-N(CS₂)-CH₂-); 27.729 (s, -CH₂-CH₂-N(CS₂)-CH₂-CH₂-).</p>
 <p>DTC-L21</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ ESI-MS: [M⁻]=178.98 Resa: 66% Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 4.6 (m, 4H, -CH₂NCH₂-); 2.7 (m, 4H, -CH₂SCH₂-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 209.09 (s, (S₂)C_N); 54.13 (s, H₂C-N-CH₂); 27.07 (s, -CH₂-S-CH₂-).</p>
 <p>DTC-L22</p>	<p>Protocollo sintetico: 1 Catione: Na⁺ ESI-MS: [M⁻]=174.02 Resa: 47% Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 4.15 (t, 4H, -CH₂-N-CH₂-); 1.8 (m, 4H, -N-CH₂CH₂-CH₂CH₂-CH₂CH₂-N-); 1.55 (m, 4H -N-CH₂CH₂-CH₂CH₂-CH₂CH₂-N-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 206.68 (s, (S₂)C_N); 55.75 (s, H₂C-N-CH₂); 26.81 (s, -N-CH₂CH₂-CH₂CH₂-CH₂CH₂-N-); 26.359 (s, -N-CH₂CH₂-CH₂CH₂-CH₂CH₂-N-).</p>

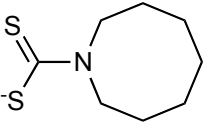
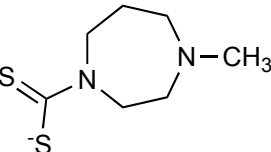
Struttura e denominazione	Caratterizzazione
 <p data-bbox="367 510 462 542">DTC-L₂₃</p>	<p data-bbox="614 302 869 331">Protocollo sintetico: 1</p> <p data-bbox="614 336 758 365">Catione: Na⁺</p> <p data-bbox="614 369 853 398">ESI-MS: [M⁻]=188.05</p> <p data-bbox="614 403 742 432">Resa: 75%</p> <p data-bbox="614 436 1356 593">Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 4.10 (t, 4H, -CH₂-N-CH₂-); 1.85 (m, 4H, -CH₂-CH₂-N-CH₂CH₂-); 1.5 (m, 6H). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 207.08 (s, (S₂)CN); 56.34 (s, H₂C-N-CH₂); 26.82 (s, -N-CH₂CH₂CH₂CH₂-); 26.25 (s, 2C -N-CH₂CH₂CH₂CH₂-); 25.09 (s, 2C, -N-CH₂CH₂CH₂CH₂-).</p>
 <p data-bbox="367 907 462 938">DTC-L₂₄</p>	<p data-bbox="614 616 869 645">Protocollo sintetico: 1</p> <p data-bbox="614 649 758 678">Catione: Na⁺</p> <p data-bbox="614 683 853 712">ESI-MS: [M⁻]=189.05</p> <p data-bbox="614 716 742 745">Resa: 64%</p> <p data-bbox="614 750 1356 1030">Caratterizzazione: ¹H-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 2.05 (m, 2H, -N-CH₂CH₂CH₂-N(CH₃)-); 2.45 (s, 3H, -CH₃); 2.75 (m, 2H, (S₂)CN-CH₂CH₂-N(CH₃)-); 2.9 (m, 2H, (S₂)CN-CH₂CH₂-N(CH₃)-); 4.2 (m, 2H, -N-CH₂CH₂CH₂-N(CH₃)-); 4.35 (m, 2H, -N-CH₂CH₂CH₂-N(CH₃)-). ¹³C-NMR, 300 MHz, (D₂O): δ (ppm) = 209.16 (s, S₂CN-); 45.00 (s, -CH₃); 25.73 (s, -N-CH₂CH₂CH₂-N(CH₃)-); 52.91 (s, -N-CH₂CH₂CH₂-N(CH₃)-); 53.68 (s, (S₂)CN-CH₂CH₂-N(CH₃)-); 55.89 (s, (S₂)CN-CH₂CH₂-N(CH₃)-); 56.20 (s, (S₂)CN-CH₂CH₂-N(CH₃)-)</p>

Tabella A3.1. Libreria dei leganti ditiocarbammici DTC-L_n sintetizzati e caratterizzati.

A3.3 Preparazione dei complessi [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺ [71]

Alcuni dei leganti ditiocarbammici, sintetizzati come descritto nella sezione precedente (Tabella A3.1), sono stati utilizzati con i leganti amminodifosfinici PNP₃, 5, 7, 10, nella formazione di eterocomplessi dissimetrici del tipo [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺, applicando le strategie sintetiche di seguito riportate.

- Reazione a *due steps*.

In un vial contenente 5.0 mg di succinil diidrazide (SDH), 5 mg di acido etilendiammino tetraacetico (EDTA), 0.650 ml di Soluzione Fisiologica 0.9% NaCl, 0.10 mg SnCl₂ sospesi in 0.10 ml di Soluzione Fisiologica, sono aggiunti 0.250 ml di Na[^{99m}TcO₄] (50.0 MBq – 3.0 GBq). La miscela è mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente, alla miscela di [^{99m}Tc(N)]²⁺_{mix} intermedi, sono aggiunti 1.0 mg di PNP_x sospeso in 0.5 ml di una soluzione ottenuta disciogliendo 2.0 mg di γ-ciclodestrina in 1.0 ml di Soluzione Fisiologica e 2.0 mg di legante ditiocarbammico DTC-L_n sciolto in 0.2 ml di Soluzione Fisiologica. Le introduzioni dei leganti PNP_x e DTC-L_n sono precedute e seguite dall'aggiunta di 0.050 ml di NaOH 1N. La miscela è quindi incubata a 100 °C per 30 minuti. Un pH finale compreso tra 8.0 e 9.0 è richiesto. La resa radiochimica (RCY) del complesso finale è valutata per via cromatografica mediante TLC ed HPLC (Tabella A4.1).

- Reazione a *one pot*.

In un vial contenente 5.0 mg di succinil diidrazide (SDH), 5 mg di acido etilendiammino tetraacetico (EDTA), 0.650 ml di Soluzione Fisiologica 0.9% NaCl, 0.10 mg SnCl₂ sospesi in 0.10 ml di Soluzione Fisiologica, si aggiungono in rapida successione 0.250 ml di

Na[^{99m}TcO₄] (50.0 MBq – 3.0 GBq), 1.0 mg di PNP_x sospeso in 0.5 ml di una soluzione ottenuta disciogliendo 2.0 mg di γ -ciclodestrina in 1.0 ml di Soluzione Fisiologica e 2.0 mg di legante ditiocarbammico DTC-L_n sciolto in 0.2 ml di Soluzione Fisiologica. Le introduzioni dei leganti PNP_x e DTC-L_n sono precedute e seguite dall'aggiunta di 0.050 ml di NaOH 1N. La miscela è quindi incubata a 100 °C per 30 minuti. Un pH finale compreso tra 8.0 e 9.0 è richiesto. La resa radiochimica (RCY) del complesso finale è valutata per via cromatografica mediante TLC ed HPLC (Tabella A4.1).

I complessi dissimmetrici del tipo [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺ preparati con i leganti sopra indicati sono stati analizzati per via cromatografica TLC e HPLC, al fine di determinarne la resa radiochimica (RCY) e la purezza radiochimica (RCP), negli studi di stabilità.

Le analisi TLC sono condotte utilizzando C18 F_{254S} (Merck®, Milano, Italia) come fase stazionaria ed una miscela MeOH/MeCN/THF/NH₄Ac 0.5M in rapporti 3/3/2/2 come fase mobile. Alternativamente, SiO₂ F254 (Merck®, Milano, Italia) come fase stazionaria ed una miscela EtOH/CHCl₃/Toluene/NH₄Ac 0.5M in rapporti 5/3/3/0.5 come fase mobile. L'attività sulle lastre è rivelata e misurata utilizzando uno scanner Cyclone® Instrument, equipaggiato con schermi *phosphorus imaging* e *software* di analisi OptiQuant Image (Packard®, Meridian, CT).

Le analisi HPLC sono condotte utilizzando uno strumento Beckman System Gold, equipaggiato con un sistema di pompe Model 126, valvola di iniezione 210A, detector UV Module 166 e detector radioattivo Model B-FC-3200 Bioscan. Loop da 100 μ l. Le analisi sono condotte impiegando una precolonna a fase inversa Vydac (5 μ m, 4.6 × 45 mm) ed una colonna a fase inversa Vydac 218TP C18 (5 μ m, 250 mm × 4.6 mm).

A3.4 Purificazione dei complessi [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺

Prima degli studi in vitro ed in vivo, allo scopo di eliminare l'influenza di eventuali impurezze, i complessi sono purificati come segue:

- *Metodo A.* Una cartuccia SEP PAK C18 (Waters®) è condizionata con alcohol etilico (5 ml) e con acqua deionizzata (5 ml). La miscela di reazione contenente il complesso [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺ è diluita con acqua deionizzata (10 ml) e caricata sulla SEP PAK C-18: circa il 90% dell'attività iniziale è trattenuto dalla resina. La colonna è quindi lavata in successione con 20 ml di acqua deionizzata e 5 ml di una soluzione al 35% in EtOH. Il complesso (per il 90% dell'attività caricata), è eluito con 1 ml di una miscela 90:10 di EtOH:Soluzione Fisiologica (0.9% NaCl). Dopo purificazione, la purezza radiochimica (RCP) dei complessi è > 95%.
- *Metodo B.* Una cartuccia SEP PAK CM (Waters®), contenente una resina a scambio cationico, è condizionata con 10 ml di acqua deionizzata. La miscela di reazione contenente il complesso [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺ è diluita in 10 ml di acqua deionizzata e caricata sulla SEP PAK CM: il 60-90% dell'attività iniziale è trattenuta dalla resina. La colonna è quindi lavata in successione con 20 ml di acqua deionizzata e con 5 ml di una soluzione al 70% di EtOH. Il complesso (per il 90% dell'attività caricata), è eluito con 1 ml di una miscela 90:10 di EtOH:Soluzione Fisiologica (0.9% NaCl). Dopo purificazione, la purezza radiochimica (RCP) dei complessi è > 95%.
- *Metodo C.* Prevede l'utilizzo in serie del metodo A e B sopra descritti.

A3.5 Studi di stabilità su $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$

La stabilità dei complessi monocationici $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ è valutata incubando a 37 °C per 24 h 100 µl della soluzione del complesso purificato con 900 µl dei seguenti media:

- soluzione fisiologica;
- tampone fosfato 0.2 M, pH 7,4;
- omogenato di fegato di ratto;
- siero di ratto;
- 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 (100 µL), opportunamente diluite con 900 µL di tampone fosfato (0.02 M, pH 7.4), sono analizzate direttamente via HPLC. Condizioni di eluizione: Le analisi HPLC sono condotte utilizzando uno strumento Beckman System Gold, equipaggiato con un sistema di pompe Model 126, valvola di iniezione 210A, detector UV Module 166 e detector radioattivo Model B-FC-3200 Bioscan. Loop da 100 µl. Le analisi sono condotte impiegando una precolonna a fase inversa Vydac (5µm, 4.6 × 45 mm) ed una colonna a fase inversa Vydac 218TP C18 (5µm, 250 mm × 4.6 mm).

Il campione derivato dall'omogenato di fegato di ratto 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 H₂O, 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.

Studi di transchelazione con L-cisteina e Glutazione.

Gli studi di stabilità cinetica dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ 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), H₂O (100 µl) e 50 µl di L-cisteina solubilizzata in H₂O 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 purezza radiochimica (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* su [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺

Studi di biodistribuzione dei complessi [^{99m}Tc(N)(PNP_x)(DTC-L_n)]⁺ sono stati eseguiti sui prodotti purificati ed opportunamente diluiti con soluzione fisiologica.

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

0.1 ml (contenenti 10 μCi) della soluzione contenente il complesso marcato e purificato sono inoculati nell'animale attraverso la vena giugulare, chirurgicamente esposta.

Gruppi di animali (n=3) sono sacrificati a tempi diversi. Immediatamente, dopo il sacrificio, sono prelevati un campione di sangue dalla cavità toracica 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 (%ID·g⁻¹), sono ottenuti dall'applicazione della formula seguente, nella quale si tiene conto della dose realmente iniettata:

$$\%ID \cdot g^{-1} = \frac{cpm_{Organo}}{cpm_{attività-iniettata}} \cdot \frac{1}{g_{campione}} \cdot 100$$

I risultati ottenuti per i nuovi eterocomplessi sono raccolti nelle Tabelle del capitolo A4 di discussione dei risultati.

A4 Risultati e discussione

Complessi di nitrato tecnezio $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_X)(\text{DTC-L}_n)]^+$ ($X=3, 5, 7, 10$) sono stati preparati in alta resa seguendo due diverse strategie sintetiche.

Il primo metodo consiste in una reazione a due passaggi. Nel primo di questi, che avviene a temperatura ambiente, SnCl_2 , agente riducente, e succinildiidrazide, SDH, donatore di gruppi nitrato, convertono $[^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ in una miscela di complessi contenenti il core $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$. 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 è convertita nell'eterocomplesso finale a seguito dell'aggiunta in rapida successione dei due leganti polidentati. Un pH finale, raggiunto con 100 μl di NaOH 1N, compreso tra 8.0 e 9.0 è richiesto. La reazione giunge a completezza dopo 30 minuti di riscaldamento a 100 °C.

La presenza dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) ha la funzione di sottrarre per complessazione gli ioni $\text{Sn}(\text{II})$ rimuovendone l'eccesso dall'ambiente di reazione, senza però ridurne il potenziale riducente. In questo modo è mantenuta l'integrità del legante DTC- L_n che potrebbe reagire con $\text{Sn}(\text{II})$ a formare complessi neutri del tipo $[\text{Sn}(\text{DTC-L}_n)_2]$.

Il secondo metodo di sintesi, che avviene in un unico passaggio (*one pot*), prevede l'aggiunta di $[^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$, PNP_X e DTC- L_n in rapida successione alla miscela di reazione contenente l'agente riducente, $\text{Sn}(\text{II})$, il donatore del gruppo nitrato, SDH, ed il complessante per gli ioni Sn^{2+} , EDTA. La miscela viene quindi incubata per 30 minuti di riscaldamento a 100 °C. Un pH finale, raggiunto con 100 μl di NaOH 1N, compreso tra 8.0 e 9.0 è richiesto.

Per entrambi i metodi, il legante bidentato PNP_X è stato aggiunto sospeso in una soluzione realizzata disciogliendo 2 mg di γ -ciclodestrina in 1 ml di Soluzione Fisiologica. Questa scelta assicura l'assenza di solventi organici, da impiegare come agenti solubilizzanti del legante difosfinammidico, ottenendo quindi un kit di marcatura in cui tutti i componenti sono disciolti in Soluzione Fisiologica.

Dei complessi monocationici, ottenuti con i due metodi, si sono valutate la resa radiochimica (RCY) e le proprietà cromatografiche tramite TLC ed HPLC (Tabella A4.1).

Tali studi hanno evidenziato come i complessi desiderati $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP}_X)(\text{DTC-L}_n)]^+$ ($X=3, 5, 7, 10$) si ottengano, 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ è seguita istantaneamente dalla sua coordinazione da parte del legante amminodifosfinico nella formazione del frammento metallico reattivo $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP}_X)]^{2+}$.

PNP riveste dunque un ruolo essenziale nella stabilizzazione del core nitrato, 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 (doppio 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$

verso specie nucleofile come i ditiocarbammati oggetto di questa valutazione.

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 delle specie disostituite "simmetriche" $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTC-L}_n)_2]$ non si è mai ottenuta nelle condizioni di reazione sopra riportate ed è possibile solo quando DTC-L_n è eventualmente 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.

Complesso	R _F		R _t , [min]	RCY, %	LogP
	C18	SiO ₂			
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_1)]^+$	0.50	0.58	11.24 ^a	95.5	2.51
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_2)]^+$	0.52	0.54	11.73 ^a	95.3	3.09
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_2)]^+$	0.48	0.52	14.82 ^a	92.7	3.20
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{DTC-L}_2)]^+$	0.44	0.62	11.87 ^a	75.1	2.25
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_3)]^+$	0.65	0.41	7.89 ^a	95.8	2.29
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_4)]^+$	0.31	0.44	10.93 ^a	94.5	2.71
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_5)]^+$	0.41	0.57	17.33 ^a	95.9	3.47
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_{17})]^+$	0.20	0.30	11.40 ^a	95.0	2.40
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{17})]^+$	0.61	0.73	21.15 ^b	89.5	1.61
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP7})(\text{DTC-L}_{17})]^+$	0.46	0.53	12.66 ^a	71	2.11
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{DTC-L}_{17})]^+$	0.46	0.53	10.88 ^a	72	2.11
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{19})]^+$	0.3	0.72	21.2 ^b 22.0 ^b	24.7 61.8	0.81
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{20})]^+$	0.3	0.65	12.8 ^b 13.4 ^b	38.9 51.6	0.24
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{21})]^+$	0.3	0.74	21.2 ^b	91.2	0.25
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{22})]^+$	0.4	0.91	23.18 ^b	97.29	1.92
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{23})]^+$	0.3	0.92	24.21 ^b	99.39	1.94
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{24})]^+$	0.2	0.43	12.6 ^b	89.73	0.97

Tabella A4.1. Valori cromatografici TLC e HPLC. **HPLC a:** tampone fosfato 0.02 M a pH 7.4. Solvent B) MeOH (20: 80). Flow rate of 1 mL/min for 30 min. b A) NH₄Ac 0.05 M. B) CH₃CN. Gradient: 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 min B 20%. Flow rate of 1 mL/min. c A) 0.1%TFA H₂O at pH 3.0. B) 0.1% TFA MeCN. Gradient: 0 min B 50%; 0-8 min B 100%; 8-20 min B 100%. Flow rate of 0.9 mL/min. **HPLC b:** Eluenti: **A** (H₂O, 0.1% TFA), **B** (MeCN, 0.1% TFA). Gradiente: 0-2 min, B=20%; 2-30 min B=80%; 30-33 min, B=80%; 33-34 min, B=20%; 34-35 min, B=20%. **TLC:** per C18 l'eluente scelto è composto da MeOH/MeCN/THF/NH₄Ac 0.5M in rapporti 3/3/2/2, mentre per SiO₂ è EtOH/CHCl₃/Toluene/NH₄Ac 0.5M in rapporti 5/3/3/0.5;

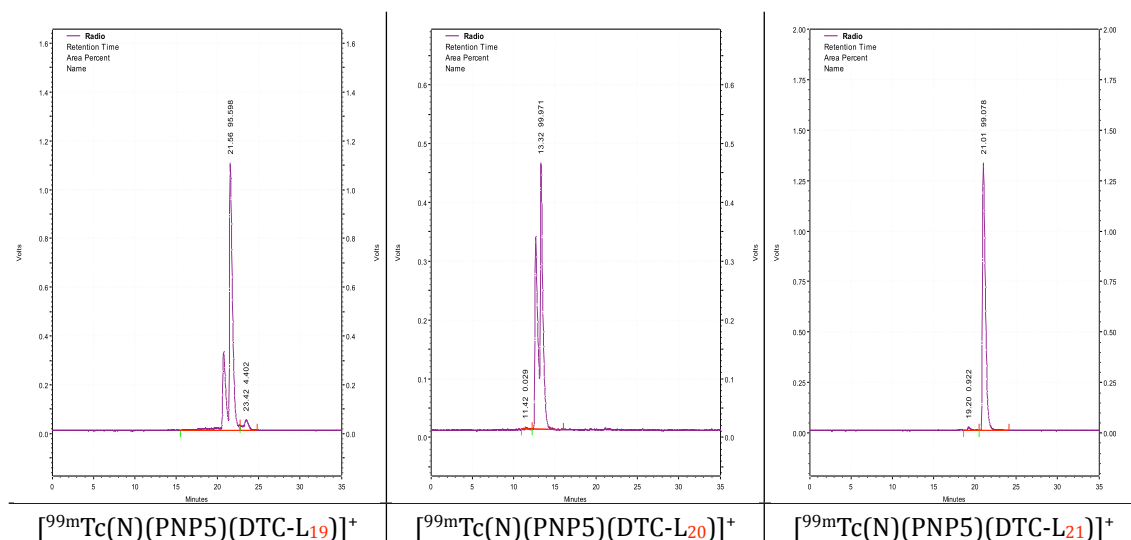


Figura A4.1. Traccianti HPLC di tre dei complessi in esame. Si noti l'elevata resa e purezza.

I complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$, analizzati in soluzione fisiologica e in tampone fosfato 0.2 M, pH 7,4, risultano stabili.

I traccianti 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.

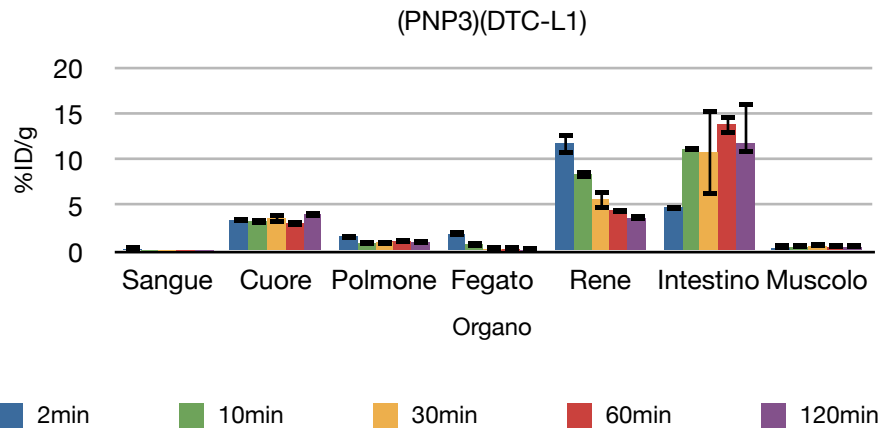
Questi complessi presentano quindi una grande stabilità termodinamica e una grande inerzia chimica.

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 A3.4, permette di ottenere il complesso puro in soluzione fisiologica, rispondente ai criteri per l'iniettabilità.

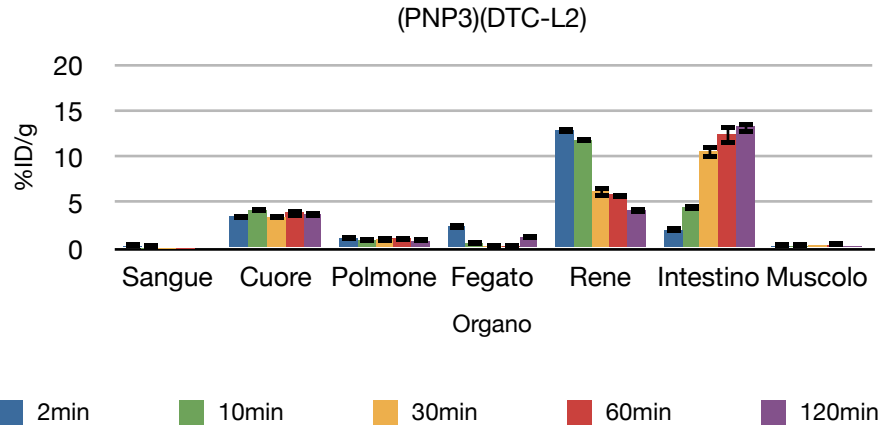
La purezza radiochimica e la stabilità dei radiocomposti sono state verificate mediante HPLC prima della somministrazione in vivo e nelle 24 h successive all'iniezione, al fine di garantire una purezza del composto marcato iniettato superiore al 90%.

I risultati biodistributivi ottenuti per i complessi $[^{99m}\text{Tc}^V(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ ($X=3, 5, 7, 10$) sono riportati nelle Tabelle successive. Per alcuni complessi, il dato tabulare trova una più ampia possibilità di essere apprezzato attraverso la visualizzazione grafica dell'andamento cinetico della percentuale della dose iniettata per grammo di organo considerato.



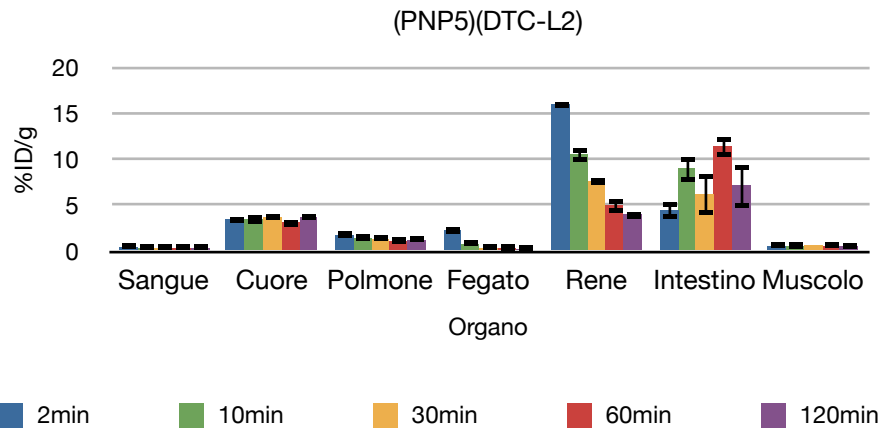
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.20 ± 0.02	0.08 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00
Cuore	3.36 ± 0.15	3.27 ± 0.37	3.53 ± 0.59	3.02 ± 0.32	4.00 ± 0.51					
Polmone	1.62 ± 0.36	0.82 ± 0.09	0.99 ± 0.26	1.06 ± 0.10	0.91 ± 0.00					
Fegato	1.81 ± 0.06	0.75 ± 0.18	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.02					
Rene	11.68 ± 1.21	8.38 ± 0.47	5.62 ± 1.07	4.45 ± 0.27	3.62 ± 0.34					
Intestino	4.77 ± 0.25	11.11 ± 0.21	10.76 ± 4.71	13.81 ± 1.14	11.76 ± 4.46					
Muscolo	0.35 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.53 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.01					
Urine	±	50.94 ±	43.59 ± 0.83	22.93 ± 1.66	25.22 ± 1.05					

Tabella A4.2. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_1)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



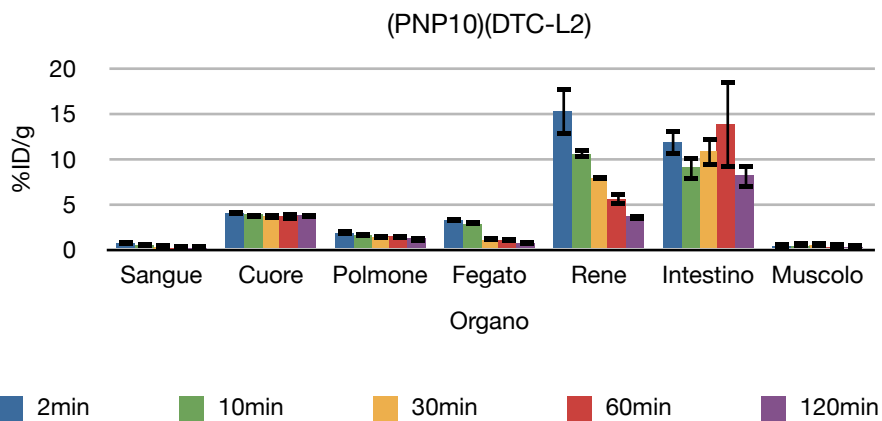
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.21 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00
Cuore	3.49 ± 0.36	4.16 ± 0.32	3.40 ± 0.13	3.87 ± 0.55	3.67 ± 0.30					
Polmone	1.06 ± 0.08	0.87 ± 0.12	0.97 ± 0.15	1.04 ± 0.35	0.79 ± 0.05					
Fegato	2.39 ± 0.32	0.54 ± 0.09	0.23 ± 0.12	0.18 ± 0.05	1.13 ± 0.05					
Rene	12.81 ± 0.29	11.74 ± 0.15	6.19 ± 0.66	5.81 ± 0.28	4.07 ± 0.11					
Intestino	1.99 ± 0.11	4.48 ± 0.21	10.56 ± 0.80	12.36 ± 1.10	13.20 ± 0.71					
Muscolo	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.25 ± 0.00					
Urine	±	46.84 ±	22.04 ± 0.58	9.82 ± 1.19	9.29 ± 0.73					

Tabella A4.3. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_2)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



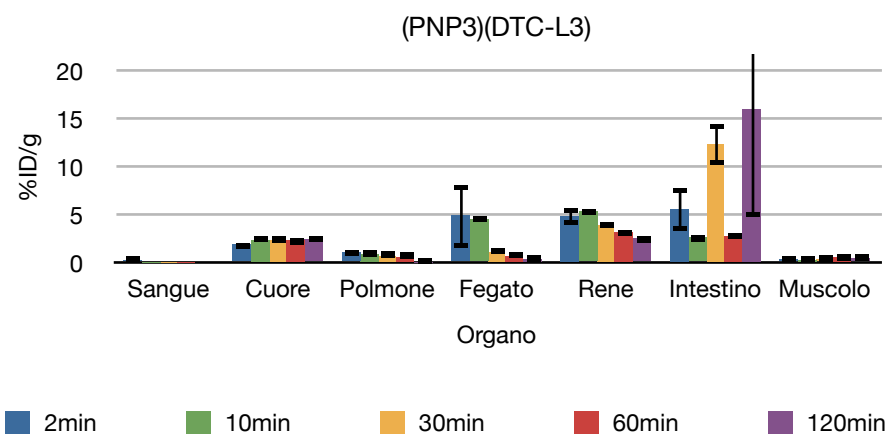
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.45 ± 0.03		0.36 ± 0.06		0.34 ± 0.06		0.28 ± 0.01		0.27 ± 0.02	
Cuore	3.45 ± 0.25		3.49 ± 0.46		3.67 ± 0.11		3.10 ± 0.39		3.64 ± 0.13	
Polmone	1.70 ± 0.04		1.40 ± 0.09		1.33 ± 0.04		1.04 ± 0.04		1.18 ± 0.02	
Fegato	2.28 ± 0.33		0.76 ± 0.04		0.33 ± 0.03		0.26 ± 0.02		0.17 ± 0.04	
Rene	15.99 ± 0.39		10.51 ± 0.79		7.56 ± 0.17		5.02 ± 0.83		3.97 ± 0.41	
Intestino	4.46 ± 0.89		8.97 ± 1.44		6.20 ± 2.26		11.35 ± 1.10		7.12 ± 2.45	
Muscolo	0.53 ± 0.03		0.53 ± 0.07		0.64 ± 0.00		0.54 ± 0.07		0.51 ± 0.10	
Urine			27.89 ± 5.00		53.83 ± 3.40		31.72 ± 6.28		25.6 ± 6.37	

Tabella A4.4. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_2)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



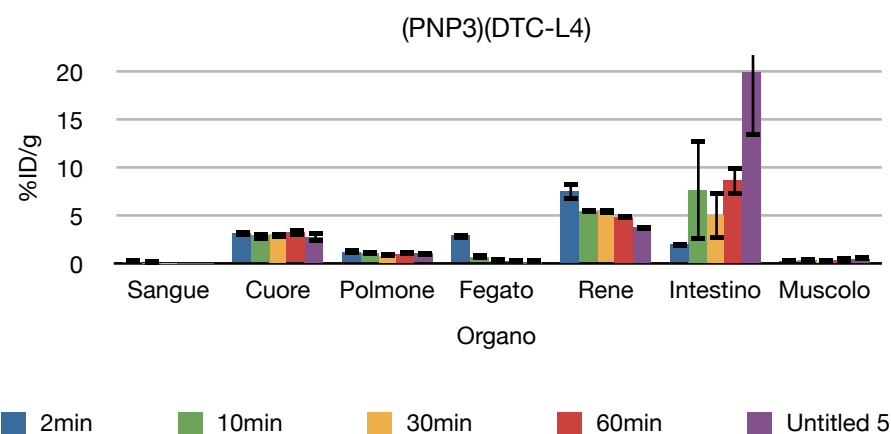
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.64 ± 0.13		0.37 ± 0.06		0.13 ± 0.01		0.04 ± 0.01		0.02 ± 0.01	
Cuore	3.98 ± 0.34		3.79 ± 0.44		3.58 ± 0.32		3.63 ± 0.46		3.73 ± 0.26	
Polmone	1.72 ± 0.06		1.48 ± 0.09		1.30 ± 0.14		1.40 ± 0.27		1.15 ± 0.27	
Fegato	3.21 ± 0.32		2.76 ± 0.04		0.98 ± 0.01		0.99 ± 0.17		0.69 ± 0.17	
Rene	15.25 ± 2.77		10.51 ± 0.59		7.82 ± 0.30		5.54 ± 0.77		3.57 ± 0.40	
Intestino	11.83 ± 1.56		8.97 ± 1.44		10.83 ± 1.75		13.74 ± 4.88		8.12 ± 1.45	
Muscolo	0.31 ± 0.10		0.34 ± 0.02		0.37 ± 0.05		0.23 ± 0.02		0.16 ± 0.04	
Urine			27.89 ± 5.00		24.00 ± 0.05		36.54 ± 3.90		39.54 ± 5.90	

Tabella A4.5. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{DTC-L}_2)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



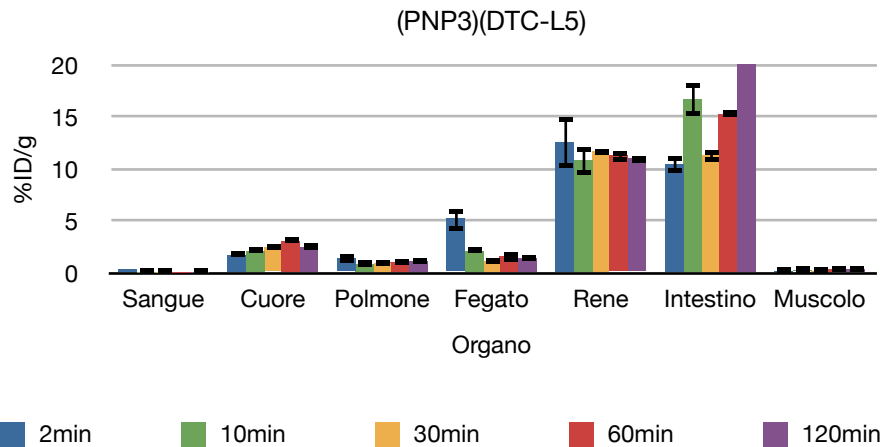
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.22 ±	0.01	0.06 ±	0.00	0.02 ±	0.00	0.01 ±	0.00	0.00 ±	0.00
Cuore	1.89 ±	0.41	2.38 ±	0.04	2.33 ±	0.05	2.34 ±	0.40	2.40 ±	0.08
Polmone	1.06 ±	0.18	0.87 ±	0.05	0.72 ±	0.02	0.61 ±	0.02	0.10 ±	0.06
Fegato	4.89 ±	3.29	4.51 ±	0.08	1.13 ±	0.07	0.66 ±	0.03	0.35 ±	0.07
Rene	4.85 ±	0.84	5.34 ±	0.23	3.89 ±	0.08	3.18 ±	0.26	2.50 ±	0.23
Intestino	5.58 ±	2.26	2.60 ±	0.38	12.35 ±	2.12	2.79 ±	0.13	15.97 ±	11.12
Muscolo	0.32 ±	0.10	0.26 ±	0.02	0.31 ±	0.01	0.59 ±	0.18	0.42 ±	0.04
Urine	±		79.30 ±		42.42 ±	13.64	38.84 ±	14.12	15.71 ±	4.15

Tabella A4.6. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_3)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



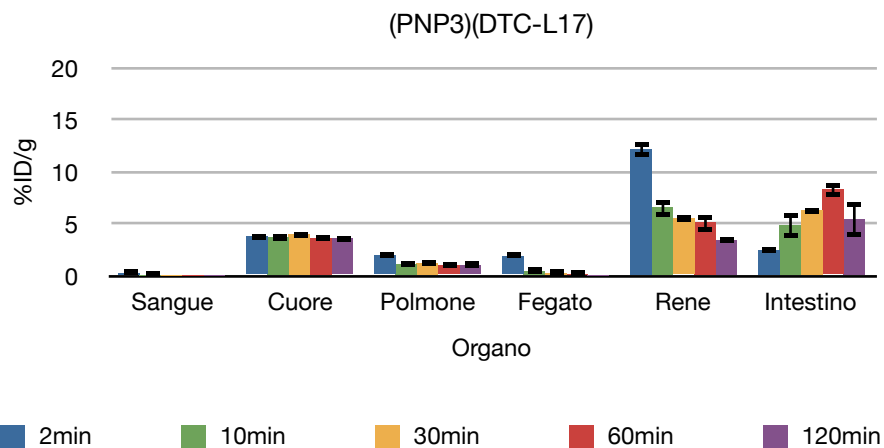
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.16 ±	0.04	0.03 ±	0.02	0.01 ±	0.00	0.02 ±	0.00	0.01 ±	0.00
Cuore	3.15 ±	0.31	2.93 ±	0.53	3.06 ±	0.26	3.25 ±	0.46	2.79 ±	0.59
Polmone	1.16 ±	0.03	1.06 ±	0.13	0.77 ±	0.03	1.01 ±	0.04	1.03 ±	0.19
Fegato	2.91 ±	0.24	0.64 ±	0.05	0.24 ±	0.05	0.21 ±	0.06	0.13 ±	0.03
Rene	7.54 ±	1.00	5.41 ±	0.07	5.5 ±	0.34	4.85 ±	0.17	3.79 ±	0.36
Intestino	2.01 ±	0.19	7.66 ±	5.30	5.07 ±	2.52	8.68 ±	1.63	27.86 ±	14.59
Muscolo	0.19 ±	0.03	0.32 ±	0.06	0.16 ±	0.02	0.35 ±	0.05	0.50 ±	0.09
Urine	±		46.84 ±		22.04 ±	0.58	9.82 ±	1.19	9.29 ±	0.73

Tabella A4.7. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_4)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).



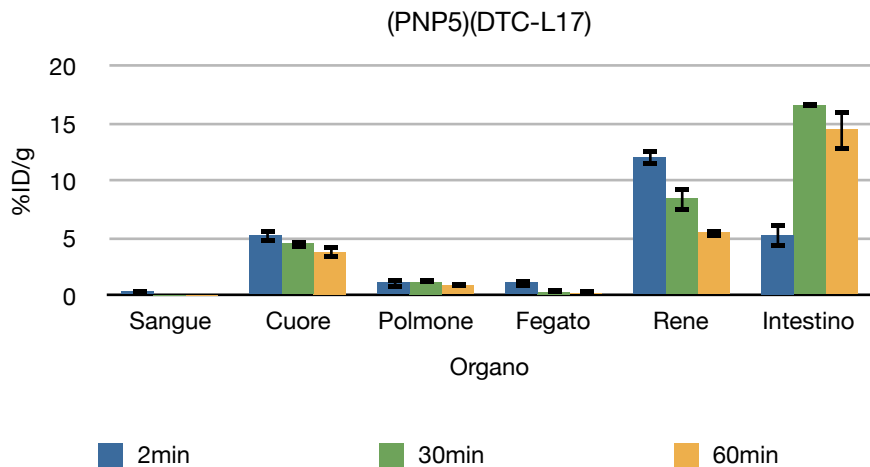
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.35 ±	0.00	0.07 ±	0.01	0.05 ±	0.01	0.03 ±	0.00	0.03 ±	0.01
Cuore	1.74 ±	0.06	2.09 ±	0.05	2.43 ±	0.08	3.07 ±	0.08	2.49 ±	0.10
Polmone	1.37 ±	0.43	0.86 ±	0.09	0.90 ±	0.09	1.01 ±	0.11	1.17 ±	0.31
Fegato	5.21 ±	1.14	2.13 ±	0.08	1.09 ±	0.10	1.62 ±	0.49	1.43 ±	0.11
Rene	12.60 ±	2.50	10.81 ±	1.36	11.71 ±	0.25	11.27 ±	0.60	10.98 ±	0.36
Intestino	10.43 ±	0.79	16.74 ±	1.61	11.34 ±	0.64	15.27 ±	0.10	41.30 ±	6.67
Muscolo	0.15 ±	0.01	0.21 ±	0.01	0.17 ±	0.02	0.37 ±	0.14	0.37 ±	0.11

Tabella A4.8. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_5)]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



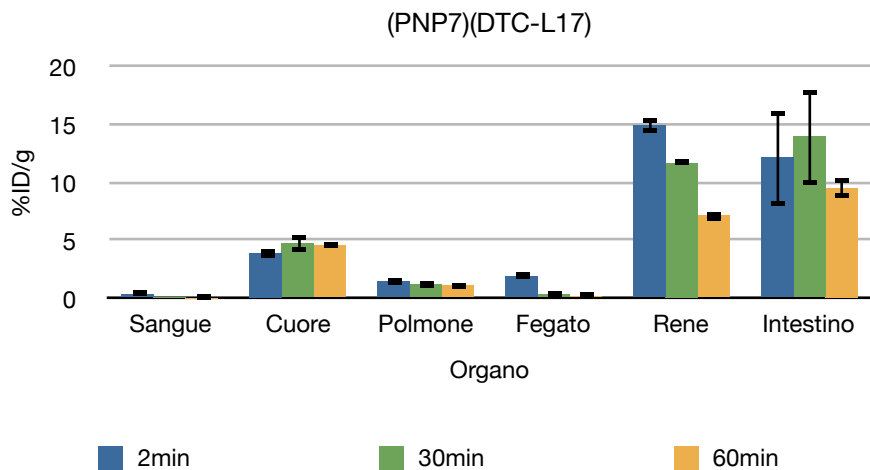
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.24 ±	0.02	0.05 ±	0.01	0.02 ±	0.00	0.01 ±	0.00	0.01 ±	0.00
Cuore	3.78 ±	0.31	3.73 ±	0.30	4.00 ±	0.21	3.62 ±	0.10	3.58 ±	0.16
Polmone	1.93 ±	0.07	1.10 ±	0.10	1.22 ±	0.15	0.97 ±	0.07	0.97 ±	0.01
Fegato	1.85 ±	0.02	0.43 ±	0.07	0.24 ±	0.06	0.13 ±	0.01	0.08 ±	0.00
Rene	12.21 ±	0.73	6.61 ±	0.88	5.51 ±	0.26	5.17 ±	0.88	3.46 ±	0.17
Intestino	2.44 ±	0.09	4.89 ±	1.23	6.29 ±	0.18	8.28 ±	0.66	5.44 ±	1.70
Urine	8.71 ±	1.13	67.97 ±	2.80	47.41 ±	7.65	35.10 ±	7.61	26.2 ±	5.12

Tabella A4.9. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTC-L}_{17})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



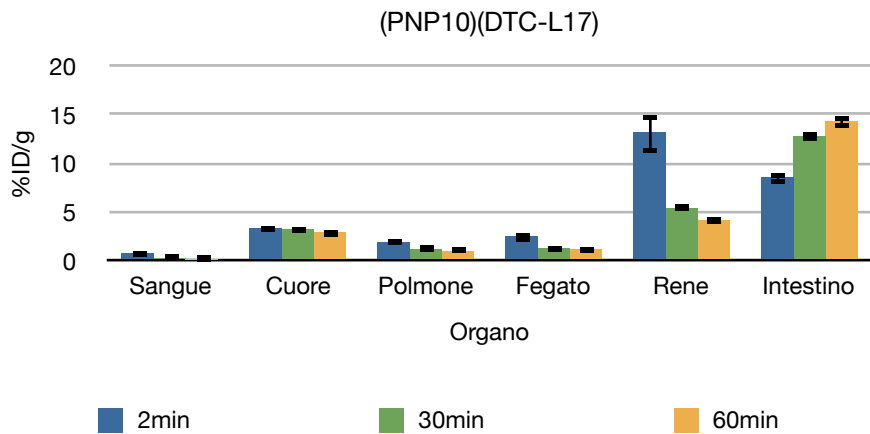
	2min		30min		60min	
Sangue	0.36 ±	0.18	0.02 ±	0.00	0.01 ±	0.00
Cuore	5.21 ±	0.61	4.50 ±	0.39	3.79 ±	0.60
Polmone	1.12 ±	0.55	1.17 ±	0.05	0.85 ±	0.08
Fegato	1.16 ±	0.43	0.30 ±	0.01	0.15 ±	0.02
Rene	12.03 ±	0.73	8.43 ±	1.10	5.47 ±	0.44
Intestino	5.27 ±	1.09	16.59 ±	0.11	14.45 ±	1.78
Urine	9.50 ±	3.84	36.67 ±	2.42	29.90 ±	7.40

Tabella A4.10. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L17})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



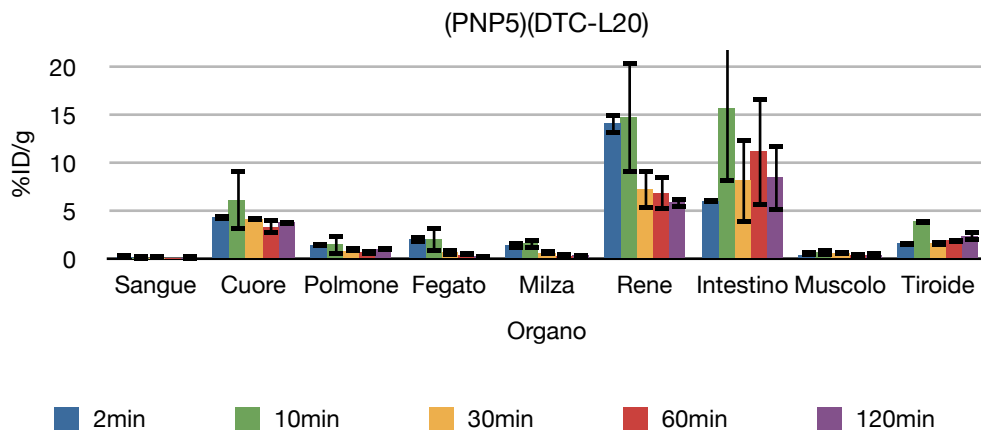
	2min		30min		60min	
Sangue	0.36 ±	0.03	0.08 ±	0.00	0.04 ±	0.01
Cuore	3.91 ±	0.41	4.76 ±	0.71	4.58 ±	0.08
Polmone	1.48 ±	0.14	1.23 ±	0.14	1.10 ±	0.15
Fegato	1.89 ±	0.03	0.31 ±	0.08	0.17 ±	0.03
Rene	14.91 ±	0.60	11.67 ±	0.03	7.12 ±	0.40
Intestino	12.13 ±	4.09	13.95 ±	4.12	9.51 ±	0.81
Urine			52.01 ±	10.17	35.93 ±	11.49

Tabella A4.11. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP7})(\text{DTC-L17})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



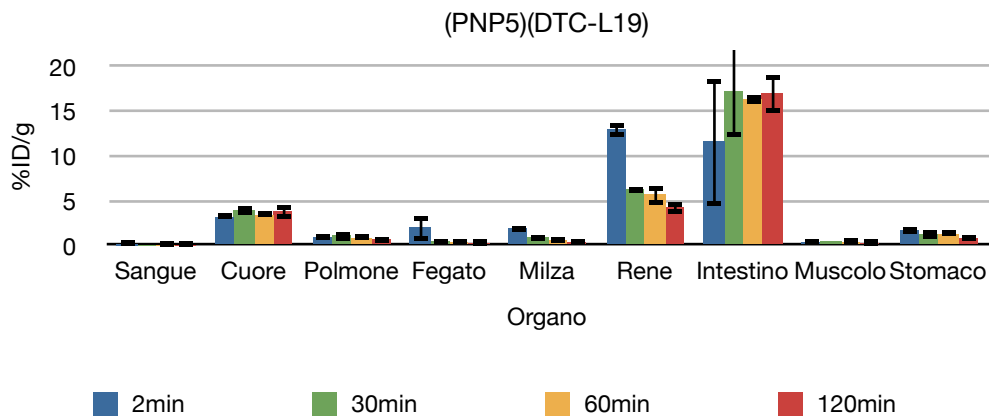
	2min		30min		60min	
Sangue	0.69 ±	0.20	0.17 ±	0.01	0.07 ±	0.01
Cuore	3.26 ±	0.19	3.20 ±	0.22	2.89 ±	0.26
Polmone	1.85 ±	0.09	1.12 ±	0.05	0.95 ±	0.05
Fegato	2.41 ±	0.47	1.18 ±	0.16	1.09 ±	0.15
Rene	13.09 ±	2.05	5.30 ±	0.03	4.11 ±	0.30
Intestino	8.46 ±	0.60	12.76 ±	0.49	14.27 ±	0.59

Tabella A4.12. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{DTC-L17})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



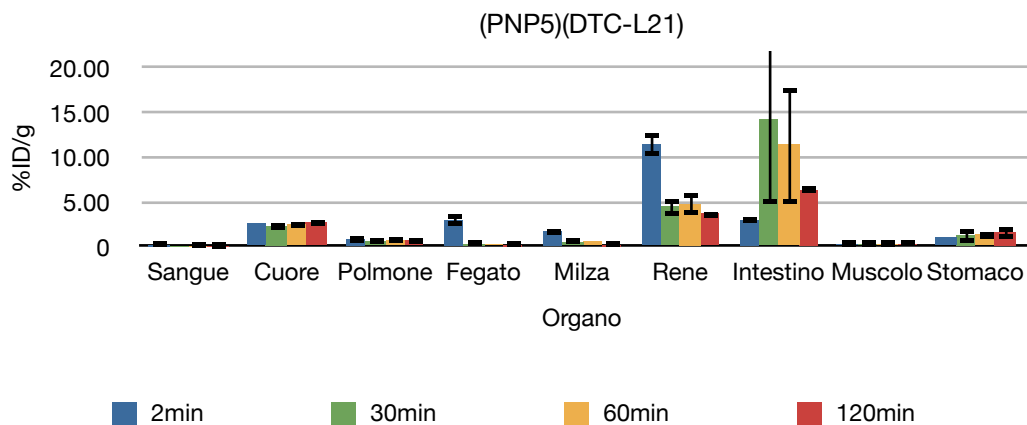
	2min		10min		30min		60min		120min	
Sangue	0.21 ±	0.03	0.08 ±	0.06	0.04 ±	0.01	0.02 ±	0.00	0.02 ±	0.01
Cuore	4.34 ±	0.30	6.16 ±	3.22	4.20 ±	0.34	3.34 ±	0.85	3.85 ±	0.38
Polmone	1.42 ±	0.10	1.53 ±	1.22	0.86 ±	0.02	0.73 ±	0.20	1.01 ±	0.14
Fegato	2.03 ±	0.43	2.04 ±	1.42	0.76 ±	0.55	0.39 ±	0.02	0.26 ±	0.19
Milza	1.40 ±	0.42	1.63 ±	0.63	0.59 ±	0.06	0.28 ±	0.03	0.39 ±	0.25
Rene	14.15 ±	1.21	14.72 ±	5.87	7.26 ±	2.13	6.90 ±	1.87	5.88 ±	0.61
Intestino	6.07 ±	0.35	15.75 ±	7.78	8.25 ±	4.56	11.18 ±	5.73	8.56 ±	3.61
Muscolo	0.43 ±	0.02	0.75 ±	0.47	0.58 ±	0.11	0.39 ±	0.12	0.39 ±	0.06
Tiroide	1.65 ±	0.37	3.97 ±	0.25	1.65 ±	0.19	1.96 ±	0.24	2.41 ±	0.56
Urine	0.00 ±	0.00	1.71 ±	2.20	5.53 ±	4.24	3.77 ±	2.68	4.09 ±	1.28

Tabella A4.13. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L20})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



	2min		30min		60min		120min	
Sangue	0.13 ±	0.01	0.03 ±	0.00	0.03 ±	0.02	0.01 ±	0.02
Cuore	3.14 ±	0.04	3.94 ±	0.50	3.33 ±	0.01	3.76 ±	0.80
Polmone	0.86 ±	0.09	1.08 ±	0.52	0.78 ±	0.04	0.60 ±	0.16
Fegato	1.94 ±	1.45	0.47 ±	0.24	0.28 ±	0.11	0.17 ±	0.03
Milza	1.88 ±	0.36	0.87 ±	0.34	0.56 ±	0.11	0.30 ±	0.08
Rene	12.97 ±	0.81	6.28 ±	0.26	5.70 ±	1.17	4.21 ±	0.61
Intestino	11.58 ±	7.12	17.24 ±	5.09	16.31 ±	0.46	17.01 ±	2.19
Muscolo	0.27 ±	0.05	0.40 ±	0.00	0.29 ±	0.02	0.25 ±	0.09
Stomaco	1.65 ±	0.15	1.22 ±	0.49	1.20 ±	0.01	0.82 ±	0.15
Urine		±	38.03 ±	9.95	20.73 ±	3.24	8.90 ±	0.35

Tabella A4.14. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L19})]^+$ (in tre ratti, risultati espressi come %dose/g, media \pm SD).



	2min		30min		60min		120min	
Sangue	0.12 ±	0.01	0.01 ±	0.00	0.07 ±	0.07	0.01 ±	0.05
Cuore	2.54 ±	0.00	2.28 ±	0.21	2.48 ±	0.24	2.70 ±	0.38
Polmone	0.83 ±	0.20	0.55 ±	0.09	0.67 ±	0.09	0.64 ±	0.30
Fegato	2.96 ±	0.62	0.27 ±	0.02	0.26 ±	0.00	0.13 ±	0.04
Milza	1.72 ±	0.22	0.45 ±	0.02	0.55 ±	0.00	0.13 ±	0.04
Rene	11.45 ±	1.22	4.44 ±	0.93	4.76 ±	1.24	3.66 ±	0.27
Intestino	2.96 ±	0.12	14.18 ±	9.35	11.39 ±	6.55	6.31 ±	0.10
Muscolo	0.20 ±	0.01	0.19 ±	0.02	0.22 ±	0.03	0.23 ±	0.03
Stomaco	1.02 ±	0.00	1.28 ±	0.83	1.30 ±	0.23	1.63 ±	0.70
Urine		±	12.81 ±	7.92	9.82 ±	2.34	9.34 ±	5.02

Tabella A4.15. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L20})]^+$

I dati biodistributivi presentati in vesti tabulari e grafiche dei complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ indicano chiaramente come questi presentino una elevata e persistente captazione cardiaca, superiore a quella esibita dai composti attualmente impiegati in clinica ^{99m}Tc -Sestamibi e ^{99m}Tc -Tetrofosfim.

I valori di attività cardiaca raccolti a tempi brevi dalla somministrazione, come 2 e 10 minuti, rappresentano una buona approssimazione dell'indice di estrazione coronarico di primo passaggio. Una sostanziale variazione della captazione cardiaca iniziale risulta dipendente dalla natura del legante ditiocarbammico DTC-L_n.

I complessi esibiscono una captazione polmonare bassa, che si mantiene durante il periodo di osservazione, evidenziando una lenta cinetica di eliminazione. La clearance ematica è per tutti molto rapida. La captazione epatica è immediata e transitoria e l'eliminazione da questo organo è veloce e quantitativa. L'eliminazione dei prodotti avviene tramite la via intestinale e la via renale. I complessi non subiscono variazioni a carico della struttura chimica in seguito al processo di assorbimento e distribuzione, ritrovandosi immodificati nelle urine e nelle frazioni intestinali.

La sostituzione di un ditiocarbammato derivato da un'ammina alifatica, con un ditiocarbammato ottenuto da un'ammina aliciclica non altera il tropismo cardiaco. Il grafico sottostante riporta l'andamento del valore di uptake cardiaco ottenuto dagli studi biodistributivi ex-vivo dei complessi inoculati, andamento che rende ragione dell'uptake alto e persistente esibito da questa classe di prodotti. In un confronto con $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ appare subito evidente come la maggior parte dei complessi realizzati con ditiocarbammati della serie DTC-L_n presenti captazioni cardiache più alte rispetto al gold standard $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$.

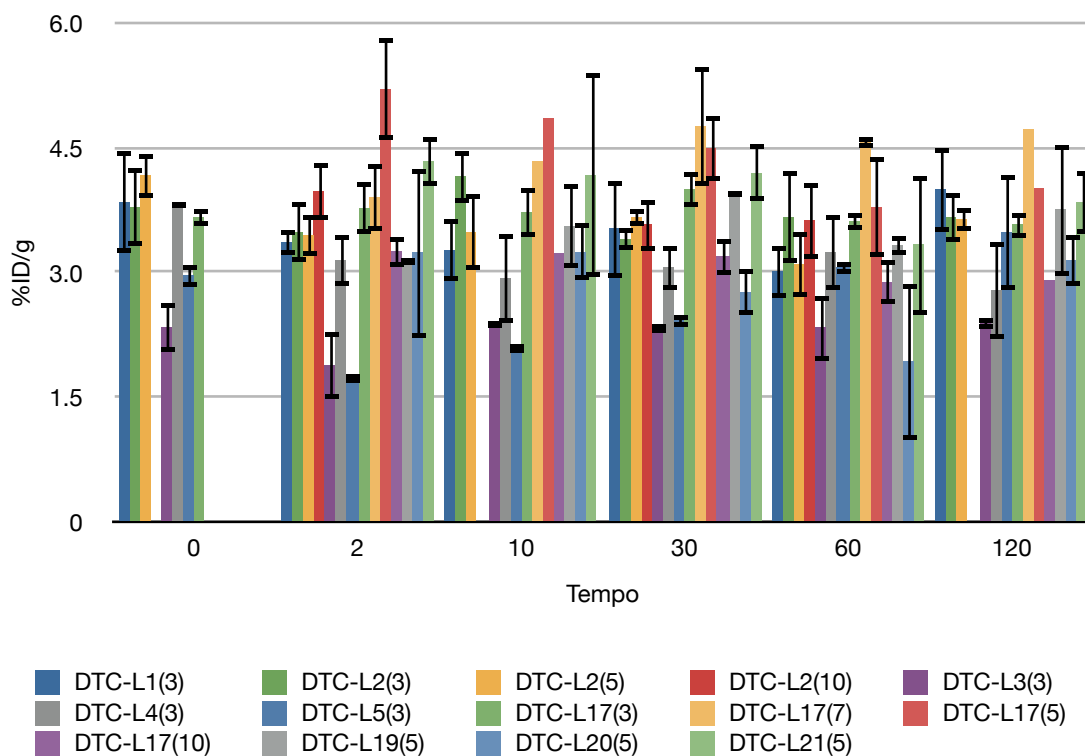


Grafico A4.1. Uptake cardiaco dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$

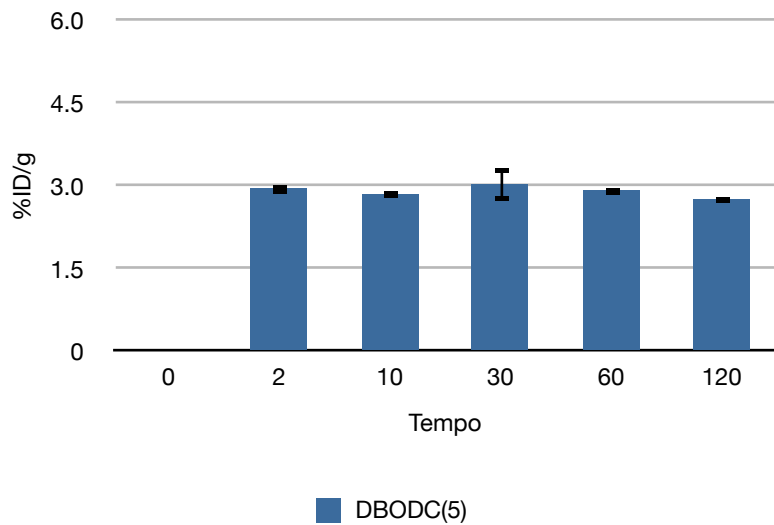


Grafico A4.2. Uptake cardiaco di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

Un reale raffronto della capacità dei nuovi complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$ di rappresentare un'evoluzione rispetto a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ richiede che questi esibiscano dei rapporti cuore/polmone e cuore/fegato particolarmente favorevoli. Il grafico successivo riporta l'andamento del rapporto cuore/polmone in funzione del tempo rilevato per i complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$:

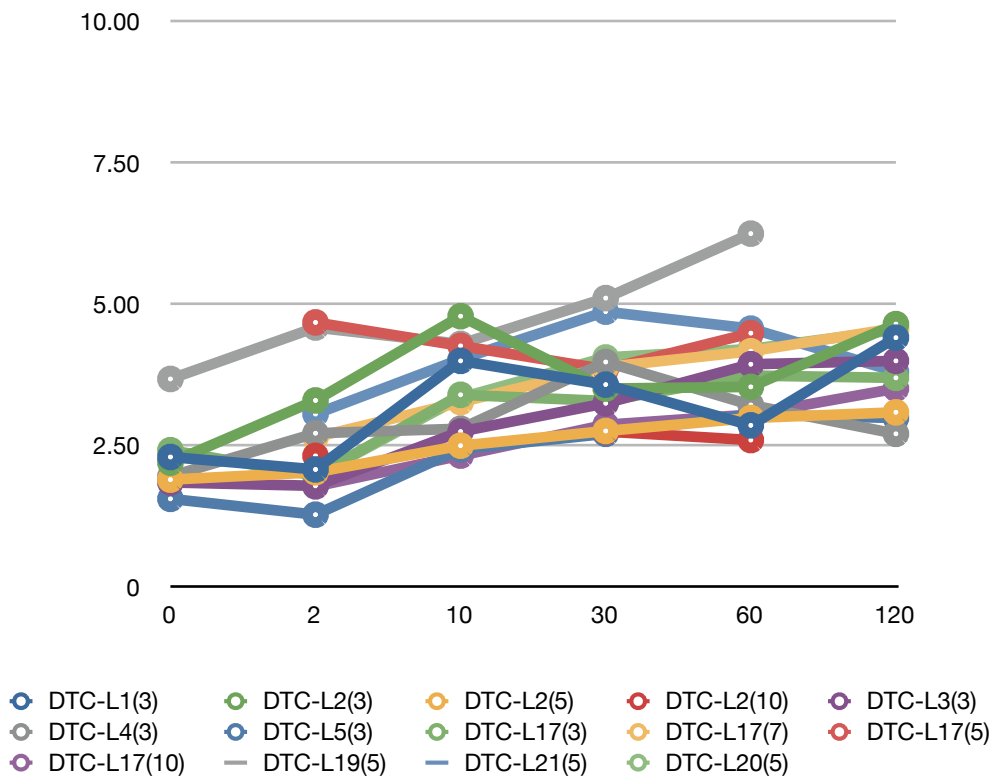


Grafico A4.3. Rapporto cuore/polmone in funzione del tempo rilevato per i complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$

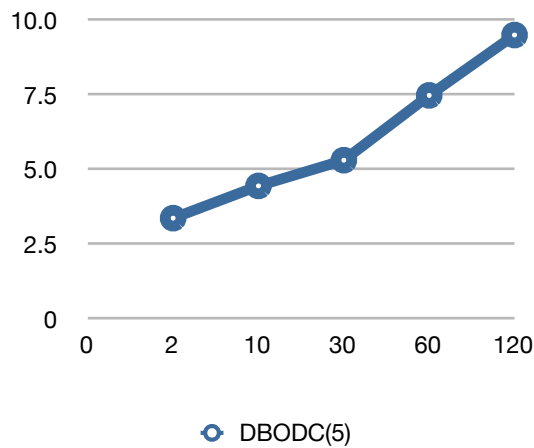


Grafico A4.4. Rapporto cuore/polmone in funzione del tempo per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

Come si nota chiaramente dal raffronto, $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ esibisce un rapporto cuore/polmone (target/background), migliore rispetto a ciascun composto della nuova serie. Il Grafico sottostante riporta l'andamento del rapporto cuore/fegato in funzione del tempo rilevato per i complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$:

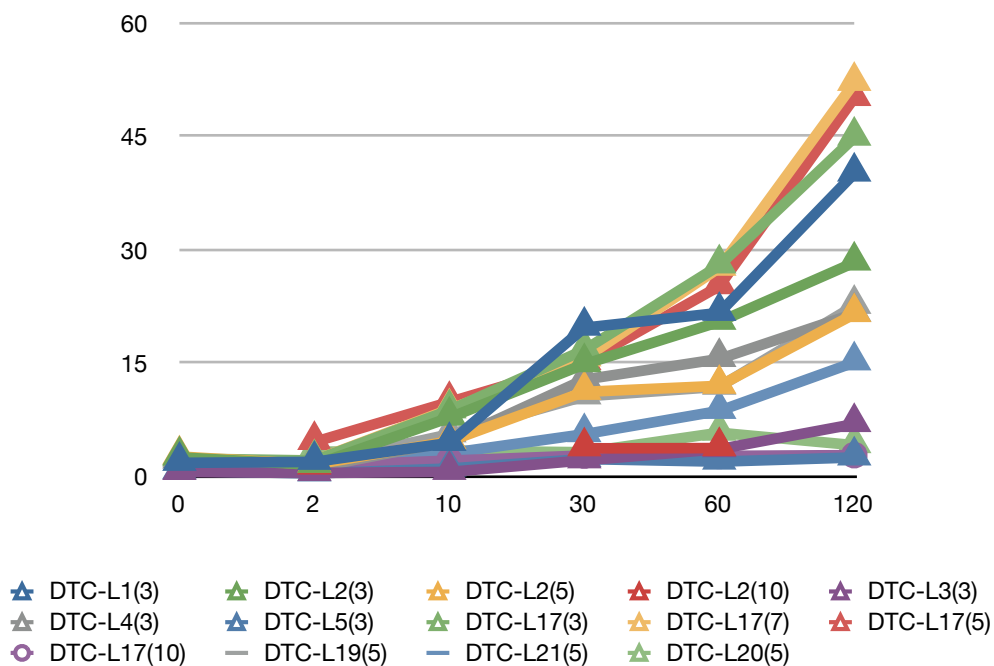


Grafico A4.5. Rapporto cuore/fegato in funzione del tempo rilevato per i complessi della serie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC-L}_n)]^+$

L'estrazione ematica dell'attività effettuata dal fegato per $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DBODC})(\text{PNP3,5,7,10})]^+$, 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.

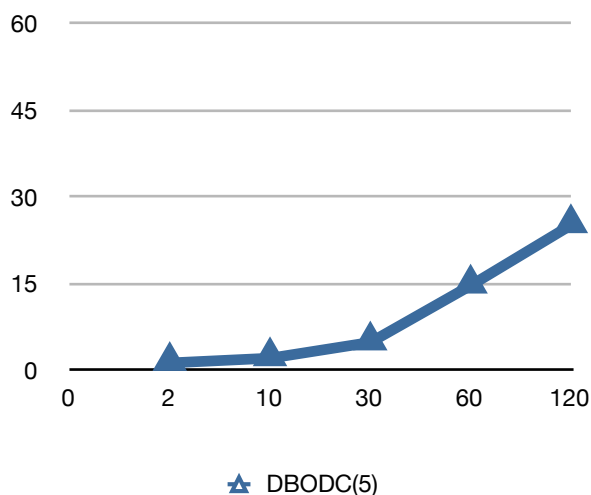


Grafico A4.4. Rapporto cuore/fegato in funzione del tempo per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$

La valutazione del rapporto cuore /fegato ha permesso di apprezzare come i due composti $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC-L}_{17})]^+$ e $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP7})(\text{DTC-L}_{17})]^+$, dotati di un'ottimo indice di estrazione cardiaca già a tempi molto brevi, esibiscono rapporti cuore/fegato circa doppi (rispettivamente 50 e 52, a 120 minuti), rispetto al rapporto target/background di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ (25 a 120 minuti). La combinazione di un alto uptake cardiaco con rapporti cuore/polmone e cuore/fegato molto favorevoli all'ottenimento di immagini scintigrafiche di alto significato diagnostico rende i due traccianti competitivi rispetto al gold standard $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$.

A5 Conclusioni

Nella prima Sezione di questo lavoro si è valutata la possibilità di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche, in particolare l'indice di estrazione coronarico di primo passaggio, del radiocomplesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC}-\text{L}_n)]^+$ il *core* nitruro 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. La prima possibilità è stata indagata mediante la sintesi di una libreria di leganti ditiocarbammici aliciclici DTC-L_n. Le amminodifosfine sono state utilizzate nella coordinazione del *core* azoturo, mantenendo inalterato il ditiocarbammato DTC-L_n, per formare complessi monocationici, dissimetrici e stabili del tipo $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP}_x)(\text{DTC}-\text{L}_n)]^+$ caratterizzati da un diverso grado di lipofilia. Tali composti sono stati ottenuti in alta resa seguendo una via di sintesi semplificata, costituita da un unico passaggio, in cui la miscela di tutti i reagenti (il riducente, il donatore del *core* nitruro 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.

Gli eterocomplessi $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC}-\text{L}_{17})]^+$ e $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP7})(\text{DTC}-\text{L}_{17})]^+$, presentano, invece, una captazione cardiaca più rapida ed elevata rispetto agli agenti di riferimento ($[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$) 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 di gran lunga superiori inferiori rispetto a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ aumentando, *in vivo*, la nitidezza dell'immagine scintigrafica. Tali valori si mantengono comunque nettamente superiori a quelli dei traccianti tecneziati monocationici attualmente in commercio, $[^{99m}\text{Tc}]-\text{Sestamibi}$ e $[^{99m}\text{Tc}]-\text{Tetrofosmin}$.

Questo studio dimostra come la variazione del legante ditiocarbammico da alifatico ad aliciclico determini una variazione delle caratteristiche chimico-fisiche e quindi biodistributive di traccianti per scintigrafia miocardica perfusionale del tipo $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$, causando un un significativo aumento dell'uptake cardiaco, dal 10% al 20% a 2 min p.i. rispetto a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DBODC})]^+$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e $^{99m}\text{Tc}-\text{Sestamibi}$. Per $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DTC}-\text{L}_{17})]^+$ e $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP7})(\text{DTC}-\text{L}_{17})]^+$ l'uptake cardiaco è alto e persistente nel tempo, più alto rispetto agli altri complessi, così come i rapporti cuore/polmone e cuore/fegato.

- [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. Fucello, R.H. Rubin, H.W. Strauss, A.J. Fischmann, *J. Nucl. Med.*, **1990**, 31, 2022.
- [17] G. J. Kemerink, X. Liu, D. Kieffer, S. Ceysens, 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. Gohlke, 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 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ (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. Wachters, 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, “Myocardial 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 myocardial 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-Ethoxyethyl)Phosphino]Ethane: Human Biodistribution, Dosimetry and Safety of a New Myocardial Perfusion Imaging 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(Dithiocarbamate) Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: 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 artery 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 ^{99m}Tc complexes useful as radiopharmaceuticals for heart imaging”, *Dalton Trans.*, **2007**, 1183-1193.
- [65] M.J. Welch, C. S. Redvandy, “Handbook of Radiopharmaceuticals, Radiochemistry and Applications”, *John Wiley & Sons Ltd*, **2003**.
- [66] G.B. Saha, R.T. Go, W.J. Macintyre, “Radiopharmaceuticals for Cardiovascular Imaging”,

- [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(dithiocarbamate) 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 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DTC-L}^n)(\text{PNP})]^+$ complex (DTC-Lⁿ = 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

$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$: dalla Cardiologia
Nucleare all'*Imaging* Tumorale

B1 Obiettivo

La valutazione in-vivo dei complessi processi cellulari associati all'instaurarsi di patologie degenerative come il cancro (proliferazione, apoptosi, interazione recettore/ligando, trasporto di substrati e metabolismo dei nutrienti), costituisce un'importante area di ricerca in Medicina Nucleare. Uno dei principali obiettivi, in questo settore della medicina, consiste nell'identificazione non invasiva di marcatori tumorali (biochimici, molecolari e istologici), indici di aggressività e resistenza alla terapia, capaci di fornire criteri razionali per l'adozione di adeguate strategie terapeutiche^[1].

La farmacoresistenza (MDR) è un fenomeno complesso, generato da modifiche del microambiente tumorale o di specifici fattori, come:

- aumento dell'efflusso di farmaco o diminuzione del suo afflusso;
- inattivazione del farmaco;
- modifica del bersaglio;
- elusione dell'apoptosi.

Il primo di questi meccanismi è mediato da proteine trasportatrici presenti sulla membrana plasmatica come le glicoproteine-P (P-gP), la cui sovraespressione costituisce uno dei maggiori ostacoli al trattamento del cancro^[2,3]. Queste proteine, oltre alla loro diffusione nei tumori, sono normalmente espresse in tessuti normali coinvolti nella funzione escretoria e in alcune barriere come la BBB, B-CSF e BTB. Questo fa sì che le P-gP possano esercitare un ruolo cruciale nella funzione protettiva di aree importanti come il SNC; studi recenti hanno, infatti, rivelato un potenziale coinvolgimento dell'attività/espressione di P-gP in disturbi del SNC come l'AD, il PD e l'epilessia^[4].

Conseguentemente, la possibilità di valutare quantitativamente, attraverso metodi non invasivi, l'espressione della P-gP MDR e i relativi meccanismi che ne regolano l'attività di trasporto, rappresenta un'interessante attività di ricerca. La misura della MDR costituisce un importante 'marker' nella pianificazione di una terapia sistemica per il cancro e per alcune malattie neurodegenerative.

L'espressione della P-gP MDR, indicata dalla misura dei livelli di mRNA o di proteina, non è sempre correlata con la valutazione dell'attività di trasporto da essa mediata, poiché quest'ultima è interessata da variazioni specifiche come lo stato di fosforilazione della proteina. Forme alterate di P-gP o meno attive potrebbero essere riconosciute con reazioni a catena della polimerasi o con metodi immunoistochimici, procedimenti questi che però non riflettono accuratamente lo stato di resistenza delle cellule. Quest'obiettivo potrebbe essere raggiunto mediante tecniche diagnostiche per immagini, quali SPECT (tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo) e PET (tomografia ad emissione di positroni), le quali attraverso l'uso di radiofarmaci, trasportati dalla P-gP MDR, possono identificare in-vivo in modo non invasivo tumori o tessuti in cui questo trasportatore non solo è espresso, ma è anche funzionale. La maggior parte di queste tecniche utilizza complessi di metalli radioattivi, in particolare ^{99m}Tc-agenti, identificati come substrati per il trasportatore P-gP-MDR.

Il ^{99m}Tc rappresenta, infatti, per le sue ottimali caratteristiche nucleari ($t_{1/2} = 6,02$ h; $E_{\gamma} = 141$ keV), basso costo e facile reperibilità, il nuclide di elezione nella diagnosi Medico Nucleare SPECT.

^{99m}Tc -Sestamibi (^{99m}Tc -Sestamibi) è stato uno dei primi traccianti, originariamente sviluppato come radiofarmaco per l'imaging cardiaco, utilizzato nella diagnosi di alcuni tipi di tumore come substrato di P-gP-MDR e MRP1 e quindi come tracciante per la visualizzazione dell'espressione di tali proteine^[1,3,7].

Nella pratica oncologica e neurologica la determinazione della densità e funzionalità dei mitocondri e delle P-gP-MDR costituisce un aspetto di particolare importanza. Dal punto di vista clinico, la valutazione in-vivo dell'espressione e della funzionalità delle P-gP-MDR, permette di: selezionare pazienti che possono beneficiare di trattamenti terapeutici (es. con chemioterapici); distinguere se la farmacoresistenza che si è instaurata è mediata o meno da P-gP e quindi individuare quei soggetti che possono usufruire del trattamento con inibitori delle P-gP^[1]. Inoltre, misure funzionali che definiscano lo stato di P-gP-MDR mediante l'applicazione di tecniche non invasive quali SPECT/PET rappresentano un maggior vantaggio rispetto alle tecniche di valutazione convenzionali in-vitro che necessitano di prelievi biotici.

Negli ultimi anni il gruppo di ricerca, dove ho condotto i miei studi dottorali, ha sviluppato una serie di complessi monocationici di formula generale $^{99m}\text{TcN(L)(PNP)]}^+$ aventi un *core* azoturo e due diversi leganti bidentati, dove L è un legante monoanionico del tipo ditiocarbammato e PNP, un legante aminodifosfinico. Tra i diversi complessi $^{99m}\text{Tc(N)(DBODC)(PNP5)]}^+$ [DBODC = N,N-bis-etossietilditiocarbammato; PNP5 = N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]etossietilammina]] abbreviato a $^{99m}\text{Tc(N)-DBODC5}$, per le sue favorevoli caratteristiche farmacocinetiche, è stato selezionato come potenziale agente di *imaging* cardiaco ed attualmente si trova in fase di studio clinico.^{[2][3][4]}

Studi di distribuzione sub-cellulare condotti su miocardio isolato di ratto hanno evidenziato che $^{99m}\text{Tc(N)(DBODC)(PNP5)]}^+$, analogamente a ^{99m}Tc -Sestamibi è intrappolato nelle strutture mitocondriali grazie alla presenza di un potenziale di membrana negativo. Inoltre, studi di metabolismo hanno dimostrato che l'agente è eliminato nella sua forma nativa, e che l'escrezione è mediata da trasportatori P-gP/MDR-P-gP^[13], aspetti questi che lasciano intravedere la possibilità di estendere l'ambito di applicazione di questo tracciante e dei suoi derivati all'imaging tumorale e alla valutazione in-vivo dell'espressione e funzione delle P-gP-MDR nel cancro e nelle malattie neurodegenerative come l'AD, il PD e l'epilessia.

Sulla base di queste considerazioni, l'obiettivo di questa parte del lavoro è quello di valutare, attraverso studi in-vitro, la possibilità di:

1. validare $^{99m}\text{Tc(N)(DBODC)(PNP5)]}^+$ come substrato delle P-gP MRP;
2. esplorare l'utilità di questo nuovo tracciante nell'imaging tumorale e nella determinazione dell'attività, espressione e funzione delle P-gP e delle proteine ad esse associate.

Lo sviluppo del progetto, condotto in collaborazione con il gruppo della prof. Marzano del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche di questo Ateneo e con il gruppo del Prof. Colabufo del Dipartimento Farmaco Chimico dell'Università di Bari, prevede la valutazione:

1. di alcuni parametri di base quali la cinetica di accumulo (*time course* da 5-120 min) di $^{99m}\text{Tc(N)(DBODC)(PNP5)]}^+$, a 4 e 37 °C, in diverse linee cellulari tumorali umane farmaco sensibili e nella corrispondente variante farmaco resistente, utilizzando ^{99m}Tc -Sestamibi come riferimento. Le linee cellulari utilizzate nei nostri esperimenti sono riportate nella tabella successiva;

- della cinetica di captazione di entrambi i radiocomplessi, nelle linee farmaco-resistenti in presenza di opportuni MDR modulatori/inibitori, quali: Vrp, bloccante dei canali del calcio; CsA, agente immunosoppressivo, modulatore MDR ad ampio spettro; Butionina sulfossimina (BSO), inibitore della sintesi del glutatione, inibisce indirettamente l'attività MRP, attraverso la riduzione delle riserve di glutatione; MK571, inibitore selettivo delle MRP;
- della capacità del $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DBODC})(\text{PNP5})]^+$ di riconoscere la resistenza determinata da proteine MRP_n. Allo scopo, la cinetica di assorbimento del complesso sarà studiata nelle seguenti linee cellulari: C13* caratterizzate da un'elevata espressione di trasportatori MPR-1 e MPR-2 e in cellule transfettate del tipo MDCK sovraespressanti trasportatori del tipo MRP-1, in presenza e non di MK-571.

Linea cellulare wild type	Variante farmaco resistente	Trasportatore ABC	Inibitore
MCF7 (breast cancer)			
2008 (ovarian cancer)		PgP/MDR1	Verapamile, Cyclosporina A, MC18
		MRP1	Cyclosporina A, MK571
A2780 (ovarian cancer)		-	-
MDCK (Madin-Darby-Canine-Kidney)		-	-
	MCF7/MDR+ (Breast cancer; Doxorubicine resistant)	PgP/MDR1	Verapamile, Cyclosporina A, MC18, MC134
		MRP1	Cyclosporina A, MK571, MC150
	C13* (ovarian cancer; DDP resistant)	MRP1	Cyclosporin A, MK571, MC150
		MRP2	MK571
	A2780/Adr+ (ovarian cancer; Doxorubicine resistant)	MRP2 MRP1	MK571 Cyclosporina A, MK571, MC150
	MDCK/MRP1 (Madin-Barby-Canine- Kidney; MRP1 transfected)	MRP1	MK571, MC150

Tabella B1.1. Linee cellulari ed inibitori valutati in questo studio.

Per tutti, la vitalità cellulare sarà determinata prima e durante tutti gli esperimenti mediante trypan blu.

Inoltre, in relazione a quanto sopra, sarà valutata la capacità di nuove molecole, fornite dal Prof Colabufo, nel modulare l'efflusso mediato da trasportatori MDR. Queste nuove molecole, nominate MC134, MC150 e MC18, sono derivati 6,7-dimethoxytetrahydroisoquinolinici e sono state precedentemente testate in-vitro^[22] in diverse linee cellulari quali P-gP-MDCK e MRP-1-MDCK e in-vivo attraverso studi PET^[23], dimostrando la loro capacità di legare P-gP e MRP-1 e modulare l'attività di queste pompe.

B2 Introduzione

B2.1	Rilevanza della <i>Multi Drug Resistance</i> nei trattamenti chemioterapici	91
B2.2	Proteine appartenenti alla famiglia delle <i>ATP-Binding Cassette</i>	92
B2.3	Glicoproteina-P (P-gP/MDR1)	94
B2.4	Famiglia MRP	97
B2.5	Proteina resistente al cancro al seno (BCRP/ABCG2)	101
B2.6	Studi clinici sugli inibitori di MDR	102
B2.7	Trasporto di farmaci chemioterapici mediato dalla P-gP MDR1	116
B2.8	Agenti SPECT come tracciati dell'attività di trasporto della P-gP	116
B2.9	[^{99m} Tc-Sestamibi] ⁺ (MIBI), tracciante tumorale e di MDR	119
B2.10	[^{99m} Tc(N)(PNP5)(DBODC)] ⁺ , dalla cardiologia all'oncologia	123

B2.1 Rilevanza della *Multi Drug Resistance* nei trattamenti chemioterapici

L'efficacia della chemioterapia nel trattamento di pazienti con cancro è fortemente limitata dallo sviluppo della resistenza ai farmaci in cellule tumorali; questo fenomeno può essere considerato responsabile del fallimento della risposta ai trattamenti e del verificarsi di ricadute in malattie resistenti a più composti chimici. Molti tumori sono infatti intrinsecamente resistenti alla chemioterapia, altri inizialmente rispondono al trattamento ma in seguito sviluppano resistenza ai farmaci citotossici. La resistenza a questi composti dipende da diversi meccanismi biologici, come variazioni nel metabolismo dei farmaci, nella captazione intracellulare, nella penetrazione nel microambiente tumorale, nell'interazione con bersagli cellulari e nei conseguenti eventi cellulari che vengono attivati.

Il fenotipo multi-resistente ai farmaci (MDR) è definito come un evento nel quale cellule tumorali che sono state esposte ad un agente citotossico sviluppano una resistenza crociata a una varietà di composti non correlati dal punto di vista strutturale e funzionale. La resistenza delle cellule tumorali rappresenta un significativo ostacolo al trattamento chemioterapico. Il fenotipo MDR può essere intrinseco, quando le cellule mostrano un'innata resistenza ai farmaci chemioterapici, o acquisito, quando la multi-resistenza si sviluppa in seguito ad esposizione a questi agenti. Ciò può risultare da un diminuito assorbimento del farmaco, un incremento dell'efflusso o del sequestro in compartimenti intracellulari, o un aumento del metabolismo ad opera di enzimi detossificanti come il citocromo P450 o per azione del glutatione che comportano l'inattivazione dei farmaci.

I trasportatori possono essere classificati in passivi o attivi; quest'ultimo tipo è poi suddiviso in trasporto attivo primario o secondario, in accordo al meccanismo di energia accoppiato. I trasportatori ABC agiscono grazie all'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP ed espellono i substrati dalle cellule contro gradiente chimico.

Il meccanismo di multi-resistenza ai farmaci più comunemente studiato è dovuto alla sovraespressione di proteine trasportatrici localizzate sulla membrana cellulare o in alcune vescicole intracellulari, che agiscono espellendo o sequestrando gli agenti citotossici, non permettendo quindi a questi farmaci di raggiungere i bersagli intracellulari in concentrazione sufficiente. Questi trasportatori appartengono alla super-famiglia di proteine *ATP-Binding Cassette* (ABC), la cui attività di trasporto ha un importante effetto in ambito farmacologico nel modulare l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione di numerosi composti.

Nella terapia anticancro, la resistenza multi-farmaco è la principale causa responsabile del fallimento di molte forme di chemioterapia in pazienti affetti da tumori a carico dell'apparato emolinfopoietico e di tumori solidi, come il cancro al seno, alle ovaie, ai polmoni e al basso tratto gastrointestinale. Nella pratica clinica, la risposta ai trattamenti chemioterapici è influenzata dall'eterogeneità della popolazione cellulare tumorale; ciò permette di ottenere risposte parziali, minime e miste. Da questo punto di vista, la ricrescita di lesioni tumorali dopo una prima regressione in seguito a trattamenti chemioterapici, può essere attribuita a espansione clonale di cellule inizialmente poco rappresentate.

Dati di letteratura hanno mostrato che le proteine MDR sono sovraespresse in molti tumori, come quello epatico, il carcinoma polmonare o al colon che possiedono una primaria (o intrinseca) resistenza alla chemioterapia, ma è stato anche dimostrato che la stessa chemioterapia potrebbe comportare la sovraespressione di queste proteine così da indurre l'espansione di cloni resistenti a più farmaci meno sensibili ai trattamenti chemioterapici (resistenza secondaria ai farmaci).

Il più importante aspetto che deriva dagli studi pubblicati sulla MDR è l'associazione tra alcune proteine coinvolte in questo processo e le risposte cliniche ai trattamenti chemioterapici; ci sono infatti sufficienti evidenze per supportare l'ipotesi che l'analisi di proteine appartenenti alla superfamiglia delle ABC possa essere considerata come biomarker predittivo in tessuti tumorali dell'efficacia clinica di farmaci che sono substrato di trasportatori MDR.

Ci sono tre principali gruppi di proteine trasportatrici ABC coinvolte nel fenotipo MDR: la glicoproteina-P (MDR1/ABCB1), le proteine associate alla multi resistenza ai farmaci (tra cui la più nota e meglio caratterizzata è la MPR1/ABCC1) e il trasportatore connesso alla resistenza che si sviluppa nel cancro al seno (BCRP/ABCG2). Esistono poi delle altre proteine coinvolte nel fenomeno MDR che non appartengono alla famiglia dei trasportatori ABC, tra le quali la più studiata è la MVP/LRP (major vault protein/lung resistance protein).

I modulatori MDR sono stati studiati con l'intento di eludere il meccanismo di multi resistenza, bloccando il trasporto attivo dei farmaci verso l'esterno delle cellule tumorali mediato da queste proteine trasportatrici ABC.

B2.2 Proteine appartenenti alla famiglia delle ATP-Binding Cassette

La superfamiglia delle ABC è una delle più grandi famiglie di proteine, con più di 100 ABC trasportatori distribuiti dai procarioti al genere umano. Tra questi, 48 geni sono di origine umana e 13, raggruppati in 4 sottofamiglie, sono correlati a malattie tra le quali anche la resistenza ai farmaci. Comunque, solo per alcuni di questi trasportatori è stato già dimostrato un coinvolgimento diretto fra la loro presenza e lo sviluppo del fenomeno della resistenza multi-farmaco.

- ★ **sottofamiglia ABCA:** studi in vitro evidenziano che ABCA2 è amplificato e sovraespresso in modelli di carcinoma ovarico umano; è coinvolto anche nella resistenza all'estramustina ma soprattutto sembra essere implicato nella determinazione della resistenza al metotrexato. Comunque le sue implicazioni cliniche rimangono non chiare.
- ★ **sottofamiglia ABCB:** fra questi gruppo di proteine, la più rilevante e studiata è la ABCB1 (anche conosciuta come Glicoproteina P o MDR1), responsabile dell'efflusso dei farmaci e della resistenza ad agenti strutturalmente non correlati utilizzati in chemioterapia come le antracicline, gli alcaloidi della Vinca, taxani e probabilmente tanti altri composti ancora.
- ★ **sottofamiglia ABCC:** utilizzando come modello sperimentale una linea cellulare di cancro ai polmoni multi resistente, Cole e colleghi hanno clonato un membro della famiglia ABC noto

come ABCC1 (MRP1), un trasportatore ad ampio spettro d'attività. Anche se questa proteina è una delle tre più studiate per la sua attività di pompa d'efflusso di farmaci, insieme ad ABCB1 e ABCG2, gli studi clinici sono ancora agli stadi iniziali.

- ★ **sottofamiglia ABCG:** ABCG2 è uno dei geni appartenenti a questa famiglia maggiormente studiato come trasportatore ABC; è responsabile della resistenza che si manifesta nei confronti di trattamenti farmacologici con metotrexato ma anche con topotecan e antracicline e sembra essere un importante fattore prognostico di leucemia.

La maggior parte dei membri di questa famiglia di proteine è coinvolta nel trasporto attivo di un'ampia varietà di composti attraverso le membrane biologiche; hanno un ruolo fisiologico nel trasporto di ioni, peptidi, steroidi, polisaccaridi, amminoacidi, acidi organici, acidi biliari, farmaci e altri xenobiotici, ma sono presenti anche in cellule tumorali, dove mediano l'efflusso attivo di un'ampia varietà di composti terapeutici. Tutti i membri della famiglia ABC sono stati identificati nelle specie viventi e si è visto che possiedono delle regioni altamente conservate. Sono organizzati in due domini: i domini per il legame del nucleotide (NBDs), che sono responsabili dell'idrolisi dell'ATP necessaria per trasportare i substrati attraverso le membrane, e i domini transmembrana (TMDs), implicati nel riconoscimento e nel legame di differenti substrati (figura 2.1).

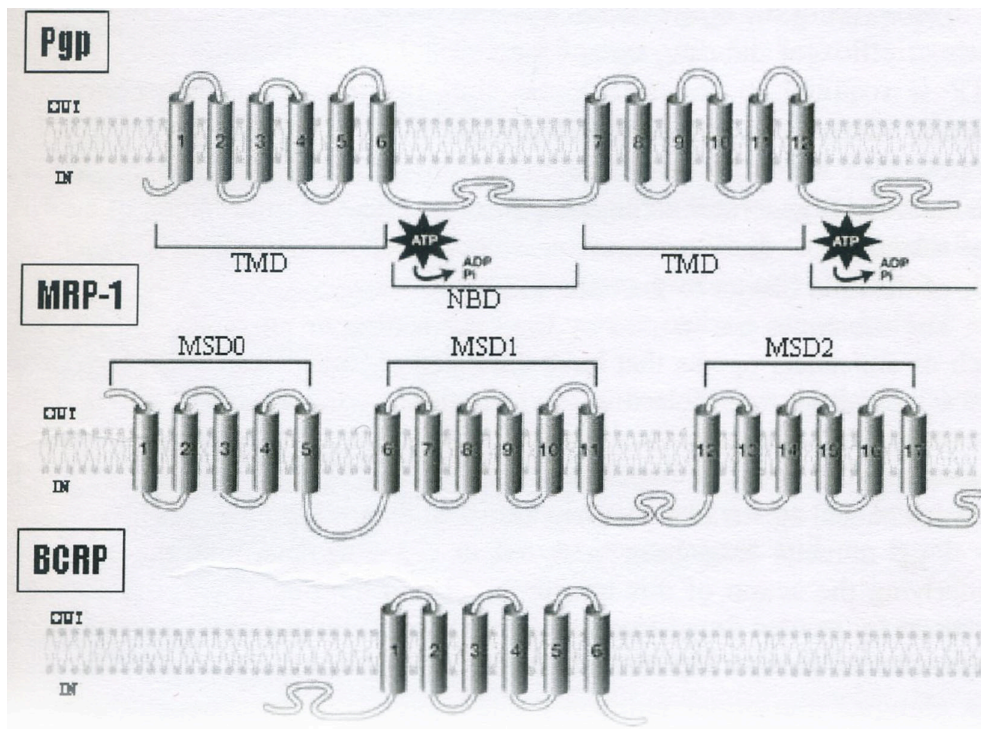


Figura B2.1. Trasportatori ABC che caratterizzano il fenotipo MDR.

Tutti i membri della superfamiglia di trasportatori ABC presentano due caratteristiche e ben conservate sequenze di peptidi in ciascun dominio NBD costituite da 100-200 amminoacidi chiamate segmento Walker A e B. Tra questi due segmenti ce n'è un terzo con una sequenza amminoacidica altamente conservata (ALSGGQ) chiamato "segmento di marchio ABC", implicato nel

riconoscimento, legame e idrolisi dell'ATP. Il segmento Walker A interagisce con i fosfati dell'ATP legato e con il cofattore magnesio, mentre il segmento Walker B interagisce con Mg^{2+} .

I domini TMDs contengono una catena polipeptidica che si ripiega a formare 6 α -eliche transmembrana in ciascun dominio. La specifica interazione dei substrati con questi domini porta a cambiamenti conformazionali che ne consentono il successivo trasporto attivo grazie all'energia che deriva dall'idrolisi dell'ATP.

Una delle caratteristiche peculiari di queste proteine, che agiscono pompando attivamente i farmaci citotossici all'esterno della cellula, è l'ampia specificità di substrati che sono in grado di trasportare, fenomeno che può giustificare la resistenza crociata a molteplici composti non correlati chimicamente. Diversi modelli sono stati proposti per descrivere la cinetica e il meccanismo di idrolisi di ATP e conseguente trasporto attivo di substrati verso l'esterno della membrana cellulare; uno dei più accreditati prevede un trasporto ciclico che implica una variazione della configurazione spaziale della struttura proteica del trasportatore, tale da permettere che il sito di legame con la sostanza da trasportare si trovi alternativamente dislocato all'esterno o all'interno della membrana. Questo meccanismo è composto da quattro steps: 1. il ligando presenta alta affinità per il dominio transmembrana 2. il legame induce un cambiamento conformazionale nell'altro dominio che incrementa la sua affinità per l'ATP, conseguentemente il legame di due molecole di ATP induce una variazione nella configurazione spaziale del dominio transmembrana responsabile dell'espulsione del ligando 3. l'idrolisi dell'ATP innesca ulteriori cambiamenti conformazionali 4. il gruppo fosfato e il rilascio di ADP riportano il trasportatore ad una configurazione adatta per l'inizio di un nuovo ciclo.

Le proteine ABC, responsabili di fenomeni di multi resistenza ai farmaci, sono ampiamente distribuite nei tessuti come intestino, fegato, rene, barriera ematica cerebrale, tubo digerente, placenta, cervello, seno, testicoli, endometrio. MRP1 è pressoché espressa ubiquamente, mentre la presenza di P-gP è ristretta a quei tessuti coinvolti nell'assorbimento e nella secrezione. Alti livelli di espressione della proteina MDR1 sono stati rilevati in alcune barriere farmacologiche del corpo, come la barriera ematica cerebrale e il plesso coroideo.

B2.3 Glicoproteina-P (P-gP/MDR1)

La glicoproteina-P (nota anche come PGY1, MDR1 o P-gP), è una proteina di membrana di 170 kDa abbondantemente espressa in cellule MDR, che media l'efflusso unidirezionale dei farmaci verso l'esterno della membrana plasmatica grazie all'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP. Prodotta dal gene umano ABCB1, presente sul cromosoma 7q21.1, è costituita da due subunità simmetriche che mostrano omologia con i trasportatori di membrana ATP-dipendenti e un'origine genetica comune con i sistemi di trasporto batterici. Sono stati identificati 12 domini transmembrana e 2 pieghe che legano il nucleotide: l'idrolisi dell'ATP fornisce l'energia per il trasporto di substrati verso l'esterno della membrana.

Anche se i domini proteici e amminoacidici specificatamente coinvolti nel riconoscimento del substrato non sono stati identificati, si è convenzionalmente dedotto da evidenze geniche e biochimiche che i domini associati alla membrana interagiscono direttamente con gli agenti citotossici coinvolti nel trasporto; nelle cellule MDR che esprimono P-gP, la concentrazione intracellulare di composti substrato di questa proteina diminuisce rispetto a quella in cellule sensibili ai farmaci che non esprimono la MDR1.

E' stato il primo gene dei trasportatori ABC ad essere stato scoperto e caratterizzato; è responsabile del trasporto di molti differenti composti, inclusi i farmaci antitumorali come antracicline, alcaloidi della vinca, taxani, etoposide, metotrexato, actinomicina D. La sua presenza in tessuti normali, dove solitamente ha funzione di barriera, suggerisce un ruolo nell'influenzare l'assorbimento intestinale dei farmaci e quindi limitare la loro biodisponibilità dopo somministrazione orale, ma anche nell'eliminare i metaboliti tossici dalle cellule e nel trasportare i composti al SNC. Si è visto, infatti, un'elevata espressione dei livelli di Pgp in cellule dendritiche e in cellule del sistema ematopoietico.

Sebbene una correlazione diretta fra l'espressione di questa proteina e la resistenza ai farmaci nei tumori non sia stata ancora completamente confermata, la presenza di P-gP ad alti livelli solo in alcuni tumori (epatico, adrenocorticale, renale), dove una riduzione della concentrazione intracellulare di farmaci citotossici dovuta all'overespressione della P-gP rende inefficace il trattamento con chemioterapici, suggerisce un possibile ruolo di questa proteina come fattore prognostico.

Per trasferire una molecola attraverso il doppio strato fosfolipidico, il substrato deve legarsi ai domini transmembrana (TMDs) grazie all'idrolisi non simultanea di due molecole di ATP; infatti, il legame del farmaco attiva un dominio di legame dell'ATP e la successiva idrolisi porta a un cambiamento nella conformazione della P-gP che permette l'efflusso del farmaco all'esterno della cellula. E' poi richiesta l'idrolisi di una seconda molecola di ATP per riportare la configurazione del trasportatore al suo stato originario. E' stato proposto anche uno schema catalitico alternativo per spiegare il meccanismo con cui agisce la P-gP: i due siti catalitici idrolizzano alternativamente l'ATP-Mg generando una conformazione ad 'alto potenziale chimico' nel sito di legame del nucleotide (NDB); ciò è accoppiato al trasporto del farmaco dalla parte interna a quella esterna del doppio strato fosfolipidico di membrana.

I substrati trasportati dalla P-gP sono farmaci neutri o carichi positivamente, come molti agenti anticancro con strutture chimiche non correlate, per esempio alcaloidi della vinca, antracicline, taxani, epipodofillotossine, ma anche altri agenti farmaceutici come gli antiaritmici e gli antistaminici.

Sono state fatte anche delle analisi su P-gP mutanti per determinare il meccanismo sottostante l'attivazione di questo trasportatore. Per la maggior parte dei mutanti si possono identificare essenzialmente due gruppi (figura 2.2):

- A) mutazioni che riguardano specificatamente il substrato
- B) mutazioni che impediscono la funzione di trasportatore

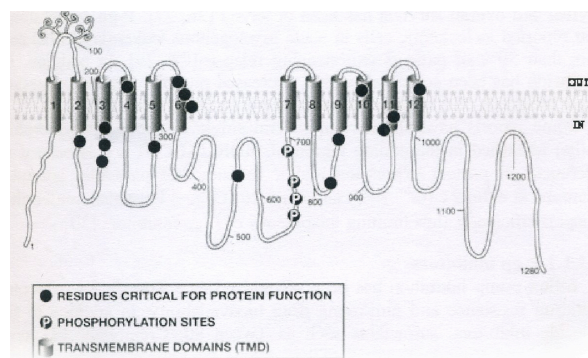


Figura B2.2. Struttura della glicoproteina-P.

Da questi studi si può concludere che le mutazioni a carico dei domini transmembrana giocano un ruolo vitale nel legame del farmaco; anche altre regioni sulla P-gP sono importanti per l'azione di trasporto, per esempio la regione di legame, che è essenziale per accoppiare l'attività ATPasica con il trasporto del farmaco, ma anche i domini di legame del substrato, che sono molto importanti per la funzione stessa di questa proteina trasportatrice.

Una serie di studi clinici ha collegato il fallimento di certi farmaci chemioterapici con l'espressione delle P-gP; si sa infatti, che queste glicoproteine sono ampiamente espresse in molti tipi di tumore, specialmente in quelli che derivano da tessuti che normalmente esprimono P-gP quali colon, reni, fegato, pancreas.

La P-gP è localizzata sulla membrana apicale di cellule epiteliali; in tessuti normali, la presenza di questa proteina sull'epitelio intestinale aiuta a prevenire l'entrata di farmaci tossici nel flusso sanguigno, nei tubuli renali e negli epatociti aiuta a eliminare i farmaci dal corpo, nel cervello, nei testicoli e nella placenta la P-gP aiuta a proteggere questi organi e il feto contro farmaci tossici.

L'elevata percentuale di tumori in cui si ha una sovraespressione di queste proteine ha suggerito l'associazione fra l'espressione della P-gP e la riduzione della risposta ai trattamenti. Si è pensato quindi allo sviluppo di inibitori di questa pompa di efflusso come strategia per superare la multi resistenza ai farmaci e testare la biodisponibilità di composti chemioterapici impiegati nel trattamento dei tumori. Esistono dei modulatori della pompa che potrebbero agire come competitori per il legame del substrato, alterando la fluidità della membrana o inibendo l'attività ATPasica.

Un approccio per superare il fenomeno di multi resistenza ai farmaci è quindi lo sviluppo di **specifici INIBITORI DELLE P-gP**. Inibire la P-gP con un modulatore di MDR potrebbe, infatti, risultare un efficace mezzo per aumentare l'assorbimento orale dei farmaci e perciò ridurre l'escrezione, permettendo così la penetrazione di farmaci in siti protetti dalla P-gP nell'organismo (cervello, cellule ematopoietiche, SNC). L'inversione della farmaco-resistenza attraverso agenti non tossici che bloccano l'attività di trasporto della P-gP MDR1 sarà un importante obiettivo per lo sviluppo farmaceutico: quando somministrati con un agente citotossico, questi composti non tossici, noti come modulatori di farmacoresistenza o agenti di inversione, accrescono nelle cellule tumorali l'accumulo netto di farmaci citotossici impiegati, permettendo anche una riduzione del dosaggio di farmaco somministrato e quindi una diminuzione degli effetti collaterali spesso correlati.

Lo studio dell'attività di trasporto di farmaci mediato dalla P-gP attraverso metodi non invasivi risulta di grande importanza:

- per lo sviluppo di nuovi modulatori;
- nelle applicazioni di terapia genica a protocolli di chemioterapia: l'espressione transgenica del gene MDR1 è stata studiata per la protezione di cellule ematopoietiche nel trattamento chemioterapico del cancro, in cui la P-gP svolge un ruolo protettivo delle cellule ematopoietiche progenitrici nei confronti della mielotossicità indotta da chemioterapia. Preliminari studi clinici hanno mostrato che cellule ematopoietiche trasdotte, attraverso trasferimento mediato da retrovirus del gene MDR1, presentano un'aumentata sopravvivenza in vivo dopo trattamento con farmaci MDR;
- per predire l'assorbimento orale, la farmacocinetica e la penetrazione di farmaci MDR in tessuti bersaglio e nel cervello.

Sono stati sviluppati molti inibitori specifici della P-gP, molti dei quali funzionano bene in culture cellulari, ma modelli in vitro hanno mostrato difficoltà nel passare alla fase clinica per gli effetti avversi causati dall'inibizione delle normali funzioni fisiologiche della P-gP in tessuti sani, sviluppando un'alta tossicità che limita l'applicazione di questi inibitori. Il primo identificato è stato il Verapamil, che agisce bloccando i canali del calcio, seguito dall'agente immunosoppressivo Ciclosporina A, antibiotici come l'Eritromicina, l'agente antimalarico Chinina, farmaci antisteroidi come il Tamoxifene e molti antagonisti della calmodulina. Questi agenti non sono stati sviluppati specificatamente per inibire la P-gP, dal momento che molti di essi sono substrati di altri trasportatori o sistemi enzimatici con il rischio, quindi, di interazioni farmacocinetiche imprevedibili. Ma soprattutto, la maggior parte di questi inibitori presenta una bassa affinità per le P-gP cosicché devono essere somministrati ad alto dosaggio causando importanti effetti collaterali dovuti alla tossicità associata.

E' stata successivamente sviluppata una più specifica generazione di inibitori della P-gP che include degli analoghi dei bloccanti del canale del calcio con un'attività farmacologica inferiore come il Dexverapamil, un derivato non immunosoppressivo della Ciclosporina A come il Valspodar (PSC833). Questi agenti sono dei potenti inibitori della P-gP, ma con una minore tossicità dovuta all'assenza di effetti farmacologici collaterali: il blocco della P-gP porta ad un incremento dei livelli di farmaci nel plasma.

Tutti questi composti hanno delle limitazioni, tra le quali l'osservazione che la co-somministrazione di un farmaco MDR inibisce significativamente il metabolismo (via citocromo P450) e l'eliminazione (attraverso i canalicoli biliari) di agenti citotossici. Inoltre la maggior parte degli inibitori descritti presenta affinità anche per altri trasportatori ABC; per esempio Valspodar inibisce sia la P-gP che MRP1. Perciò trasportatori con un bersaglio non specifico possono portare ad un aumento degli effetti avversi dei farmaci anti tumorali.

B2.4 Famiglia MRP

Un'iniziale descrizione del fenotipo MDR nelle cellule tumorali ha identificato la P-gP come il primo trasportatore multispecifico in grado di trasportare oltre la membrana un largo numero di composti cationici anfifilici. In seguito è stato scoperto che tumori multiresistenti raramente esprimono P-gP. Utilizzando linee cellulari selezionate con diversi farmaci antitumorali, è stata chiaramente dimostrata l'associazione fra la sovraespressione di nuovi ABC trasportatori e la resistenza. Ricerche effettuate da McGrath e coll. in linee cellulari resistenti alla Doxorubicina (HL60/ADR) hanno rivelato la presenza di un fenotipo resistente ai farmaci, anche se non sovraesprimevano P-gP.

La scoperta di una MDR senza la presenza di P-gP ha portato all'identificazione di un nuovo membro della famiglia ABC, una proteina di 190 kDa chiamata **MRP1** (multidrug resistance associated protein). Si tratta di una proteina prodotta dal gene ABCC1 (presente sul cromosoma 16p13.1) espressa in molte cellule tumorali resistenti. E' un trasportatore di molteplici composti, molti dei quali sono anche substrato della P-gP, con l'unica caratteristica di essere coniugati al glutatione (ad es. acido etacrinico). Sebbene MRP1 condivide con la P-gP meno del 15% della sequenza aminoacidica, il profilo MDR causato dalla sua sovraespressione è del tutto simile a quello dato dalla P-gP. MRP1 è composta da un grande segmento centrale ("core") simile a quello della P-gP (MSD1) e da un dominio idrofobico N-terminale (MSD0) collegato tramite un *loop* (L0) citoplasmatico al core; quest'ultimo presenta due domini per il legame del nucleotide (ATP), due domini transmembrana ciascuno dei quali composto da sei α -eliche, e un segmento di unione (L1)

localizzato tra MBD1 e MSD2 (figura 2.1). Sia P-gP che MRP1 sono delle proteine glicosilate; MRP1 è stato il primo membro identificato di una famiglia di nove proteine, tutte pompe anioniche lipofiliche.

Eccone una descrizione:

- **MRP1** è normalmente espressa nella membrana basolaterale delle cellule di testicoli, rene, mucosa orofaringea, dove agisce pompando i farmaci nella matrice extracellulare piuttosto che espellerli a livello biliare, urinario o intestinale. MRP1 è ampiamente espressa nelle leucemie, in carcinomi orofaringei e i suoi livelli di espressione sono stati messi in relazione ad evidenze cliniche; infatti, cellule che sovraesprimono questa proteina sono resistenti a un'ampia varietà di farmaci antitumorali come Etoposide, Doxorubicina, Epirubicina, Rodamina e alcuni anioni di metalli pesanti, incluso l'Antimonio tri- e pentavalente, Arsenite e Arseniato. MRP1 si lega a farmaci strutturalmente diversi coniugati al glutatione (GSH) o al glucuronato, portando a un aumento del trasporto di Antraciline, Alcaloidi della Vinca, Epipodofillotossine, Camptotecina e Metotrexato attraverso le membrane biologiche. L'accoppiamento al glutatione sembra giocare un ruolo critico nel trasporto dei substrati della MRP1; Vincristina e Daunomicina sono trasportate con GSH, mentre la proteina MRP1 non è in grado di trasportarli non modificati. L'abilità della MRP1 di trasportare i composti coniugati col glutatione, in associazione alla sua estesa espressione nei tessuti, indica che si tratta di una pompa GS-X ubiquitaria. Sebbene GSH si leghi alla proteina MRP1, GSH da solo non è substrato di nessun trasportatore ATP-dipendente in membrane che sovraesprimono MRP1. GSH può essere trasportato dalla MRP1 solo in presenza di una certa quantità di composto substrato MDR.

Il substrato con la più alta affinità per la proteina MRP1, noto da tempo, è il leucotriene C4 (LTC4), un importante mediatore della risposta infiammatoria. E' sintetizzato nelle mast-cellule, nei basofili, a livello renale e cerebrale, nei microsomi epatici e nelle cellule endoteliali e viene rilasciato da eosinofili e mast-cellule in risposta alle IgE prodotte nella cascata infiammatoria.

Sono stati condotti degli studi per determinare l'importanza dei vari domini strutturali della proteina e si è visto che il dominio L0 è essenziale per la funzione stessa di trasporto, tanto che è presente in tutti i membri della famiglia MRP. La generazione di mice privi del gene che codifica per la proteina MRP1, ha poi confermato il suo coinvolgimento nell'omeostasi del glutatione e nei processi infiammatori mediati da LTC4. Questi studi hanno anche indicato che i trasportatori P-gP e MRP1 contribuiscono significativamente allo sviluppo del fenomeno di resistenza a molti farmaci, ma soprattutto che entrambe le proteine non solo sono importanti nel determinare le caratteristiche farmacocinetiche di molti differenti agenti citotossici, ma anche che inibitori della P-gP e potenziali inibitori della MRP1 possono essere utilizzati per aumentare l'*uptake* di farmaci somministrati oralmente e per influenzare l'assorbimento a livello del sistema nervoso centrale.

Una cellula tumorale può sviluppare resistenza ai farmaci in modi differenti: può sovraesprimere i trasportatori a livello della membrana plasmatica cosicché i farmaci siano espulsi fuori dalle cellule, oppure può sequestrare i composti all'interno di organelli citoplasmatici impedendo così loro di raggiungere il bersaglio. Le cellule resistenti che accumulano i farmaci all'interno di compartimenti intracellulari, come i lisosomi, diventano sensibili agli agenti citotossici quando il meccanismo di intrappolamento viene perturbato; si può quindi pensare di prevenire la formazione di un fenotipo MDR in seguito al

sequestro del farmaco modificando il pH dei lisosomi in modo tale che questi rilascino il farmaco a livello citoplasmatico che è così libero di agire.

- **MRP2** è espressa nel fegato, rene, intestino e placenta; il suo coinvolgimento nei fenomeni MDR non è ancora stato determinato. La sua presenza è stata riportata in diversi tipi di tumore con un determinato profilo di resistenza a farmaci incluso il cancro colon-rettale (Camptotecina), cancro al seno e leucemia (Antracicline), carcinoma ovarico (cis-platino) e altri. MRP2 mostra un profilo di resistenza ai farmaci simile a quello della MRP1 in particolare modo verso Antracicline, Alcaloidi della Vinca, Epipodofillotossine e Camptotecine. Comunque, MRP2 sembra avere un'affinità più bassa per questi agenti e non è sovraespressa in linee cellulari che hanno sviluppato resistenza a prodotti naturali. MRP2 può conferire resistenza al cis-platino, mentre la sua sovraespressione è stata associata alla resistenza a questo farmaco in almeno una linea di cellule resistenti al cis-platino. Come per l'MRP1, il glutatione è importante anche per le proteine MRP2 nel mediare il trasporto di agenti anticancro idrofobici.
- **MRP3** è espressa in diversi tessuti incluso pancreas, placenta, intestino, fegato, reni e prostata. Sono state prese in considerazione diverse potenziali funzioni fisiologiche tra le quali proteggere gli epatociti colestatici e partecipare alla distribuzione degli xenobiotici in modo tale da influenzare il loro trasporto attraverso la membrana sinusoidale epatica. La presenza della MRP3 in diversi tipi di tumori suggerisce un suo possibile coinvolgimento nel fenotipo MDR. MRP3 mostra il più alto grado di somiglianza strutturale con MRP1 (58%) e la sua specificità di substrato coincide con le altre due proteine appartenenti alla famiglia MRP, soprattutto per quanto riguarda il trasporto di substrati coniugati con il glutatione e il glucuronato; comunque il profilo di farmaci trasportati è solo limitatamente comparabile a quello della MRP1 e della MRP2, dal momento che solamente l'Etoposide e gli Antifolati sono stati confermati come farmaci nel profilo di resistenza della pompa.
- **MRP4** è un trasportatore anionico organico ampiamente espresso in tessuti normali e particolarmente nella prostata; è presente in molte linee cellulari NCI-60, sebbene il suo ruolo nel cancro non sia ancora stato stabilito. MRP4 è in grado di trasportare gli stessi substrati della MRP1 come coniugati con il glutatione, Folati e Metotrexato; come substrati fisiologici troviamo Prostaglandine, Acido Urico e steroidi-solfati; trasporta poi anche nucleotidi ciclici, caratteristica condivisa con MRP5 e MRP8, analoghi di basi nucleotidiche (6-mercaptopurina e 6-tioguanina), analoghi di nucleotidi (come PMEA) e analoghi di nucleosidi (come l'antivirale Ganciclovir).
- **MRP5** è largamente espressa ma a bassi livelli e conferisce resistenza ad agenti anticancro come 6-mercaptopurina e 6-tioguanina, 5-fluoro-2-deossiuridina-5-monofosfato (FdUMP) e Metotrexato e nucleotidi ciclici.
- **MRP6** è altamente espressa nel fegato e nei reni; è stato dimostrato che è in grado di conferire bassi livelli di resistenza a Etoposide, Teniposide, Antracicline e cis-platino.

- **MRP7** è espressa nel pancreas e sovraespressa in associazione alla resistenza ai Taxani come il Docetaxel e il Paclitaxel.
- **MRP8** e **MRP9** condividono simili caratteristiche strutturali con MRP4.
MRP8 è espressa nel fegato, seno, prostata e testicoli; è direttamente coinvolta nella resistenza al Metotrexato e a FdUMP attraverso il loro trasporto in senso espulsivo e, come MRP4 e MRP5, è anche in grado di incrementare l'estrusione di nucleosidi ciclici e quindi conferire resistenza agli analoghi dei nucleosidi. Infine MRP9 è espressa nel seno e nei testicoli; si è vista la sua presenza in nove dei dodici casi di cancro al seno presi in considerazione negli studi effettuati.

Inibitori di MRP

Nelle cellule tumorali esistono numerosi meccanismi di MDR, come quella intrinseca o quella acquisita. Molti modelli di cancro, selezionati senza farmaco, esprimono alti livelli della proteina MRP1. E' importante prendere in considerazione la possibilità che i trattamenti chemioterapici di pazienti con cancro possano indurre l'espressione di proteine MRP1 endogene, dal momento che se consideriamo cellule tumorali selezionate in un mezzo che contiene farmaci anticancro, queste possono sovraesprimere MRP1 ed esibire resistenza a molti agenti citotossici.

Cellule sensibili a farmaci transfettate con il gene umano che codifica per la proteina MRP1 diventano resistenti. La sovraespressione di questo trasportatore porta a un'esportazione di glutatione due volte maggiore rispetto alle cellule progenitrici di controllo; da studi si è infatti visto che MRP1 è responsabile della diffusione del glutatione. Un modo per annullare la MDR a farmaci anticancro in cellule che esprimono MRP1 è quello di esaurire le riserve intracellulari di glutatione con butionina sulfossimmina (BSO), riducendo in tal modo il trasporto di farmaci anti tumorali come Daunomicina, Doxorubicina, Etoposide e Vincristina.

Per superare il fenomeno di MDR causato da MRP1 si possono anche impiegare degli inibitori dell'enzima GST (Glutatione-S-transferasi); MRP1 è coinvolta nella MDR mediando sia l'efflusso di farmaci coniugati al glutatione che attraverso il co-trasporto di glutatione libero. L'azione della glutatione-S-transferasi è necessaria per formare i coniugati al glutatione, mentre una sovraespressione dell'enzima è stata associata allo sviluppo di resistenza a farmaci chemioterapici. Sono stati fatti quindi degli studi per cercare di sviluppare degli inibitori dell'enzima GST lavorando su due gruppi di composti: molecole che mimino il GSH e molecole che imitano i coniugati col glutatione. Dal momento che la funzione della P-gP è indipendente dalla presenza di glutatione, ci si aspetta che queste molecole siano più selettive per MRP1. Mentre sono disponibili diversi efficaci inibitori e/o modulatori della P-gP, solo pochi sono stati descritti per la proteina MRP1. Comunque, per le somiglianze strutturali e funzionali tra P-gP e MRP1, si può facilmente capire come la maggior parte degli inibitori e/o modulatori riportati per la P-gP siano stati testati per i loro effetti sulla MRP1; studi sono stati condotti sul Verapamil e sulla Ciclosporina, farmaci ben noti. Sfortunatamente, la maggior parte degli inibitori della P-gP ha mostrato una scarsa attività nei confronti della MRP1 (i substrati della P-gP sono idrofobici, mentre quelli della MRP1 sono generalmente idrofilici). Schering AG ha comunque sviluppato un derivato chinolinico (MS-209) che inibisce entrambi i trasportatori ed è ora sottoposto a controlli clinici per il trattamento del cancro al seno e ai polmoni.

B2.5 Proteina resistente al cancro al seno (BCRP/ABCG2)

Linee cellulare tumorali, selezionate utilizzando un mezzo che contiene farmaci come Mitoxantrone, Topotecan e Daunorubicina, sono state isolate e mostrano resistenza a questi farmaci in assenza di sovraespressione di proteine trasportatrici P-gP o MRP1. La proteina che sviluppa resistenza nel cancro al seno (breast cancer resistance protein, BCRP/ABCG2), anche conosciuta come ABCP o MXR, è un altro trasportatore di efflusso appartenente alla superfamiglia delle proteine ABC, insieme alla P-gP e alla MRP1. BCRP è chiamato mezzo-trasportatore in quanto funziona come omodimero o tetramero unito da ponti disolfuro; la funzione di trasportatore richiede la dimerizzazione della proteina. Questa pompa di efflusso di 72 kDa (655 amminoacidi) è una proteina ABC che contiene un singolo dominio citosolico NH₂-terminale per il legame del nucleotide (NDB), responsabile dell'idrolisi dell'ATP. Ci sono poi sei domini transmembrana (TMDs) coinvolti nel legame del farmaco e nell'efflusso. Sebbene sia stato proposto un doppio sito di glicosilazione per la BCRP, né l'espressione né la funzione di trasporto richiedono la glicosilazione.

BCRP è stata inizialmente clonata dalla placenta e da cellule di tumore al seno multiresistenti ai farmaci che non esprimevano P-gP o MRP1; comunque questo termine è un po' fuorviante dal momento che l'espressione di questo gene non è limitata al seno e/o a cellule tumorali. Successivamente sono stati clonati altri gruppi di BCRP cDNA chiamati ABCP (placental ABC protein) e MXR (mitoxantrone resistance protein).

BCRP è espressa prevalentemente in organi importanti per l'assorbimento (il piccolo intestino), la distribuzione (la placenta e la barriera ematica cerebrale) e l'eliminazione (il fegato e il piccolo intestino) dei farmaci. Questo trasportatore di efflusso è stato trovato anche nelle cellule staminali, in alcune cellule tumorali e nella membrana apicale di epitelii coinvolti nella distribuzione dei farmaci. La sua espressione è stata anche riscontrata in numerosi tipi di tumori, inclusi quelli solidi e neoplasie ematologiche.

E' stato dimostrato che l'espressione della BCRP può essere associata ad una bassa risposta ai trattamenti chemioterapeutici ed è anche stato stabilito che questo trasportatore ha un'ampia specificità di substrato; può infatti mediare l'efflusso di molecole idrofobiche, cariche sia positivamente che negativamente, ma anche di composti citotossici e vari componenti della dieta (ad esempio la Protoporfirina), alcuni dei quali carcinogeni.

BCRP ha importanti ruoli fisiologici, inclusi la protezione di tessuti umani contro agenti xenobiotici e in caso di ipossia, oltre che nella modulazione dell'assorbimento e della distribuzione dei farmaci. Al contrario, la sovraespressione di questa proteina nelle cellule tumorali è il maggior impedimento ai trattamenti chemioterapici.

Inibitori di BCRP

Studi recenti si sono focalizzati sulla ricerca di inibitori della proteina BCRP; è interessante notare che è in grado di trasportare diversi substrati della P-gP ma non viene bloccata dagli inibitori della P-gP, incluso il Verapamil e la Ciclosporina A. Dalla scoperta della BCRP, sono stati fatti molti sforzi per progettare inibitori di questa proteina che agissero come modulatori MDR in vivo.

La Fumitremorgina C (FTC), una micotossina di *Aspergillus fumigatus*, è un inibitore relativamente specifico della BCRP, capace di invertire il fenomeno di resistenza a farmaci, come il Titoxantrone ed il topotecan, che si instaura in cellule che sovraesprimono BCRP. E' stato dimostrato che FTC inibisce direttamente il trasporto di substrati fluorescenti, come la Rodamina 123, come pure l'attività ATPasica della BCRP. Essendo una tossina presenta però effetti

neurotossici e quindi non può essere applicata nella pratica clinica. Sono stati quindi sviluppati degli analoghi con potenti effetti inibitori e una bassa tossicità in vivo.

GF120918, inizialmente caratterizzato come inibitore della P-gP, è ora conosciuto anche per la sua attività sulla BCRP; un inibitore non specifico può risultare vantaggioso, dal momento che due trasportatori con un'ampia distribuzione e specificità di substrato possono essere simultaneamente bloccati utilizzando un solo agente. Alcuni studi hanno anche dimostrato che questo composto, che è un derivato di un acridone, è idoneo all'uso clinico.

La più recente generazione di agenti chemioterapici è rappresentata dagli inibitori delle Tirosin-chinasi, molti dei quali sono potenti inibitori delle BCRP, che agiscono interrompendo l'attivazione a cascata di segnali cellulari mediata da questi enzimi, prevenendo così la crescita tumorale e lo sviluppo di metastasi.

B2.6 Studi clinici sugli inibitori di MDR

La chemioterapia rimane una delle principali strategie per il trattamento del cancro. Solo pochi farmaci possono essere utilizzati da soli; la maggior parte dei trattamenti, infatti, prevede la somministrazione di più composti in combinazione. Nonostante i progressi ottenuti in questo campo, si hanno tutt'ora pochi successi con la chemioterapia. Ciò è dovuto a due fattori principali: scarsa efficacia dei farmaci anticancro oppure un'iniziale riduzione della massa tumorale durante la chemioterapia seguito da una ricaduta con conseguente inefficace trattamento chemioterapico.

La risposta adattativa delle cellule tumorali nel produrre un fenotipo resistente è un processo complesso che implica l'attivazione di numerosi segnali cellulari. Il fenotipo risulta essere multifattoriale dal momento che numerose vie sono coinvolte e che queste spesso agiscono in modo sinergico. E' infatti necessario superare la seguente sequenza di eventi per garantire l'efficacia del farmaco antitumorale: captazione cellulare, sfuggire al sequestro o all'inattivazione metabolica, interazione con il target molecolare, sfuggire ai segnali di riparazione e indurre apoptosi. Le vie di resistenza ai farmaci presentano barriere a uno o più di questi eventi e possono essere classificate in tre gruppi. Il primo dà luogo ad alterate proprietà farmacocinetiche del farmaco (distribuzione, *uptake*, metabolismo ed eliminazione) sia a livello dei tessuti tumorali che in quelli normali. Il secondo gruppo agisce sulle proprietà farmacodinamiche dei composti citotossici ostacolando l'azione desiderata del farmaco (ad esempio diverso target farmacologico). Infine, nelle cellule tumorali si può avere una soppressione del segnale di attivazione dell'apoptosi. E' quindi appropriato vedere la resistenza come un fenotipo dinamico, il cui obiettivo primario è quello di annullare l'efficacia dei farmaci, senza uno specifico meccanismo.

La MDR è un fenomeno nel quale cellule tumorali *in vitro* che sono state esposte ad un agente citotossico sviluppano resistenza crociata ad un'ampia varietà di composti non correlati dal punto di vista funzionale e strutturale. La resistenza ai farmaci che si sviluppa nelle cellule tumorali è spesso dovuta all'elevata espressione di particolari proteine, come i trasportatori cellulari di membrana, con conseguente incremento dell'efflusso dei composti citotossici che si traduce in un abbassamento della loro concentrazione intracellulare. Il fenomeno multi-resistente ai farmaci può anche essere intrinseco in alcuni tumori, senza una precedente esposizione ad agenti chemioterapici. Nei tessuti neoplastici, infatti, l'espressione della P-gP è solitamente più elevata nei tumori che derivano da tessuti che normalmente esprimono questa proteina, come le cellule epiteliali del colon, reni, pancreas, fegato, suggerendo quindi una potenziale resistenza agli agenti citotossici ancor prima dell'inizio della chemioterapia. In altri tumori, invece, l'espressione della P-

gP può essere bassa al momento della diagnosi, ma aumentare dopo esposizione a composti chemioterapici.

I farmaci citotossici che sono più frequentemente associati alla MDR sono idrofobici, prodotti naturali anfipatici come i Taxani (Paclitaxel, Docetaxel), Alcaloidi della Vinca (Vinorelbina, Vincristina, Vinblastina), Antracicline (Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina), Epipodofillotossine (Etoposide, Teniposide), Topotecan, Dactinomicina e Mitomicina C.

Gene	Nome comune	Distribuzione tissutale	Substrati	Antagonisti/inibitori
ABCB1	P-gP/ MDR1	Fegato, rene, intestino, cervello, placenta	Antracicline, taxani, alcaloidi della vinca, imatinib, etoposide, geldanamicina, depsipeptide	Verapamil, PSC833, ciclosporina A
ABCC1	MRP1	ubiquitaria	Antracicline, metotrexato, camptotecina, coniugati del glutazione	MK571, indometacina, probenecid, ciclosporina A, verapamil
ABCC2	MRP2/ cMOAT	Fegato, intestino, rene	Doxorubicina, metotrexato, cisplatino, vincristina	MK571, indometacina, ciclosporina A, verapamil
ABCC3	MRP3	Fegato, intestino, rene	Etoposide, metotrexato, vincristina	MK571, glicocolato
ABCC4	MRP4	ubiquitaria	Metotrexato, tiopurine, camptotecine	MK571, diclofenac
ABCC5	MRP5	ubiquitaria	6-mercaptotiopurina, 6- tioguanina, metotrexato	MK571
ABCC6	MRP6	Fegato, rene	Antracicline	non noto
ABCG2	BCRP	Fegato, intestino, placenta, seno, cuore, rene	Doxorubicina, mitoxantrone, topotecan, flavopiridolo, SN-38	Fumitremorgina C, ciclosporina A, gefitinib, imatinib, tamoxifen, Ko143, GF120918

Tabella B2.1. Trasportatori ABC importanti nella chemioresistenza.

Il largo numero di composti che interagisce con la P-gP ha portato all'ipotesi della presenza di numerosi siti di legame. La presenza di almeno quattro distinti siti sulla P-gP è stata determinata utilizzando dei saggi di legame con radioligandi. Tre siti sono stati caratterizzati per il trasporto in quanto interagiscono con substrati (Vinblastina, Paclitaxel, Rodamina) e modulatori (XR9576, XR9051), mentre il sito IV ha funzione regolatoria; qui vi agiscono come modulatori Elacridar e Nicardipina. I quattro siti sono in grado di comunicare allostericamente e il legame ad uno di questi porta gli altri ad assumere una conformazione a bassa affinità.

La P-gP agisce fisiologicamente come prima linea di difesa in molte barriere; il meccanismo di interazione con i farmaci permette di predire la sua attività farmacologica e determinare il profilo farmacocinetico.

I composti che interagiscono con la P-gP possono essere strutturalmente suddivisi in tre gruppi: substrati, modulatori e inibitori. Vengono considerati substrati le molecole che sono attivamente trasportate dalle proteine e che quindi hanno una più alta concentrazione fuori della cellula rispetto

al compartimento citosolico. I modulatori agiscono sul sito di legame riducendo il legame del substrato attraverso un'interazione allosterica negativa; ciò è stato dimostrato attraverso degli studi con radioligandi che alterano il legame del substrato in modo non competitivo, dal momento che viene ridotta la risposta massima (B_{max}) che si può ottenere in seguito all'interazione recettore-ligando ma non la costante di dissociazione (K_d). Questo dimostra che i modulatori interagiscono con la P-gP in un sito diverso da quello in cui agiscono i substrati, suggerendo l'esistenza di vie di comunicazione allosterica tra i siti di legame del substrato e del modulatore.

Gli inibitori hanno fornito ulteriori informazioni sul meccanismo di traslocazione della P-gP. Inizialmente si ha il legame dei farmaci ad un sito ad alta affinità e simultaneamente l'interazione dell'ATP al sito NBD; ciò determina un riorientamento del sito di legame con conseguente rilascio del farmaco. Gli inibitori interferiscono con questo step di legame del substrato o del nucleotide bloccando l'azione di trasporto della P-gP.

Modulatori e inibitori portano allo stesso effetto biologico finale, ristabilendo la sensibilità agli agenti chemioterapici. Perciò, in campo oncologico, gli agenti chemioterapici vengono cosomministrati con un modulatore o un inibitore con lo scopo di invertire la farmacoresistenza.

Nelle malattie neurodegenerative, substrati, modulatori e inibitori sono strumenti adatti per indagare la funzionalità e l'espressione della P-gP nelle barriere biologiche. Per valutare l'attività della P-gP è richiesta la somministrazione di substrati sia da soli che in combinazione con un modulatore, mentre gli inibitori possono essere impiegati come radiotraccianti per rilevare l'espressione della proteina. Questi possono essere somministrati da soli o in presenza di sostanze che agiscono sullo stesso target (ad esempio un eccesso di composto non marcato). E' quindi importante stabilire, tramite specifici saggi biologici, se questi agenti agiscono con la P-gP come substrati, modulatori o inibitori. Numerosi metodi sono stati impiegati per caratterizzare l'interazione dei farmaci con la P-gP, utilizzando cellule intatte o proteine purificate; spesso è richiesta una combinazione di differenti approcci per identificare il meccanismo di interazione.

Per indagare l'interazione e il trasporto di questi nuovi agenti chimici con la P-gP possono essere utilizzate diverse linee cellulari che esprimono la proteina: *human colonic carcinoma cells* (CaCo-2), *Madin-Darby canine kidney cells* (MDCK), T8, LLC-PK1 e HCT-8. In particolar modo la linea cellulare transfettata MDCK, esprime P-gP, mostra un'elevata espressione dei livelli del trasportatore; queste cellule possono poi essere facilmente manipolate per la sovraespressione e coespressione di altre pompe di efflusso. Le cellule transfettate presentano diversi vantaggi rispetto ad altre linee cellulari, come le CaCo-2, utilizzate in saggi biologici simili; i livelli di espressione della P-gP in queste cellule sono infatti più elevati e stabili e i dati di efflusso sono più riproducibili, anche se un limite potrebbe essere l'espressione di P-gP canine (struttura per l'81% simile a quella delle P-gP umane) che può complicare l'interpretazione dei risultati ottenuti.

La presenza di P-gP sulla membrana apicale delle CaCo-2 permette di utilizzare questa linea cellulare come modello per l'assorbimento di alimenti e farmaci nel tratto gastrointestinale. Le cellule CaCo-2, ottenute da carcinoma al colon umano, esprimono elevati livelli di P-gP, sebbene non siano un buon modello per descrivere l'efflusso dei farmaci nel tessuto normale.

Inoltre la presenza di altri trasportatori, come MRP2 e BCRP, possono influire sull'interpretazione dei dati. In queste cellule il composto testato può essere utilizzato come radiotracciante per valutare la radioattività all'interno della cellula, nel doppio strato fosfolipidico delle membrane o al di fuori del compartimento endocellulare. Il basso accumulo intracellulare e l'elevata concentrazione extracellulare fanno sì che il composto sia classificato come substrato della P-gP.

La valutazione dell'effetto inibitorio è ottenuta tramite la misurazione della radioattività nel doppio strato fosfolipidico delle membrane sia in presenza che in assenza di inibitori. Infatti, in presenza di un agente non marcato, la radioattività diminuisce rispetto alla quantità rilevata con il solo radioattivo. Un modulatore può essere meglio studiato se somministrato con un substrato radiomarcato; in questo modo la sua efficacia è correlata all'aumento della concentrazione intracellulare del substrato.

Questo tipo di studio può anche essere ottenuto somministrando un inibitore insieme ad un substrato. Comunque i risultati ottenuti dagli studi *in vivo* hanno dimostrato che la cosomministrazione è meno efficace, in quanto l'inibitore è in grado di bloccare la pompa nella sua funzione di trasporto ma non può modificare l'elevata affinità del substrato per il sito di legame.

L'ampio spettro di composti che la P-gP è in grado di trasportare, facilita lo sviluppo del fenomeno della farmacoresistenza; allo stesso tempo inibire questa pompa di efflusso porta ad un aumento dell'accumulo intracellulare di farmaci antitumorali, ristabilendo così la sensibilità delle cellule neoplastiche alla chemioterapia.

Gli inibitori MDR sono stati classificati in tre gruppi, in accordo con la strategia impiegata per la loro scoperta.

Prima generazione: agenti farmacologici già noti

Si è pensato che la P-gP potesse trasportare farmaci già in uso nella pratica clinica che non fossero citotossici; questi composti potrebbero competere per il trasporto con i farmaci antitumorali, portando ad un aumento della loro concentrazione intracellulare e ristabilendo la chemiosensibilità.

Il primo tentativo di superare la resistenza mediata dalla P-gP con questa strategia, è stato fatto utilizzando il **Verapamil**, un bloccante i canali del calcio. Si è visto come questo farmaco potenzi la citotossicità di Alcaloidi della Vinca e Antracicline nella linea cellulare leucemica P388. Sebbene queste cellule esprimano elevati livelli di P-gP, la resistenza si sviluppa dopo una lunga esposizione a farmaci antitumorali. In studi successivi è stato dimostrato come il Verapamil porti ad un aumento dell'accumulo di agenti chemioterapici all'interno delle cellule, suggerendo un'azione attraverso l'inibizione della P-gP.

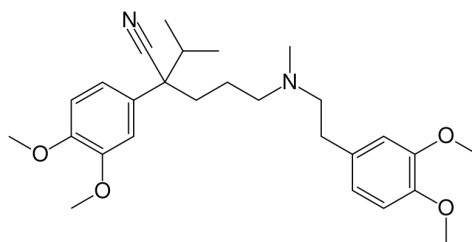


Figura B2.3. Verapamil.

Per studiare l'effetto del Verapamil, Cordobes et coll. hanno utilizzato due differenti linee cellulari: una che esprime elevati livelli di P-gP (MCF7 mdr^+) e un'altra che invece non esprime P-gP (MDAMB231 mdr^-). Hanno visto come il Verapamil incrementi l'uptake del radiotracciante ^{99m}Tc -Sestamibi maggiormente (12 volte in più) nelle cellule che esprimono elevati livelli di P-gP rispetto a quelle che non lo esprimono. Il Verapamil può sia stimolare (se la pompa è inattiva), che inibire (se invece è attiva) l'attività della P-gP, andando a legarsi reversibilmente al trasportatore e

impedendo in questo modo il legame di molti agenti terapeutici tramite un meccanismo di inibizione competitiva. L'entusiasmo iniziale nei confronti del potenziale del Verapamil nell'inibire la P-gP era tale che il farmaco presto entrò negli studi clinici. I risultati non sono stati però soddisfacenti a causa della sua cardiotoxicità, che induce ipotensione attraverso il blocco dei canali del calcio; l'attività cardiovascolare del Verapamil limita infatti la dose massima tollerabile, cosicché le concentrazioni richieste per modulare la MDR (2-6 μM) portano ad un'inaccettabile cardiotoxicità.

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato che non esiste una correlazione tra l'attività inibitrice e quella calcio antagonista. Il verapamil è diventato il composto *lead* per lo sviluppo di molteplici modulatori con la speranza di perdere l'attività cardiovascolare mantenendo invece quella modulante l'MDR. Derivati del Verapamil includono il suo R-enantiomero (Dexverapamil) che è 10 volte meno attivo come calcio antagonista ma equipotente all' S-verapamil nell'invertire la farmacoresistenza. Anche il Nordexverapamil, un metabolita del dexverapamil, ha mostrato un'attività simile. Gli studi clinici sul Dexverapamil sono però stati bloccati per l'elevata tossicità intrinseca nonostante il basso effetto sui canali del calcio, se comparato al Verapamil.

Successivi studi hanno dimostrato che molti altri chemiosensibilizzatori agiscono in modo simile al Verapamil, con differente potenza o interagendo in siti diversi della glicoproteina. Perciò il Verapamil è stato utilizzato come agente standard per confrontare il meccanismo e la potenza dei successivi modulatori per il loro potenziale impiego nella pratica clinica. Sono state effettuate anche delle analisi struttura-attività di analoghi del Verapamil ed è stato scoperto che Ro11-2933 è dieci volte più potente nell'inibire la resistenza alla Doxorubicina. Dal momento dell'identificazione dei bloccanti il canale del calcio come possibili substrati della P-gP, numerosi studi si sono focalizzati sull'attività dei derivati della diidropiridina come modulatori di MDR portando alla scoperta di potenti inibitori come Deniludipina, Nicardipina e PAK-200. Tra i bloccanti i canali del calcio, la Chinidina è considerata uno dei più promettenti agenti con attività modulante la MDR per il potenziale utilizzo clinico; tuttavia, uno studio di fase III ha confermato la sua inefficacia come inibitore della resistenza alla Epirubicina nel trattamento di cancro al seno metastatico, mentre è ancora utilizzata come agente antiaritmico.

Anche l'agente immunosoppressivo **Ciclosporina A** è stato analizzato per la sua abilità nel superare la resistenza mediata dalla P-gP. La Ciclosporina A potenzia la citotossicità della Vincristina e della Doxorubicina con un meccanismo che incrementa la concentrazione intracellulare della Daunorubicina e degli Alcaloidi della Vinca. Sembra infatti agire attraverso una riduzione dell'interazione dei farmaci antitumorali con la P-gP tramite un meccanismo di competizione per il trasportatore, dal momento che le cellule che esprimono P-gP mostrano anche un basso accumulo di Ciclosporina A. Come per il Verapamil, la concentrazione richiesta per ristabilire la sensibilità ai farmaci antitumorali è però più elevata dei massimi livelli tollerabili *in vivo*.

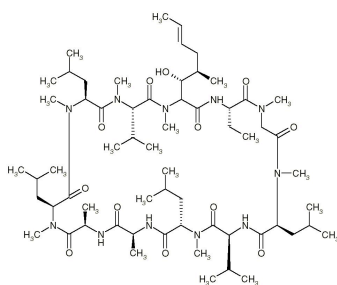


Figura B2.4. Ciclosporina.

Studi successivi hanno dimostrato che la Ciclosporina A oltre ad inibire la P-gP, modula anche la MRP1; si è quindi ipotizzato che il suo ampio spettro possa contribuire all'efficacia clinica. Se messi a confronto con modulatori specifici per una certa proteina ABC, questi modulatori MDR ad ampio spettro hanno il vantaggio di superare il meccanismo di resistenza multiplo che si può sviluppare in cellule tumorali maligne. Sia i modulatori specifici che quelli ad ampio spettro hanno vantaggi teorici nella modulazione clinica della MDR; la farmacoresistenza sembra essere multifattoriale e la reale modulazione potrebbe richiedere l'interazione con diverse proteine trasportatrici. L'uso di un singolo modulatore ad ampio spettro può essere preferibile all'impiego combinato di specifici inibitori per prevenire l'interazione con i farmaci e l'accumulo di tossicità. D'altra parte l'uso di specifici modulatori può minimizzare l'interazione non voluta con trasportatori non-bersaglio e ridurre al minimo gli effetti sui tessuti non tumorali come le normali cellule staminali emopoietiche, i canalicoli biliari e la barriera ematica cerebrale.

La prima generazione di inibitori ha fornito importanti informazioni:

- P-gP può essere inibita *in vitro*;
- P-gP è poli-specifica ma con una definita selettività;
- inibitori della P-gP con bassa affinità risultano inefficaci nella pratica clinica.

Per superare queste limitazioni, numerosi nuovi analoghi dei primi modulatori sono stati testati e sviluppati con lo scopo di ottenere degli agenti con una minore tossicità e una più elevata potenza.

Seconda generazione: modificazione dei farmaci di prima generazione

Il successo della Ciclosporina A ha portato allo sviluppo di composti correlati strutturalmente o derivati con un ruolo simile; sono stati infatti esaminati numerosi agenti, con o senza attività immunosoppressiva, per la loro abilità nel superare la farmacoresistenza *in vitro*. È divenuto chiaro che l'attività immunosoppressiva non era un prerequisito per inibire la P-gP. Il meglio caratterizzato e più studiato di questi agenti è il **Valspodar** (PSC833), un non-immunosoppressivo derivato della Ciclosporina D che inibisce la P-gP con un'attività 10-20 volte maggiore rispetto alla Ciclosporina A; si è visto come sia in grado di invertire la resistenza nei confronti di un ampio spettro di farmaci inclusi Alcaloidi della Vinca, Antracicline, e Colchicine. Mentre Valspodar dimostra una potente inibizione della P-gP, sembra allo stesso tempo non avere un'elevata selettività, dal momento che inibisce anche l'attività di altri ABC trasportatori. Questa bassa selettività ha delle considerevoli implicazioni per lo sviluppo clinico del composto soprattutto in relazione all'ampia distribuzione degli ABC trasportatori nei tessuti normali, in particolare nei siti di eliminazione dei farmaci.

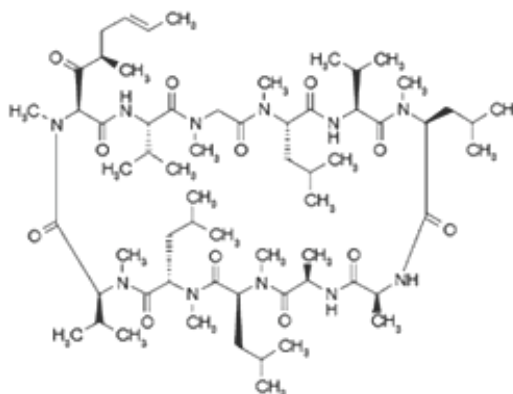


Figura B2.5. Valspodar.

In uno studio di fase I, la combinazione di Valspodar con Etoposide, Doxorubicina, Paclitaxel o Vinblastina ha portato ad un'elevata tossicità, dando luogo ad atassia cerebrale reversibile, mielosoppressione ed iperbilirubinemia. Si è visto inoltre che Valspodar interagisce con la proteina deputata al trasporto dei sali biliari e con il citocromo P450, diminuendo l'eliminazione degli agenti anticancro; queste interazioni richiedono una riduzione del dosaggio dei farmaci. La somministrazione orale di Valspodar insieme ad un'infusione di Vinblastina in pazienti con carcinoma renale avanzato (studio clinico di fase I) ha dato una risposta parziale o completa. In uno studio di fase I/II si sono poi somministrati entrambi i composti per via endovenosa e si è visto che un dosaggio inferiore di quello precedentemente raccomandato era sufficiente ad inibire l'attività di trasporto mediata dalla P-gP. Questa riduzione ha permesso l'impiego di più elevate dosi di agente chemioterapeutico come risultato di una ridotta inibizione del metabolismo dei farmaci, principalmente mediato dal citocromo P450.

Valspodar è stato anche cosomministrato con Idarubicina, Citarabina ed Etoposide in AML (acute myelogenous leukemia) refrattaria e, sebbene interazioni farmacocinetiche erano possibili, il composto non ha in realtà modificato la biodisponibilità della Idarubicina. In uno studio di fase III la somministrazione di Valspodar in combinazione con Paclitaxel e Carboplatino non ha fornito risultati promettenti ed è anzi risultata più tossica nel trattamento del cancro ovarico e peritoneale, se comparata alla somministrazione del Carboplatino da solo. Anche la combinazione con Vincristina, Doxorubicina e Desametazone in pazienti con mieloma multiplo refrattario non ha portato a risultati positivi con relativo incremento della tossicità.

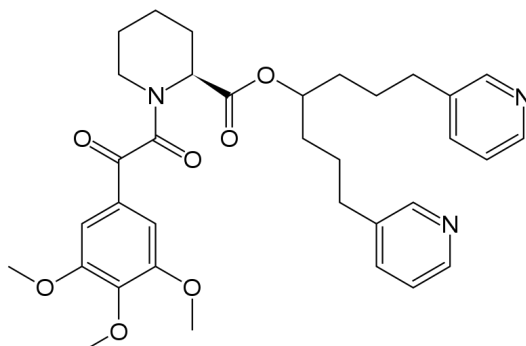


Figura B2.6. Biricodar.

Anche il derivato pipercolinato **Biricodar** (VX-710) ha mostrato di poter invertire la resistenza alla Doxorubicina, Vincristina Etoposide e Paclitaxel *in vitro*. Come molti inibitori di seconda generazione, Biricodar agisce modulando anche l'attività della proteina ABCC1; questa non selettività potrebbe risultare problematica negli studi clinici, dal momento che la proteina trasportatrice sembra avere un ruolo importante nelle vie di eliminazione e metabolismo dei farmaci. Se somministrato col farmaco citotossico, inibendo la proteina ABCC1 deputata all'eliminazione dei composti chemioterapici, il Biricodar impedisce anche la degradazione dell'agente anticancro.

In uno studio di fase I la cosomministrazione del composto con la Doxorubicina non ha portato ad alcuna limitazione farmacocinetica o farmacodinamica e la combinazione è ben tollerata. Biricodar è stato anche associato alla Doxorubicina e alla Vincristina in uno studio di fase II in pazienti con SCLC (small cell lung cancer) refrattario; questa combinazione ha portato a una più alta incidenza e severità di neutropenia, se messo a confronto con i risultati ottenuti dagli studi di

fase I. Se somministrato con Paclitaxel in pazienti con cancro al seno in fase avanzata o con cancro ovarico refrattario si ha un incremento dell'incidenza di neutropenia, effetto probabilmente dovuto all'aumento della mielosoppressione dato dalla Vincristina. Il Biricodar inibisce sia la P-gP che la MRP1, ma i livelli di P-gP in SCLC sono più bassi rispetto all'espressione della MRP così da presupporre che altri trasportatori possano essere presenti, portando a una bassa efficacia del composto. E' quindi necessario effettuare altri studi per stabilire l'espressione di trasportatori MDR, tramite biopsia, per selezionare i pazienti con più alta probabilità di ottenere benefici dai trattamenti clinici.

La seconda generazione di modulatori P-gP presenta un migliore profilo farmacologico rispetto ai precedenti composti, ma mantiene comunque alcune caratteristiche che ne limitano l'uso clinico. In particolare questi composti inibiscono significativamente il metabolismo e l'escrezione degli agenti citotossici, portando così ad un'inaccettabile tossicità che ha richiesto la riduzione del dosaggio nella sperimentazione clinica. Molti degli agenti citotossici che sono trasportati dalla P-gP sono anche substrato del citocromo P450 nella sua isoforma 3A4. Non sorprende quindi che i composti che portano allo sviluppo della MDR sono anche metabolizzati dal citocromo P450 3A4; molti degli inibitori P-gP di seconda generazione, inclusi Valspodar e Biricodar, sono substrati di questo enzima.

La competizione tra gli agenti citotossici e questi modulatori P-gP per l'attività del citocromo P450 porta a delle imprevedibili interazioni farmacocinetiche. Per esempio, Valspodar inibisce il citocromo P450 responsabile del metabolismo del Paclitaxel e della Vinblastina, portando ad un incremento delle concentrazioni intracellulari degli agenti citotossici ed esponendo potenzialmente il paziente al rischio di una sovraesposizione ai farmaci antitumorali. Similmente, in studi di farmacocinetica in pazienti con tumori solidi, Biricodar somministrato in infusione endovenosa nelle ventiquattro ore, diminuisce l'eliminazione del Paclitaxel in maniera dose-dipendente. Per superare queste interazioni farmacocinetiche, si è provveduto a diminuire il dosaggio dell'agente citotossico; bisogna comunque tener presente che dal momento che le interazioni farmacocinetiche tra gli inibitori e gli agenti citotossici non sono prevedibili, riducendo il dosaggio del farmaco si potrebbe avere un sotto- o sovra-dosaggio in un significativo numero di pazienti. I non prevedibili effetti dei modulatori di seconda generazione sul citocromo P450 3A4 responsabile del metabolismo dei farmaci, hanno portato a delle difficoltà nello stabilire un dosaggio sicuro ma efficace degli agenti chemioterapici cosomministrati, limitando il loro utilizzo nei tumori multi-resistenti.

Oltre ad inibire la P-gP, molti modulatori agiscono anche come substrato di altri trasportatori, particolarmente quelli appartenenti alla famiglia ABC, la cui inibizione può risultare in una riduzione dell'abilità delle normali cellule e tessuti di proteggersi dagli agenti citotossici. Molti di questi trasportatori hanno infatti un ben definito ruolo fisiologico, essendo coinvolti nell'eliminazione degli xenobiotici (soprattutto quelli presenti nel fegato, reni, tratto gastrointestinale). Inoltre gli ABC trasportatori sono coinvolti nella regolazione della permeabilità a livello del sistema nervoso centrale (barriera ematica cerebrale), dei testicoli e della placenta, preservando questi sistemi dall'esposizione agli agenti citotossici che circolano nel sangue.

Molti dei modulatori P-gP inibiscono quindi anche altri trasportatori ABC. Valspodar e Biricodar non sono infatti specifici solamente per la P-gP; entrambi agiscono anche come substrato della proteina MRP1. E' possibile che questa inibizione di trasportatori non target possa portare ad importanti effetti avversi dei farmaci antitumorali, come la neutropenia o altre mielosoppressioni; per

esempio, il trasportatore BCRP è un regolatore funzionale delle cellule staminali e una sua inibizione può portare a questi effetti.

Terza generazione: chimica combinatoriale

Gli inibitori P-gP di terza generazione sono stati sviluppati a partire da programmi di chimica combinatoriale usando composti di partenza che derivano dalle informazioni farmacologiche disponibili sul meccanismo di interazione farmaco-glicoproteina P. I dati ricavati dagli sviluppi delle precedenti generazioni di farmaci suggeriscono delle caratteristiche essenziali per i nuovi modulatori: potente effetto nell'invertire il fenotipo resistente, elevata affinità di interazione con la P-gP, selettività di substrato, bassa affinità per le biotrasformazioni metaboliche ad opera del citocromo P450 nella sua isoforma 3A4.

Il primo di questi nuovi composti è l'**Elacridar** (GF120918), un'acridonecarbrossamide, che ha dimostrato di riuscire a ristabilire l'azione citotossica sia della Vincristina che della Doxorubicina, tramite un meccanismo di diretta inibizione della P-gP, che porta ad un incremento nell'accumulo dei farmaci; è efficace a concentrazioni nanomolari ed è in grado di invertire completamente il fenotipo resistente. L'Elacridar non interagisce con la proteina ABCC1/C2 e quindi non porta a nessun effetto in linee cellulari che esprimono questi trasportatori, ma aumenta la citotossicità degli agenti neoplastici in cellule che esprimono ABCG2, con un meccanismo allosterico simile a quello con cui agisce sulla P-gP. E' quindi un inibitore con azione sia sulla P-gP che sulla BCRP, che può essere somministrato oralmente. E' stato testato in combinazione con la Doxorubicina in pazienti con tumori solidi in fase avanzata (fase I); al dosaggio raccomandato per la Doxorubicina si è osservato una tossicità ematologica, con leucocitopenia e granulocitopenia. Comunque, nei protocolli di somministrazione con altri inibitori è stato dimostrato che la Doxorubicina può essere somministrata al dosaggio ritenuto clinicamente attivo nella maggior parte dei tumori con minimi effetti collaterali.

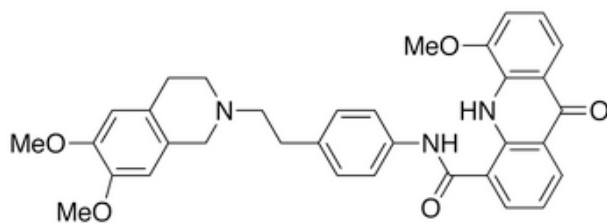


Figura B2.7. Elacridar.

Elacridar è stato anche somministrato con Topotecan, un substrato della P-gP e della BCRP utilizzato nel trattamento del cancro polmonare e del cancro ovarico metastatico (fase I), per osservare il blocco di entrambe le proteine; rispetto alla monoterapia orale con Topotecan non ci sono stati dei limiti nel dosaggio impiegato per l'insorgere di diarrea, probabilmente a causa dell'attività locale sulla mucosa intestinale. Al contrario, una somministrazione endovenosa di Topotecan dà luogo a neutropenia e trombocitopenia. Sono comunque necessari ulteriori studi per verificare la sicurezza e l'efficacia di questa cosomministrazione.

I modulatori di terza generazione non interferiscono con il citocromo P450 3A4 a rilevanti concentrazioni; ciò spiega, almeno in parte, perché non alterino le proprietà farmacocinetiche del Paclitaxel nei ratti. Inoltre questi agenti non inibiscono altri ABC trasportatori: la selettività per la P-gP minimizza la possibilità che il blocco di più di una pompa possa portare ad un'alterata escrezione

dei composti chemioterapici. Nelle successive sperimentazioni cliniche nessuno degli inibitori di terza generazione ha causato rilevanti alterazioni nei profili farmacocinetici degli agenti citotossici cosomministrati; non è stato quindi necessario ridurre il dosaggio chemioterapeutico.

Uno dei più promettenti inibitori è il **Tariquidar** (XR9576), che si lega con elevata affinità al trasportatore P-gP, inibendone efficacemente l'attività. La seconda generazione di P-gP modulatori compete come substrato con gli agenti citotossici per il trasporto ad opera della pompa; il Tariquidar, invece, si lega specificatamente e non competitivamente alla proteina con un'affinità che supera grandemente quella dei substrati trasportati. Non è chiaro se il sito di legame di XR9576 sia diverso da quello che lega l'ATP, ma come gli altri modulatori, anche il Tariquidar inibisce l'attività ATP-asi della P-gP. Il suo effetto inibitorio dura a lungo, rendendolo uno dei più potenti modulatori; in uno studio *in vitro*, la P-gP è rimasta bloccata per più di 22 ore dopo che il Tariquidar è stato rimosso dal mezzo di coltura, mentre nelle stesse condizioni, il tempo di eliminazione per la Ciclosporina A era di 60 minuti. Studi di farmacocinetica in pazienti sani mostrano come una singola dose endovenosa di Tariquidar pari a 2 mg/kg (oppure 750 mg per os) sia ben tollerata e dia luogo ad una completa inibizione per almeno 24 ore, permettendo quindi l'uso di dosi standard nella chemioterapia.

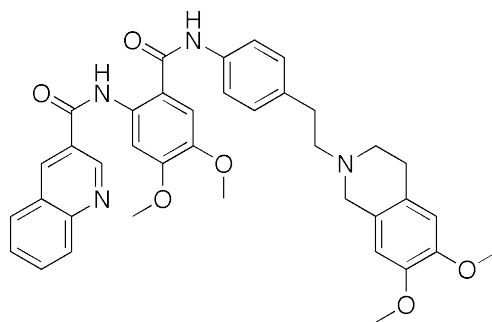


Figura B2.8. Tariquidar.

Il Tariquidar è stato valutato in uno studio clinico di fase I in cosomministrazione con la vinorelbina utilizzando la tecnica scintigrafica con ^{99m}Tc -Sestamibi per visualizzare la funzione della P-gP sia in tumori che in tessuti normali di pazienti con cancro metastatico; in presenza del composto si è visto un aumento della captazione del radiotracciante nelle cellule tumorali.

La combinazione con la Vinorelbina è stata anche testata in soggetti adulti con tumori solidi refrattari, mentre si sta ancora effettuando uno studio pediatrico di fase I con Vinorelbina, Doxorubicina o Docetaxel. I risultati hanno dimostrato che la cosomministrazione di Tariquidar e Vinorelbina è ben tollerata; non ci sono infatti state interazioni farmacocinetiche che avrebbero potuto portare a una riduzione del dosaggio per lo sviluppo di tossicità.

A causa della loro specificità per i trasportatori P-gP e l'assenza di interazioni con il citocromo P450, gli inibitori di terza generazione offrono significativi vantaggi rispetto ai precedenti composti. I risultati delle sperimentazioni cliniche confermano che il Tariquidar e l'Elacridar possono essere somministrati a pieni dosaggi terapeutici, con minime interferenze nella farmacocinetica degli agenti chemioterapeutici cosomministrati.

Zosuquidar è un altro inibitore di terza generazione con un adatto profilo farmacocinetico e farmacodinamico, in quanto non inibisce l'attività di altri trasportatori coinvolti nell'MDR e l'azione del citocromo P450; può essere somministrato sia oralmente che per infusione endovenosa, anche

se un'infusione nel sangue è più sicura rispetto a quella *per os* che causa tossicità cerebellare associata ad allucinazioni.

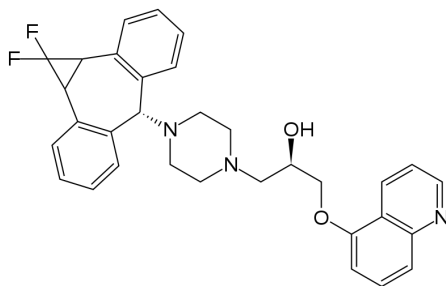


Figura B2.9. Zosuquidar.

In studi clinici di fase I la somministrazione di Zosuquidar con la Doxorubicina porta ad una diminuita eliminazione del farmaco che dà luogo a leucopenia e trombocitopenia, sebbene questi siano considerati di poca importanza clinica. Non si sono invece verificate interazioni quando cosomministrato con Antracicline.

Per la sua corta emivita, Zosuquidar è stato testato con la Citarabina o la Daunorubicina in pazienti con AML (fase I), inizialmente con somministrazione singola e poi continua; dopo 12 ore viene completamente ristabilita la sensibilità ai farmaci senza interferire sulla *clearance* della Daunorubicina.

Le ricerche si sono dunque focalizzate verso lo sviluppo di inibitori specifici per la determinata pompa di efflusso coinvolta nel fenomeno della multiresistenza ai farmaci, in modo tale da evitare quelle interazioni farmacologiche di natura farmacocinetica, che negli inibitori di precedente generazione portavano ad una riduzione del dosaggio terapeutico dei farmaci cosomministrati con conseguente scarsa efficacia clinica.

MK-571, un potente e selettivo antagonista del leucotriene D4 (LTD₄), possiede anche un'attività inibitrice nei confronti della proteina MRP1. Uno studio condotto su due linee cellulari che sovraesprimono il gene che codifica per la proteina associata alla multi-resistenza ai farmaci (MPR), ha dimostrato una modulazione dose-dipendente della resistenza mediata dall'MK-571. Si ottiene infatti una completa inversione della resistenza alla Vincristina con una concentrazione finale di MK-571 pari a 50 μM nella linea cellulare GLC4/ADR, mentre la linea HL60 che sovraesprime anche la P-gP/MDR1 non è così significativamente affetta dall'inibitore.

Effetti simili si sono visti utilizzando BSO, butionina sulfossimmina, inibitore della sintesi del glutatione (GSH); questo composto inibisce specificatamente l'attività della proteina MRP agendo indirettamente in quanto causa una deplezione delle riserve di GSH. Ciò porta all'identificazione dell'esistenza di una relazione tra la proteina MRP e substrati coniugati al glutatione; mentre non è ancora chiaro come i farmaci anticancro vengono trasformati in coniugati al glutatione nelle cellule tumorali, i leucotrieni sono, almeno in parte, trasportati all'esterno della cellula come GSH-coniugati. E' stato recentemente dimostrato che il leucotriene LTC₄, il coniugato al GSH del leucotriene LTA₄, è trasportato all'interno di vescicole di membrana in un modo ATP-dipendente in linee cellulari che sovraesprimono la proteina MRP.

Il trasporto di LTD₄ all'interno di queste vescicole è competitivamente inibito dall'MK-571. Questo suggerisce che MRP sia un trasportatore di substrati coniugati al glutazione e identifica l'MK-571 come nuovo strumento per lo sviluppo di modulatori specifici per MRP.

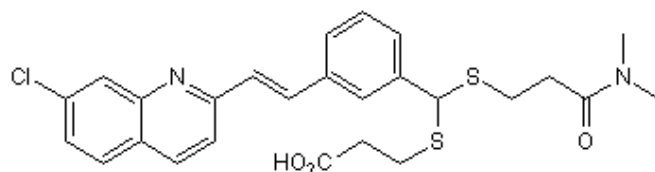


Figura B2.10. MK-571.

Gli inibitori P-gP di terza generazione, come l'Elacridar (studi clinici in fase I) e il suo derivato antranilico Tariquidar (studi clinici di fase III) presentano come nucleo base una 6,7-dimetossitetraidroisochinolina. Questi inibitori non presentano interazioni farmacocinetiche con i farmaci chemioterapici e hanno dimostrato una elevata potenza e affinità per la P-gP. Nonostante ciò, i risultati degli studi clinici hanno evidenziato una limitata attività nel ristabilire la sensibilità al trattamento chemioterapico con le Antracicline o i Taxani. Studi relazione-attività su queste complesse molecole non sono facili da effettuare e quindi non è chiaro il contributo di ciascun frammento della molecola nell'invertire la MDR.

Recentemente è stato dimostrato che i ligandi al recettore sigma-2 sono in grado di modulare la P-gP e fra questi in particolare il derivato cicloesilpiperazinico PB28, il più potente agonista al recettore sigma-2 riportato in letteratura, è stato impiegato come strumento farmacologico per investigare il meccanismo di interazione con la P-gP. Infatti, PB28 mostra sia abilità nel ridurre l'espressione della P-gP a livello di mRNA nelle cellule MCF7/Adr sia attività nel modulare la P-gP.

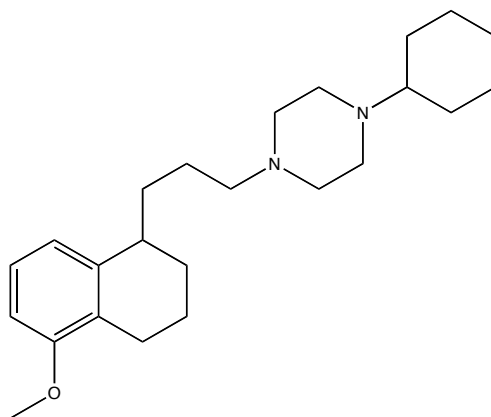


Figura B2.11. PB28, agonista al recettore sigma-2.

Allo scopo di valutare i requisiti strutturali richiesti per il legame al recettore sigma-2, e quindi l'attività P-gP modulante, il frammento cicloesilpiperazinico di PB28, responsabile dell'attività al recettore sigma-2, è stato sostituito da una 6,7-dimetossitetraidroisochinolina, nucleo base di altri P-gP modulatori come Tariquidar ed Elacridar. L'attività di modulazione della P-gP di questi composti è stata testata tramite tre saggi biologici combinati: determinazione della permeabilità apparente, deplezione cellulare dell'ATP e inibizione del trasporto della [³H]vinblastina nella linea cellulare Caco-2; tramite questi saggi è possibile determinare il meccanismo di interazione con la P-gP.

La determinazione della permeabilità apparente permette di stabilire se il composto testato è trasportato al di fuori della cellula dalla P-gP. Tramite questo saggio viene valutata la permeabilità nel verso basolaterale-apicale (BA) e viceversa (AB). Il rapporto BA/AB permette di definire il potenziale meccanismo di interazione del farmaco con la P-gP: composti con un rapporto BA/AB < 2 non vengono infatti trasportati verso l'esterno, mentre quelli con un rapporto > 2 sono substrato della glicoproteina. Dal momento che la pompa è ATP-dipendente, i substrati determineranno una deplezione di ATP. Al contrario, i composti non trasportati, non porteranno a modifiche nei livelli cellulari di ATP. Nell'ultimo saggio biologico viene verificata la potenza dei composti nell'inibire il trasporto di [³H]vinblastina, substrato della pompa P-gP. I composti che non vengono trasportati, non diminuiscono il contenuto cellulare di ATP e interferiscono con il trasporto della [³H]vinblastina, sono chiamati "inibitori" della P-gP. Al contrario, gli agenti che sono trasportati dalla P-gP, diminuiscono le riserve di ATP e competono con la [³H]vinblastina vengono definiti "substrati trasportati".

Analoghi di PB28 6,7-dimetossitetraidroisochinolina sono stati sviluppati inserendo un doppio legame nello spazio tra il nucleo della tetralina e il frammento basico o inserendo un doppio legame nell'anello della tetralina; importanti sono le posizioni dei sostituenti metossilici nell'anello tetralinico.

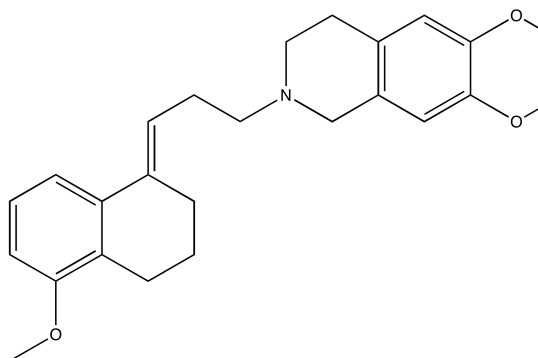


Figura B2.12. MC18.

6,7-dimetossi-2-{3-[4-metossi-3,4-diidro-2H-naftalen-(1E)-ilidene]-propil}-1,2,3,4-tetraidroisochinolina (**MC18**), è un inibitore non specifico con attività simile a quella della Ciclosporina A su diversi tipi di glicoproteine, in particolare P-gP, BCRP e MRP1.

In uno studio Waarde et coll. hanno valutato l'interazione specifica di MC18 con la P-gP: ad una concentrazione pari a 20 µM, MC18 porta ad un aumento di 6-7 volte dell'accumulo intracellulare della Doxorubicina nella linea cellulare MCF7/adr e potenzia l'effetto antiproliferativo di 5 µM di Doxorubicina dal 5% al 95%. La valutazione della permeabilità tramite il rapporto BA/AB è di 1.6 (valore inferiore a 2) e l'attività ATPasica non viene messa in funzione; si può quindi classificarlo come P-gP inibitore.

Recentemente MC18 è stato marcato con ¹¹C e utilizzato come nuovo tracciante PET per la visualizzazione dell'espressione e funzione della P-gP; mostra infatti un legame specifico con la glicoproteina nel cervello e in molteplici organi periferici. Elevati livelli di P-gP sono infatti presenti nelle cellule endoteliali della barriera ematica cerebrale, dove risulta avere un ruolo fisiologico cruciale nel mantenere i farmaci nel sangue, svolgendo dunque un'azione protettiva. Recenti studi

hanno riportato una potenziale correlazione tra l'attività della P-gP e/o la sua espressione in disordini neurodegenerativi come l'Alzheimer e il Morbo di Parkinson.

MC134 e MC150 sono altri derivati della 6,7 dimetossitetraidroisochinolina, ottenuti da Colabufo et. coll., impiegati come inibitori dei trasportatori ABC in studi di captazione cellulare *in vitro*; mentre MC150, avendo un'azione simile a quella dell'MK571 risulta specifico nei confronti della famiglia di proteine MRP (e in particolare MRP1), MC134 possiede un'azione mista, andando ad interagire sia con la P-gP che con la MRP.

Lo sviluppo di potenti e selettivi inibitori MDR risulta quindi utile nel campo farmacologico dove questi composti possono riabilitare gli agenti chemioterapici e allo stesso tempo permettere una diminuzione delle loro dosi terapeutiche; risultano importanti anche nel campo diagnostico in quanto rendono possibile la visualizzazione della sovraespressione dei trasportatori responsabili della farmacoresistenza nelle cellule tumorali.

B2.7 Trasporto di farmaci chemioterapici mediato dalla P-gP MDR1

Le sostanze riconosciute dalla P-gP sono tipicamente rappresentate da composti moderatamente idrofobici (coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, $\log P > 1$), spesso contenenti protoni con una carica cationica netta in condizioni fisiologiche, e sono prevalentemente di origine naturale con una porzione aromatica. All'interno di una vasta serie di composti citotossici convenzionali, le Antracicline (Doxorubicina, Daunorubicina, Taxani), gli Alcaloidi della Vinca (Vincristina, Vinblastina, Vindesina) e gli Etoposidi sono esempi di farmaci chemioterapici clinicamente importanti riconosciuti dalla P-gP MDR1.

La diversità dei composti suggerisce l'apparente capacità di questo trasportatore di riconoscere un largo gruppo di agenti citotossici non correlati dal punto di vista strutturale o funzionale. Inoltre, nella moderna era dell'oncologia molecolare, composti sintetici insoliti, aventi come bersaglio le proteine specifiche del cancro, hanno suscitato un generale entusiasmo tra i clinici. Un primo esempio di terapia molecolare mirata è rappresentato da un derivato della 2-fenilaminopirimidina (Gleevec), un inibitore molto potente del recettore della Tirosin-chinasi riconosciuto e trasportato dalla P-gP MDR1. Ne consegue che farmaci insoliti anche mirati restano sensibili ai meccanismi di resistenza mediata da trasportatori ad alta specificità.

B2.8 Agenti SPECT come traccianti dell'attività di trasporto della P-gP

La scelta di una terapia sistemica contro il cancro è basata su una precedente analisi dei marcatori tumorali attraverso la quale è valutata la presenza o l'assenza di un *target* molecolare, come un recettore o un enzima. L'identificazione di *marker* tumorali tramite opportuni agenti diagnostici permette la selezione di quei pazienti che possono trarre un maggior vantaggio da una terapia mirata e personalizzata.

Appare evidente come la valutazione della farmacoresistenza sia un indice importante nel pianificare una terapia sistemica efficace. L'espressione della P-gP MDR1, come individuato dal livello di mRNA o di proteina, non è sempre correlata alla funzionalità della pompa: l'attività di trasporto dipende ad esempio da eventuali mutazioni specifiche, lo stato di fosforilazione della proteina. Forme alterate o meno attive del trasportatore possono essere individuate tramite PCR o in modo immunostochimico, procedimenti questi che non riflettono accuratamente lo stato di resistenza delle cellule tumorali.

Così sono stati indagati dei metodi per rilevare funzionalmente l'attività di trasporto della P-gP. L'*imaging* con un radiofarmaco che è trasportato dalla MDR1 P-gP può essere un metodo utile per identificare, in modo non invasivo, quei tumori nei quali il trasportatore non solo è espresso, ma è anche funzionale. Una corretta valutazione della farmacoresistenza, mediata da trasportatore, può essere attuata tramite tecniche SPECT che impiegano, come substrati di trasporto per la P-gP, complessi di un metallo radiomarcato. Tra questi rivestono particolare importanza ^{99m}Tc -agenti, come ad esempio:

^{99m}Tc -Sestamibi, sebbene sviluppato come radiofarmaco per l'*imaging* della perfusione miocardica, è stato il primo complesso metallico riconosciuto come substrato del trasportatore P-gP. È caratterizzato da una geometria ottaedrica attorno al centro metallico, possiede una carica cationica e una modesta idrofobicità, simile a molti agenti chemioterapici utilizzati nel fenotipo MDR. Quando la P-gP non è espressa, questo complesso ^{99m}Tc -isonitrile si accumula all'interno delle cellule in risposta ai potenziali di membrana mitocondriale e plasmatici negativi.

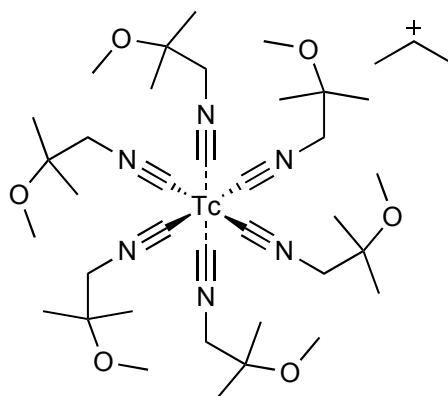


Figura B2.13. ^{99m}Tc -Sestamibi.

Nelle cellule tumorali che esprimono P-gP l'accumulo netto del radiofarmaco è inversamente proporzionale ai livelli di espressione di MDR1. Inoltre la completa inversione, mediata dalla P-gP, dell'efflusso del ^{99m}Tc -Sestamibi risente del trattamento con opportuni inibitori della pompa come il Verapamil, Ciclosporina A o quelli di più recente scoperta come il Valspodar o il Biricodar.

^{99m}Tc -Sestamibi è anche riconosciuto come substrato della proteina trasportatrice associata alla MDR (MRP1), una stretta analoga della P-gP, consentendogli di essere una sonda più generale della farmacoresistenza (MDR); allo stesso tempo questa reattività crociata con la MRP1 può ridurre la specificità del tracciante nell'*imaging* funzionale della P-gP MDR1 nelle cellule tumorali.

Sono stati così fatti molteplici studi sulle relazioni struttura-attività (SAR) di questi complessi per farli divenire target di trasporto specifici della P-gP. In uno di questi, le catene alchiliche del ^{99m}Tc -Sestamibi sono state sostituite con catene eterificate più lunghe; tra i diversi composti analizzati, il complesso esa(2-etossiisobutilisonitrile)[^{99m}Tc] (^{99m}Tc)EIBI è stato riconosciuto dalla P-gP come substrato di trasporto, ma con un legame cellulare non specifico leggermente maggiore rispetto al ^{99m}Tc -Sestamibi.

Sono poi state esplorate anche le funzioni aromatiche; a partire dalle corrispondenti ammine è stata sintetizzata una serie di leganti contenenti gruppi arilisonitrili e i corrispondenti complessi di esa(arilisonitrile)[^{99m}Tc]. Analogamente ai composti precedenti, il composto *lead* della serie ha dimostrato un incoraggiante profilo di trasporto nelle cellule che esprimono la P-gP, ma anche un significativo assorbimento aspecifico nei compartimenti idrofobici intracellulari. I risultati ottenuti da questo studio di SAR suggeriscono che sostituenti metossilici confrontati con gli altri sostituenti, contribuiscono favorevolmente al riconoscimento dei complessi in cui sono contenuti da parte della MDR1.

Accanto al ^{99m}Tc -Sestamibi, altri composti a base di Tecnezio sono stati studiati e identificati come substrati di trasporto da parte della P-gP, sebbene non successivamente utilizzati in clinica

1. ^{99m}Tc -Tetrofosmin, bis{1,2-bis[bis(etossietil)-fosfino]etano}Tc(V), è stato identificato come un altro [^{99m}Tc]-complesso con favorevoli proprietà di trasporto mediato dalla Pgp MDR1.
2. ^{99m}Tc -Furifosmin, trans[(1,2-bis(diidro-2,2,5,5-tetrametil-3(2H)furanone-4-metilenimmino)etano)bis(tris(3-metossi-1-propil)fosfina)]Tc(III);
3. [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{MIBI})_3$] $^+$, tris(carbonil)tris(2-metossi-isobutilisonitrile)tecnezio(I).

B2.9 ^{99m}Tc-Sestamibi (MIBI), tracciante tumorale e di MDR

Una maggiore area di interesse nella medicina nucleare è la scintigrafia *in vivo* per la valutazione dei complessi processi cellulari implicati nella crescita tumorale, progressione e risposta al trattamento con lo scopo di definire le proprietà biologiche che possono orientare i clinici nell'individualizzare la terapia. I cationi lipofilici marcati con ^{99m}Tc appaiono come strumenti adatti per tracciare processi cellulari specifici in un'ampia varietà di tumori maligni, incluso il cancro al seno. MIBI, impiegato come agente per l'*imaging* tumorale, può infatti non solo tracciare lesioni, ma anche fornire informazioni sulle caratteristiche del danno neoplastico. Molti studi clinici sono stati effettuati per correlare la captazione di questo radiofarmaco, o la sua eliminazione, a *marker* istologici, biochimici e molecolari riferibili a numerosi processi cellulari inclusi l'apoptosi, la proliferazione, l'espressione della P-gP e la neoangiogenesi.

Il quadro finale che emerge da questi studi è che il rapido *uptake* del tracciante riflette lo stato mitocondriale, mentre l'eliminazione del radiofarmaco è indice dell'attività dei trasportatori dei farmaci come la P-gP. E' infatti noto che il MIBI si concentra nel mitocondrio, organello importante nella fisiopatologia e nel trattamento del cancro, con un ruolo centrale nella vita e nella morte cellulare. Numerosi studi hanno mostrato il coinvolgimento di un meccanismo di trasporto passivo nell'*uptake* di questi cationi lipofilici in risposta a un potenziale di membrana mitocondriale e plasmatico ampiamente negativo; si è anche visto un accumulo reversibile all'interno dei mitocondri sia in cellule normali che tumorali. Mutazioni genetiche e apoptosi sono accompagnate da variazioni nel potenziale di membrana mitocondriale.

Il MIBI ha un'estrazione di primo passaggio relativamente alta e la sua ritenzione in tumori inoculati è strettamente dipendente dal flusso ematico. L'*uptake* tumorale è influenzato dal maggior flusso ematico rispetto al tessuto adiacente; se c'è necrosi tissutale, si ha un minor flusso ematico nella sede neoplastica e quindi il MIBI avrà una distribuzione inferiore: non verrà captato dal tessuto tumorale perché il flusso ematico in quell'area risulta diminuito. Studi di biodistribuzione hanno dimostrato che questo complesso metallico ha un *uptake* precoce alto e una rapida *clearance* ematica in più organi.

Una diffusa necrosi cellulare, accompagnata da un insufficiente apporto ematico e da ipossia, può significativamente modificare la cinetica e ridurre l'*uptake* del MIBI nei tumori. L'ipossia del tessuto è un fattore importante nel determinare la risposta del tumore al trattamento e la presenza di cellule ipossiche nel tumore è una delle maggiori cause dell'insuccesso della chemioterapia e della radioterapia. Si può quindi ipotizzare che lo stato di ossigenazione tumorale sia uno dei fattori che regolano i risultati scintigrafici ottenuti con questi traccianti quando sono utilizzati per prevedere la risposta terapeutica ai trattamenti chemioterapici: i tumori che non accumulano ^{99m}Tc-Sestamibi o ^{99m}Tc-Tetrofosmin hanno infatti più probabilità di fallimento alla chemioterapia.

Analisi del meccanismo di *uptake* in cellule miocardiche e di carcinoma hanno indicato che la lipofilità e la carica cationica del ^{99m}Tc-Sestamibi giocano un ruolo importante nell'accumulo e nella ritenzione; la carica cationica del composto lo rende infatti capace di interagire con il potenziale di membrana citosolico e mitocondriale ampiamente negativo delle cellule miocardiche e tumorali, mentre la lipofilità e la struttura delle molecole lo rendono adatto per la diffusione passiva nel doppio strato fosfolipidico.

Il trasporto passivo del MIBI all'interno della cellula è guidato dal potenziale transmembrana $\Delta\Psi$ (da -150 a -170mV, negativo all'interno) generato nelle cellule vive. Il MIBI penetra reversibilmente nel citoplasma attraverso la membrana plasmatica, tramite forze motrici termodinamiche che

sfruttano il $\Delta\Psi_c$ e irreversibilmente nel mitocondrio in risposta al gradiente elettrico $\Delta\Psi_m$ generato da un alto potenziale transmembrana mitocondriale, negativo all'interno (Figura B2.15):

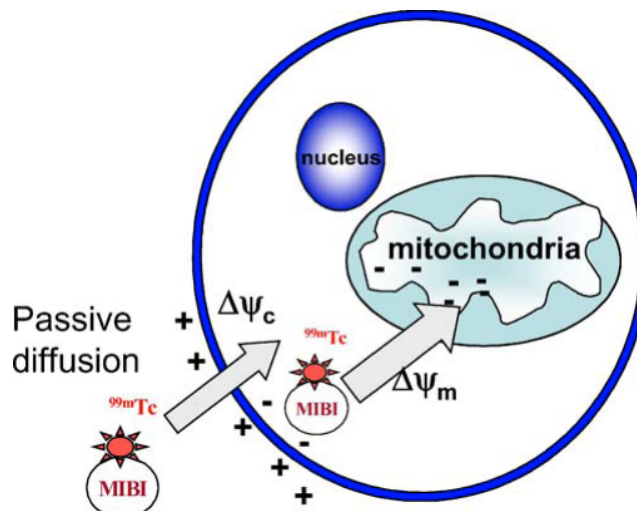


Figura B2.15. Meccanismo di *uptake* del MIBI, sostenuto dal gradiente di potenziale transmembrana ($\Delta\Psi_c$). Il MIBI si accumula nei mitocondri delle cellule tumorali in risposta al gradiente di potenziale transmembrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$)

La differenza nel gradiente elettrico $\Delta\Psi$ ($\Delta\Psi_c + \Delta\Psi_m$) dall'esterno della cellula al mitocondrio fra cellule epiteliali normali e cellule neoplastiche è almeno di 60mV. In accordo con l'equazione di Nernst, questa differenza nel voltaggio può portare ad un aumento di 10 volte dell'accumulo di farmaci lipofili, come il MIBI, nei mitocondri di carcinoma. Arbab e coll. hanno effettuato degli studi per chiarire il meccanismo di *uptake* del radiotracciante confrontandolo con quello di ^{201}Tl e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmin, altri agenti impiegati nell'*imaging* tumorale. La captazione di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi è un processo che richiede energia; si è visto che l'accumulo del radiotracciante avviene soprattutto all'interno dei mitocondri, a causa del potenziale negativo di membrana, mentre il passaggio attraverso la membrana cellulare avviene per diffusione passiva. L'*uptake* di ^{201}Tl all'interno della cellula è correlato al potenziale di membrana e all'attività della Na^+K^+ ATPasi, ma, una volta all'interno, in quanto agente idrofilo, rimane nel compartimento citosolico. Lo studio è stato effettuato su due linee cellulari selezionate per la loro differente densità mitocondriale; la più elevata captazione di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin può essere dovuta al maggior numero di mitocondri presenti nella linea cellulare SW-13 rispetto alla HLB-2 osservata tramite microscopio elettronico, che può aver causato un incremento dell'attività metabolica e della negatività del potenziale di membrana mitocondriale. Anche il più alto *uptake* del ^{201}Tl può essere dovuto all'incremento del potenziale della membrana cellulare e all'aumento dell'attività della Na^+K^+ ATPasi.

Per valutare la cinetica di captazione dei radiotraccianti sono state impiegate tre agenti chimici: Nigericina, uno ionoforo che incrementa il potenziale di membrana mitocondriale, CCCP (carbonilcianom-cloro-fenilidrazone), un composto che disaccoppia la fosforilazione ossidativa depolarizzando il potenziale mitocondriale, e Ouabaina, un inibitore della Na^+/K^+ ATPasi. In seguito all'aggiunta della Nigericina, si avrà dunque un aumento dell'accumulo del MIBI nelle HLB-2; se invece si aggiunge CCCP si avrà un rilascio del 73-78% del tracciante captato dalle cellule controllo e una perdita del 94-97% dell'attività da quelle pretrattate con la Nigericina, suggerendo così un accumulo selettivo del radiofarmaco nei mitocondri. L'aggiunta di Ouabaina, bloccando l'attività della Na^+/K^+ ATPasi, porta a una diminuzione della captazione di ^{201}Tl , mentre l'*uptake* del MIBI

aumenta: bloccando la pompa si ha infatti una perdita del gradiente del sodio all'interno della cellula, i protoni non possono essere scambiati dal trasportatore antiporto Na^+/H^+ e si ha così un decremento del pH interno che potrebbe portare ad un aumento del potenziale mitocondriale stimolando l'uptake del MIBI.

L'uptake del MIBI in differenti linee cellulari tumorali è stato studiato da Delmon-Moingeon et al. che hanno scoperto più alte concentrazioni in cellule tumorali che in cellule normali a causa di un più elevato gradiente elettrico delle prime. La captazione del MIBI è stata studiata in condizioni che variano il potenziale di membrana plasmatico. Cellule sospese in un mezzo con una bassa concentrazione di K^+ aumentano rapidamente l'uptake del radiocomplesso in trenta minuti per raggiungere lo stato stazionario dopo un'ora; quando sospese in un mezzo con un'elevata concentrazione di K^+ , che depolarizza la membrana plasmatica, l'accumulo del MIBI si riduce del 60%. Per valutare il contributo del potenziale mitocondriale, è stato esaminato l'effetto di due ionofori, Valinomicina e Nigericina, che hanno mostrato di alterare il metabolismo mitocondriale. La Valinomicina, che porta a una notevole diminuzione del potenziale mitocondriale, elimina l'80-85% dell'uptake del MIBI in un mezzo con elevata concentrazione di K^+ ; al contrario, la nigericina, che incrementa il potenziale, porta a un'aumento dell'accumulo del tracciante, suggerendo dunque l'importante ruolo dei potenziali di membrana mitocondriale e plasmatico nella captazione dei radiofarmaci.

Andrews e Albright hanno studiato l'effetto di alterazioni a livello mitocondriale in linee cellulari di cancro ovarico resistenti al *cis*-diamminodichloroplatino(II) (DDP), utilizzando il catione tetrafenilfosfonio come marker del potenziale di membrana, K^+ che depolarizza la membrana plasmatica ma non quella mitocondriale e CCCP che invece depolarizza la membrana mitocondriale ma non quella plasmatica. La resistenza al DDP può essere dovuta a: una diminuzione nell'accumulo del farmaco, un incremento dell'inattivazione dell'agente citotossico dovuto ad un aumento dei nucleofili intracellulari (glutazione e metallotionine), come pure un incremento della rimozione delle lesioni DDP-indotte nel DNA. L'accumulo del DDP nella linea cellulare farmacoresistente C13* è in parte dipendente dall'energia e in parte dovuto all'azione della Na^+/K^+ ATPasi, che è il generatore primario del potenziale di membrana. Le C13* mostrano non solo un elevato potenziale di membrana plasmatico, ma anche mitocondriale; i mitocondri sono morfologicamente denaturati e le cellule diventano ipersensibili a cationi lipofili. Analisi al microscopio elettronico hanno rivelato che le C13* presentano una minor densità elettronica: le creste mitocondriali sono più spesse, irregolari e assenti in molti mitocondri.

Come detto in precedenza, il gene MDR1 della farmacoresistenza (MDR), che codifica una glicoproteina di membrana, la glicoproteina-P, è il meccanismo meglio caratterizzato di resistenza a molti farmaci. Si è visto che la P-gP agisce come una pompa di efflusso, trasportando fuori dalle cellule tumorali un'ampia varietà di farmaci citotossici strutturalmente e funzionalmente diversi tra loro (che includono Doxorubicina, Etoposide, Paclitaxel, Vincristina e molti altri). Tra questi, vi sono alcuni $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complessi monocationici lipofili (es. MIBI) che sono riconosciuti dalle P-gP e conseguentemente possono essere utilizzati *in vivo* come indicatori della funzione della P-gP MDR. Il MIBI interagisce sulla P-gP in un dominio di trasporto comune ad altri substrati. Il diminuito livello intracellulare dei substrati è la conseguenza del loro potenziato efflusso attraverso questi trasportatori di membrana (Figura B2.16):

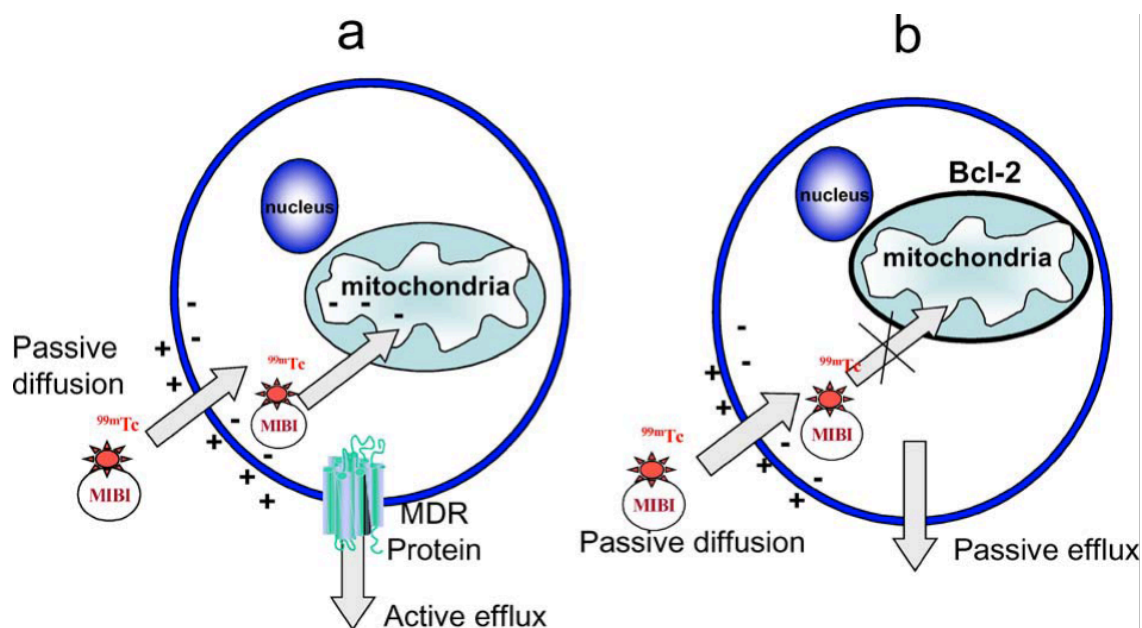


Figura B2.16. *Washout* del MIBI nelle cellule resistenti indotto da (a) proteine di membrana MDR e (b) dalla proteina antiapoptotica Bcl-2, della membrana mitocondriale esterna, che agisce da protettore.

Ciò ha suggerito che l'accumulo cellulare degli agenti cationici è inversamente proporzionale al livello di espressione della P-gP. L'aumento del contenuto di MIBI nelle cellule tumorali è stato osservato in seguito ad esposizione a modulatori di farmacoresistenza o a chemio-sensibilizzatori che modulano la funzione della P-gP e aumentano le concentrazioni intracellulari di farmaci chemioterapici nei tumori.

Nell'ambito della chemioterapia, un ridotto *uptake* del MIBI è spesso legato all'espressione di molecole di superficie della cellula, glicoproteina-P (P-gP) e proteine associate alla farmacoresistenza (MRP). Perciò, i tumori che non portano ad un accumulo del MIBI più probabilmente indeboliranno la risposta alla chemioterapia.

Comunque, l'espressione di questi trasportatori non può sempre giustificare la farmacoresistenza delle cellule tumorali. Si può dedurre che fattori diversi dall'espressione dei trasportatori P-gP sono coinvolti nel limitato *uptake* del MIBI. La partecipazione del glutazione come cofattore, nel ridotto accumulo del MIBI, è legata all'espressione della MRP nelle cellule tumorali. Il meccanismo di estrusione del MIBI tramite la pompa MRP coinvolge il glutazione, il glucuronato, e i coniugati al solfato caricati negativamente. Una deplezione dei livelli di GSH per azione della butionina sulfossimmina (BSO) porta infatti ad un incremento dell'accumulo del MIBI in cellule multi resistenti che sovraesprimono MRP ma non P-gP. ^{99m}Tc -Sestamibi è così substrato di entrambe le pompe di efflusso, ma l'azione della MRP è indiretta, coinvolgendo il glutazione intracellulare. Un basso *uptake* del MIBI in cellule tumorali di diversa origine è collegato con l'espressione non solo della pompa P-gP, ma anche di quella MRP.

B2.10 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, dalla cardiologia nucleare all'oncologia

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

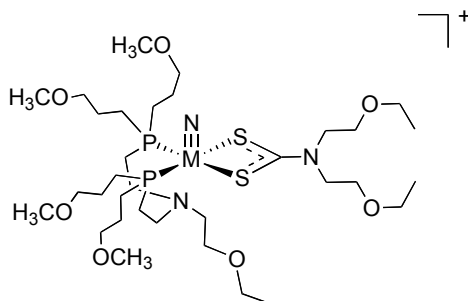


Figura B2.17. $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5.

Come $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi e $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tetrofosmin, il complesso è monocationico 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 $[\text{Tc}^{(\text{V})}(\text{N})(\text{DTC})(\text{PNP})]^+$, 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 B2.2).

	PNP		DTC		cuore/polmoni (60 min)	cuore/fegato (60 min)
	R(P)	R(N)	R ¹ (N)	R ² (N)		
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NOME})]^+$		CH ₃ -	CH ₃ -	CH ₃ O-	6.24	10.92
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{NOME})]^+$		C ₂ H ₅ -			7.07	6.21
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{BOET})]^+$		CH ₃ -			7.10	10.92
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{BOET})]^+$		C ₂ H ₅ -	C ₂ H ₅ -	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₄ -	6.73	5.72
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{ISOET})]^+$	CH ₃ -	CH ₃ -			7.10	10.28
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{ISOET})]^+$		C ₂ H ₅ -	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₄ -	iC ₃ H ₇ -	7.83	6.37
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DPODC})]^+$		C ₂ H ₅ -	CH ₃ OC ₂ H ₄ -	CH ₃ OC ₂ H ₄ -	8.37	5.38
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DBODC})]^+$		CH ₃ -			9.62	20.44
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$		C ₂ H ₅ -	CH ₃ OC ₂ H ₄ -	CH ₃ OC ₂ H ₄ -	8.17	18.80
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{DBODC})]^+$	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅ -			2.29	0.31

Tabella B2.2. Rapporti cuore/organo di complessi del tipo $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{DTC})]^+$. DTC:dialchil-ditiocarbammato; PNP:N,N-bis-[di(alcoossilchil)fosfinoetil]alcoossilchilammina ^[60].

Le differenze biodistributive tra i complessi, più che dalla diversità dimensionale, sono determinate dai 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 $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi e $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -NOET. Analogamente a $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi e a $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tetrofosmin, i sostituenti alchil-eteri sono da preferirsi: sull'azoto amminico appare più indicato il sostituito 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 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -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 B2.3. Biodistribuzione in ratti Sprague-Dawley di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5; risultati espressi come %dose/g.

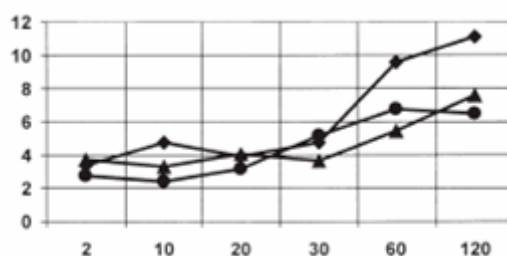


Grafico B2.1. Rapporti cuore/polmone in funzione del tempo, in minuti, per: ● $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5, ● $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi, ▲ $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tetrofosmin.

Studi di biodistribuzione ex vivo condotti su ratti femmina Sprague Dawley hanno dimostrato che $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5 è rapidamente estratto dal tessuto cardiaco, dove permane per un tempo prolungato e presenta una rapida clearance ematica e polmonare (Tabella). 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 $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi e $[^{99m}\text{Tc}]$ -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).

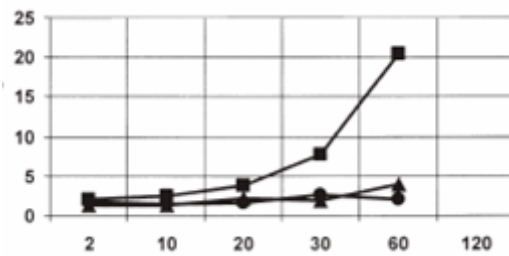


Grafico B2.2. Rapporti cuore/fegato in funzione del tempo, in minuti, per: ■ [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, ● [^{99m}Tc]-Sestamibi, ▲ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

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^[24] che risultano, anatomicamente, più prossime al fegato (Figura B2.18).

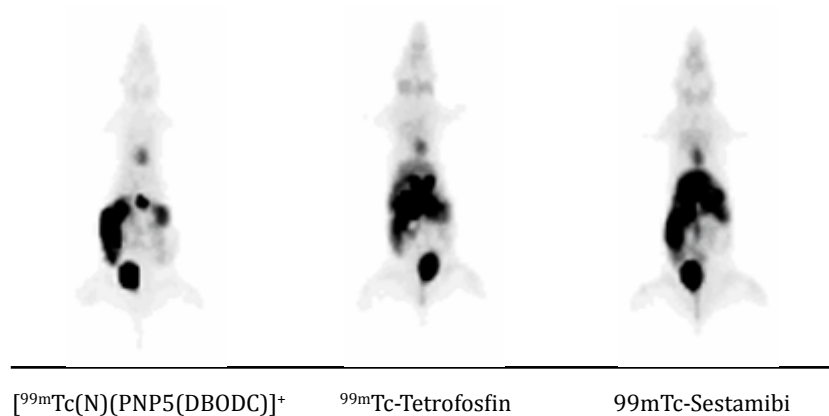


Figura B2.18. Immagini planari SPECT in vivo di ratti Sprague Dawley, 60 minuti dopo l'iniezione, da sinistra a destra, di: [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, e [^{99m}Tc]-Sestamibi.

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 ^[25].

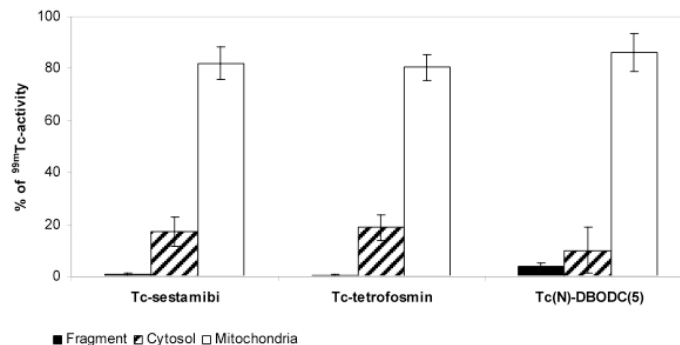


Figura B2.19. Distribuzione frazionata corretta della 99mTc-attività espressa come % dell'attività totale.

Studi di biodistribuzione in modello canino [26] hanno confermato quanto precedentemente osservato in ratti. [^{99m}Tc]-Sestamibi, se paragonato con [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})$]-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 redistribuzione 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 [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})$]-DBODC5: 2.77 ± 0.28 a 5 minuti e 3.55 ± 0.45 a 180 minuti).

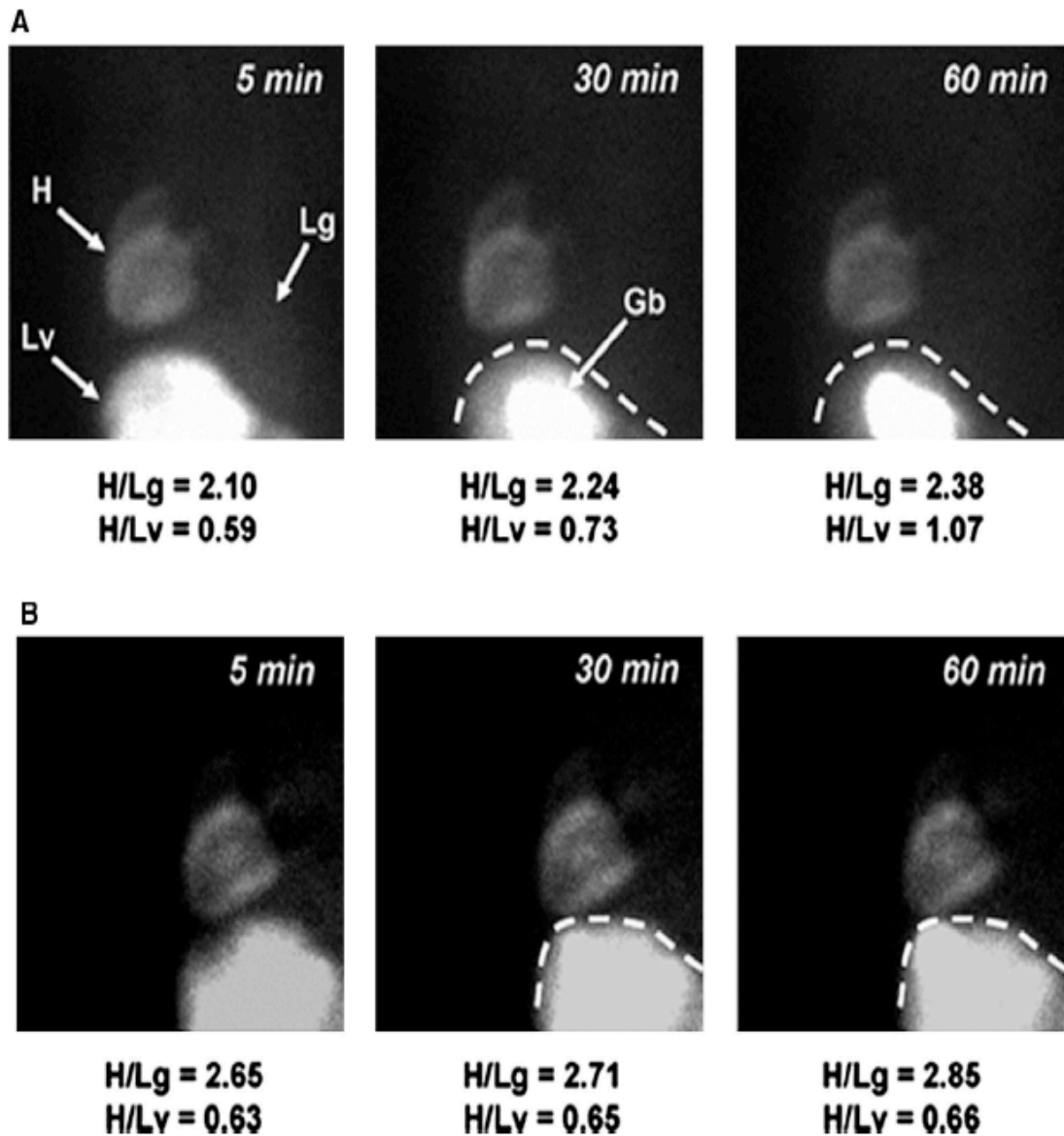


Figura B2.20. Immagini in vivo in cani mongrel adulti dopo somministrazione di [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})$]-DBODC5 (A) e [^{99m}Tc]-Sestamibi (B). Si osserva per entrambi una persistente captazione cardiaca (H) e minimo uptake polmonare (Lg). La clearance epatica (Lv) di [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})$]-DBODC5 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.

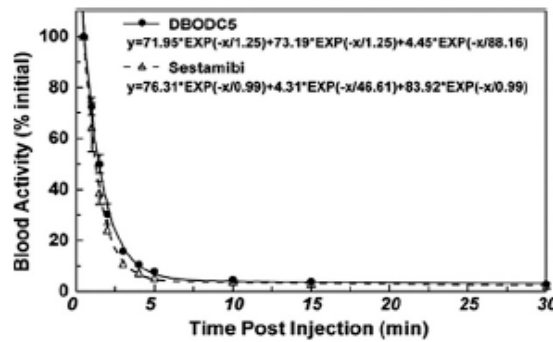


Figura B2.21: Cinetica di clearance ematica per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5 e $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi, nei primi 30 minuti p.i. in campioni di sangue venoso. L'attività è espressa come percentuale dell'attività iniziale (30 secondi p.i.) e normalizzata con quella realmente iniettata.

I rapporti cuore/fegato per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5 aumentano molto rapidamente nel tempo, 0.67 ± 0.05 a 5 minuti e 2.10 ± 0.21 a 180 minuti (Figura B2.22), mentre per $[^{99m}\text{Tc}]$ -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 $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -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.

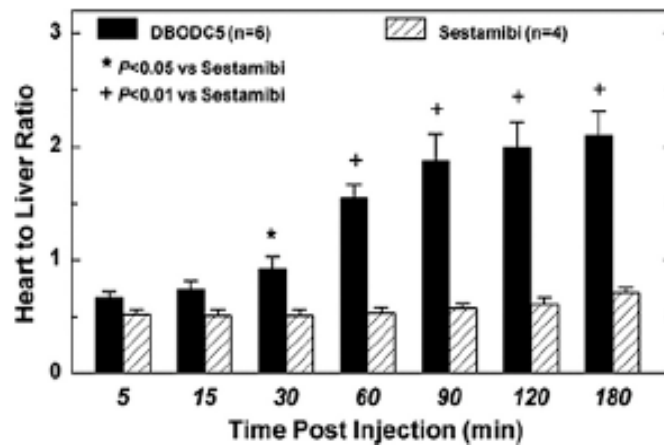


Figura B2.22. Comparazione dei rapporti cuore/fegato nel tempo per somministrazione di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5 e $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi in cani Mongrel adulti. Si osserva come tale rapporto, per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]$ -DBODC5, aumenti notevolmente nelle tre ore p.i., mentre per $[^{99m}\text{Tc}]$ -Sestamibi è praticamente costante.

Indipendentemente dal sesso, i dati mostrano un alto e persistente uptake miocardico. Comunque, il washout del $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -DBODC(5) dai tessuti non bersaglio, come polmoni, fegato e reni, è notevolmente più elevato nelle femmine rispetto ai maschi; di conseguenza per questi ultimi i rapporti cuore/polmone e cuore/fegato si presentano più bassi.

La distribuzione dell'attività del $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -DBODC(5) nei principali organi, con o senza somministrazione di Cyc-A, è riportata in Tabella B2.4 e in Figura B2.23. Gli effetti della Cyc-A sul profilo farmacocinetico sono evidenti a 30 e a 120 min p.i. Sono state osservate notevoli riduzioni nel washout di polmoni, fegato e reni (Figura B2.23 A, B) e significative variazioni nella distribuzione dell'attività nel tratto intestinale (Figura B2.23 C, D). Nessuna variazione nel profilo

biodistributivo del $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{-DBODC}(5)$ è stata evidenziata dopo somministrazione di una soluzione di DMSO per iniezione intraperitoneale 60 min dopo il radiotracciante.

Organo	% dose/g per 3 ratti (media \pm DS)															
	Femmina (controllo)				Femmina (Cyc-A)				Maschio (baseline)				Maschio (Cyc-A)			
	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min		
Sangue	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.12 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01						
Cuore	3.02 \pm 0.30	2.75 \pm 0.04	3.51 \pm 0.19	3.50 \pm 0.20	3.00 \pm 0.21	2.72 \pm 0.19	3.00 \pm 0.21	2.72 \pm 0.19	3.71 \pm 0.51	3.51 \pm 0.09						
Polmoni	0.57 \pm 0.13	0.29 \pm 0.02	0.91 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	0.74 \pm 0.02	0.62 \pm 0.06	0.74 \pm 0.02	0.62 \pm 0.06	1.64 \pm 0.41	0.76 \pm 0.16						
Fegato	0.64 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.72 \pm 0.06	0.69 \pm 0.11	0.88 \pm 0.08	0.63 \pm 0.09	0.88 \pm 0.08	0.63 \pm 0.09	2.83 \pm 0.10	1.80 \pm 0.60						
Reni	6.70 \pm 0.98	3.32 \pm 0.21	8.21 \pm 0.98	9.57 \pm 0.89	7.83 \pm 0.13	5.69 \pm 1.25	7.83 \pm 0.13	5.69 \pm 1.25	13.82 \pm 1.00	12.96 \pm 2.46						
Intestino tenue	6.22 \pm 0.50	6.91 \pm 2.39	9.78 \pm 0.58	15.08 \pm 2.09	8.96 \pm 1.75	12.14 \pm 4.17	8.96 \pm 1.75	12.14 \pm 4.17	10.65 \pm 1.32	8.02 \pm 1.63						
Tessuto intestinale*	7.80 \pm 0.39	8.92 \pm 2.00	59.86 \pm 10.39	44.65 \pm 1.48	66.33 \pm 0.65	61.51 \pm 9.21	66.33 \pm 0.65	61.51 \pm 9.21	63.64 \pm 10.90	28.18 \pm 4.57						
Chilo*	92.00 \pm 0.39	90.05 \pm 2.00	40.14 \pm 10.39	55.35 \pm 1.48	33.67 \pm 0.65	38.49 \pm 9.21	33.67 \pm 0.65	38.49 \pm 9.21	36.36 \pm 10.90	71.82 \pm 4.57						
Urine	0.57	16.61 \pm 1.40	8.94 \pm 0.29	8.27 \pm 3.40	12.78 \pm 4.22	14.82 \pm 1.44	12.78 \pm 4.22	14.82 \pm 1.44	---	16.91 \pm 2.59						
Cuore/Polmone	5.29	9.48	3.85	6.48	4.04	4.38	4.04	4.38	2.26	4.62						
Cuore/Fegato	4.71	25.00	4.87	5.07	3.39	4.30	3.39	4.30	1.31	1.95						

* come % relativo sull'attività totale dell'intestino tenue

Tabella B2.4: Effetti della Ciclosporina A legati al sesso sui profili di biodistribuzione.

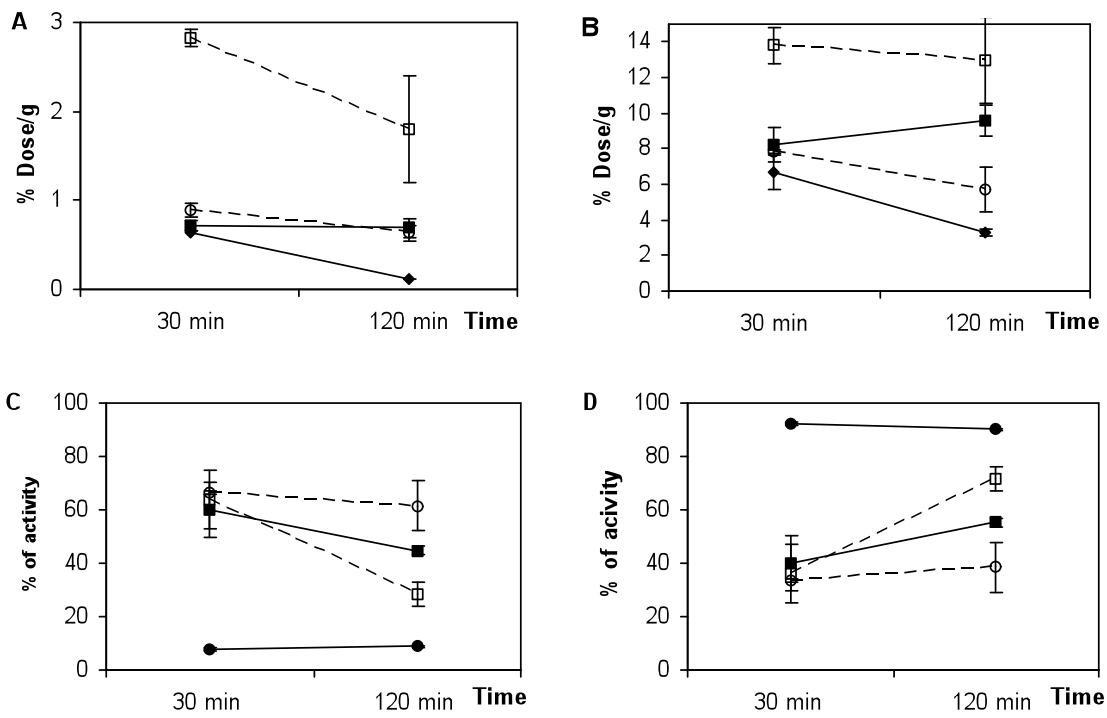


Figura B2.23: Curve tempo-attività di A) Fegato, B) Reni, C) Tessuto intestinale; D) Contenuto endoluminale, prima (riferimento) e dopo somministrazione di Ciclosporina A. (—●—) Riferimento-femmina; (—■—) CycA-femmina; (---○---) Riferimento-maschio; (---□---) CycA-maschio.

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.

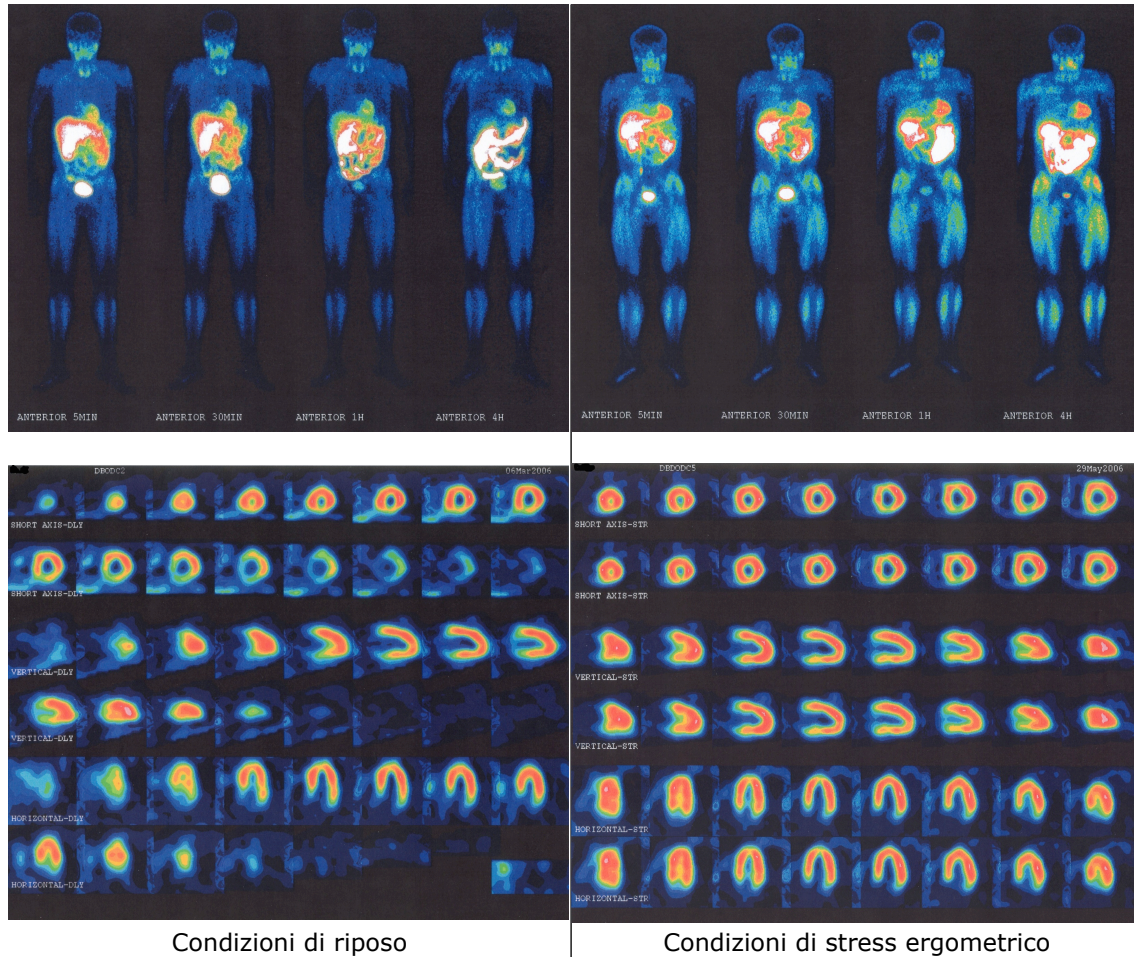


Figura B2.24. Immagini planari SPECT in vivo di un volontario sano ottenute per infusione venosa di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]\text{-DBODC5}$. *J. Nucl. Cardiology* 2007 14 , F21, *cortesia del Prof. Duatti*.

B3 Parte sperimentale

B3.1	Materiali	131
B3.2	Strumentazioni e prodotti per cromatografia	131
B3.3	Linee cellulari	132
B3.4	Preparazione e purificazione di ^{99m} Tc-Sestamibi	132
B3.5	Preparazione e purificazione di [^{99m} Tc(N)(PNP5)(DBODC)] ⁺	132
B3.6	Studi di captazione cellulare	133

B3.1 Materiali

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). I solventi sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. Il legante PNP5 [bis-(dimetossipropilfosfinoetil) etossietilammina] è stato preparato in accordo alle procedure riportate in letteratura^[27]. A causa della tendenza del legante fosfinico ad ossidare, tutti i solventi usati (alcol etilico, soluzione fisiologica) sono stati precedentemente degassati e le reazioni condotte in atmosfera controllata.

Il legante DBODC (bis-(N-etossietil)ditiocarbammato) è stato acquistato da Alchemy (Altedo, Italia). Il ^{99m}Tc, nella forma di Na[^{99m}TcO₄] (pertechnetato sodico) è stato ottenuto da generatore commerciale ⁹⁹Mo/^{99m}Tc DryTec (GE Healthcare, Milano).

^{99m}Tc-Sestamibi (Cardiolite[®], Bristol-Myers Squibb) è stato ottenuto attraverso la ricostituzione di kit commerciali. Il CCCP (carbonilcianide-m-clorofenilidrazone), la BSA (albumina di siero bovino), la Cyc-A (ciclosporina A), il Verapamil e l'MK571 sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

Gli inibitori e/o modulatori di farmacoresistenza MC18, MC134 e MC150 sono stati forniti dal Prof. N. Colabufo (Dipartimento Farmacochimico, Università di Bari).

B3.2 Strumentazioni e prodotti per cromatografia

Le analisi cromatografiche TLC e HPLC sono state usate per determinare la RCY dei complessi e la loro stabilità valutata in termini di RCP (purezza radiochimica). Le analisi TLC sono state eseguite su lastre C18 F_{254s} (Merk[®], Milano, Italia) usando come fase mobile una miscela costituita da: MeOH/MeCN/THF/NH₄Ac 0,5 M (3/3/2/2) e/o su lastrine di SiO₂ F₂₅₄ (Merk[®], Milano, Italia), usando come fase mobile una miscela costituita da EtOH/CHCl₃/Tol/NH₄Ac 0,5 M (5/3/3/0.5). La radioattività presente sulle lastre cromatografiche è stata rilevata con tecniche radiografiche e misurata utilizzando uno scanner Cyclone[®] Instrument equipaggiato con schermi *phosphorusimaging* e un sistema software di analisi dell'immagine OptiQuant (Packard[®], Meridian, CT).

Le analisi in HPLC sono state eseguite usando uno strumento Beckman Gold System dotato di un sistema a doppia pompa programmabile Model 126, valvola di iniezione 210A, un rivelatore UV Model 166 ($\lambda = 215$ nm), ed un *detector* radioattivo Model B-FC-3200 Bioscan. Le analisi HPLC sono state condotte utilizzando una precolonna a fase inversa Vydac (4,6 x 45 mm, 5 μ m) e una colonna a fase inversa Vydac 218TP C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m). L'eluizione è stata praticata a gradiente, usando come eluenti A = H₂O milliQ (0,1% TFA), B = MeCN (0,1% TFA); a 0-2 min B=20%, a 2-30 min B=80%, a 30-38 min B=80%, a 38-39 min B=20%, a 39-40 min B=20%. La velocità di flusso è mantenuta a 1ml/min e la lampada UV a una λ di 215 nm.

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

B3.3 Linee cellulari

La captazione dei ^{99m}Tc -complessi in cellule tumorali è stata valutata in vitro su diverse linee cellulari.

Le linee cellulari sono mantenute in fase di crescita logaritmica a 37°C in atmosfera di CO₂ 5%, utilizzando il media RPMI-1640 (Euroclone, Celbio, Milano), contenente siero bovino fetale (FBS 10%), tampone HEPES (25 mmoli dm⁻¹), L-glutammina (4mmoli dm⁻¹), penicillina (50 unità/ml), streptomicina (5mg/ml).

Per gli studi di captazione, le cellule sono state staccate dalle piastre di coltura con tripsina (0,05% V/V), EDTA (0,53 mmoli dm⁻¹), lavate e risospese con RPMI-1640 in modo da ottenere una concentrazione di 5x10⁶ cellule/ml.

B3.4 Preparazione e purificazione di ^{99m}Tc -Sestamibi

La sintesi del radiotracciante ^{99m}Tc -Sestamibi si ottiene tramite una reazione one-step che prevede l'aggiunta di 0,250 ml di Na[$^{99m}\text{TcO}_4$] (50.0 MBq - 3.0 GBq) ad una vial contenente 0,2 ml di soluzione madre di MIBI, 0.1 mg SnCl₂ sospesi in 0,10 ml di Soluzione Fisiologica e 0,750 ml di soluzione fisiologica 0.9% NaCl. La resa radiochimica, determinata con tecniche di TLC e di HPLC, dopo 15 min a 100°C è stata > 95%.

La soluzione madre di MIBI si ottiene aggiungendo 1 ml di soluzione fisiologica ad una vial contenente 1 mg di MIBI, come Cu(MIBI)₃, 1 mg di cistina, 2,6 mg di sodio citrato e 20 mg di mannitolo.

Prima degli studi di captazione cellulare, allo scopo di eliminare l'influenza di eventuali impurezze, il complesso è stato purificato come segue: una cartuccia SEP PAK CM (Waters®), contenente una resina a scambio cationico, è condizionata con 10 ml di acqua deionizzata. La miscela di reazione contenente il complesso ^{99m}Tc -Sestamibi è diluita con acqua deionizzata (10 ml) e caricata sulla SEP PAK CM: circa il 90% dell'attività iniziale è trattenuto dalle resina. La colonna è quindi lavata in successione con 10 ml di acqua deionizzata e 5 ml di una soluzione al 40% in EtOH. Il complesso è poi eluito con 1 ml di una miscela 90:10 di EtOH:Soluzione Fisiologica (0.9% NaCl) in una provetta.

I solventi vengono evaporati sotto flusso di azoto; il complesso viene sciolto in acqua per ottenere una soluzione salina isotonica contenente meno del 5% (V/V) di etanolo che viene poi utilizzata per gli studi di captazione cellulare.

B3.5 Preparazione e purificazione di [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DBODC})(\text{PNP5})$]⁺ [28]

In una vial contenente 5.0 mg di succinildiidrazide (SDH), 5 mg di acido etilendiamminotetracetico (EDTA), 1 ml di soluzione fisiologica 0.9% NaCl, 0.1 mg SnCl₂ sospesi in 0.10 ml di Soluzione Fisiologica, sono aggiunti 0,250 ml di Na[$^{99m}\text{TcO}_4$] (50.0 MBq - 3.0 GBq). La miscela è mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente, alla miscela di [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})$]²⁺_{mix} intermedi, sono aggiunti 1.0 mg di PNP5 sospeso in 0.5 ml di soluzione ottenuta disciogliendo 2.0 mg di γ -ciclodestrina in 1.0 ml di Soluzione Fisiologica e 2.0 mg di legante

ditiocarbammico DBODC sciolto in 0.2 ml di Soluzione Fisiologica. La resa radiochimica (RCY) di ogni composto, determinata con tecniche di TLC e di HPLC, dopo 30 min a 80°C è stata > 95%.

Prima degli studi di captazione cellulare, allo scopo di eliminare l'influenza di eventuali impurezze, il complesso è stato purificato come segue: una cartuccia SEP PAK C18 (Waters®) è condizionata con alcol etilico (5 ml) e con acqua deionizzata (5 ml). La miscela di reazione contenente il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ è diluita con acqua deionizzata (10 ml) e caricata sulla SEP PAK C18: circa il 90% dell'attività iniziale è trattenuto dalle resina. La colonna è quindi lavata in successione con 20 ml di acqua deionizzata e 5 ml di una soluzione al 35% in EtOH. Il complesso è poi eluito con 1 ml di una miscela 90:10 di EtOH:Soluzione Fisiologica(0.9% NaCl) in una provetta.

Una cartuccia SEP PAK CM (Waters®), contenente una resina a scambio cationico, è condizionata con 10 ml di acqua deionizzata. L'eluato precedentemente ottenuto, viene quindi diluito in 10 ml di acqua deionizzata e caricato sulla SEP PAK CM: il 60-90% dell'attività è trattenuto dalla resina. La colonna è quindi lavata in successione con 20 ml di acqua deionizzata e con 5 ml di una soluzione al 70% di EtOH. Il complesso è eluito con 1 ml di una miscela 90:10 di EtOH:Soluzione Fisiologica (0.9% NaCl). Dopo purificazione la purezza radiochimica (RCP) dei complessi è > 95%.

I solventi vengono evaporati sotto flusso di azoto; il complesso viene sciolto in acqua fisiologica per ottenere una soluzione salina isotonica che viene poi utilizzata per gli studi di captazione cellulare.

B3.6 Studi di captazione cellulare

Gli studi sono stati condotti incubando le cellule in provette di vetro precedentemente sterilizzate. In ogni sessione sperimentale, le cellule sono preincubate per 30 min a 4°C e 37°C. Gli inibitori, impiegati per valutare la farmacoresistenza, sono aggiunti 10 minuti dopo l'inizio dell'incubazione.

In una provetta contenente una sospensione di cellule opportunamente scelte, sono stati aggiunti 0,2405 MBq/ 5 µL di soluzione fisiologica del radiocomplesso purificato. Ciascun campione è stato incubato per 120 min a 4°C o 37°C. A definiti intervalli di tempo (5, 15, 30, 60, 90 e 120 min) dall'incubazione, da ciascun campione una aliquota (8µL) è stata prelevata e stratificata su FBS freddo (350µL) contenuto in una microprovetta Eppendorf da 500 µL (n=3). Dopo centrifugazione (14000 giri x 2 min), le microprovette sono state congelate in un bagno di acetone e ghiaccio secco.

La parte inferiore delle microprovette, contenente il *pellet* di cellule, è stata tagliata e collocata in una provetta per il conteggio, mentre la restante parte con il surnatante è stata posta in una seconda provetta di conteggio. L'attività di entrambe le frazioni è stata determinata utilizzando un contatore gamma (Packard).

La percentuale di attività associata alle cellule è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\%_{\text{Uptake}} = \frac{cpm_{\text{pellet}}}{(cpm_{\text{pellet}} + cpm_{\text{surnatante}})} \cdot 100$$

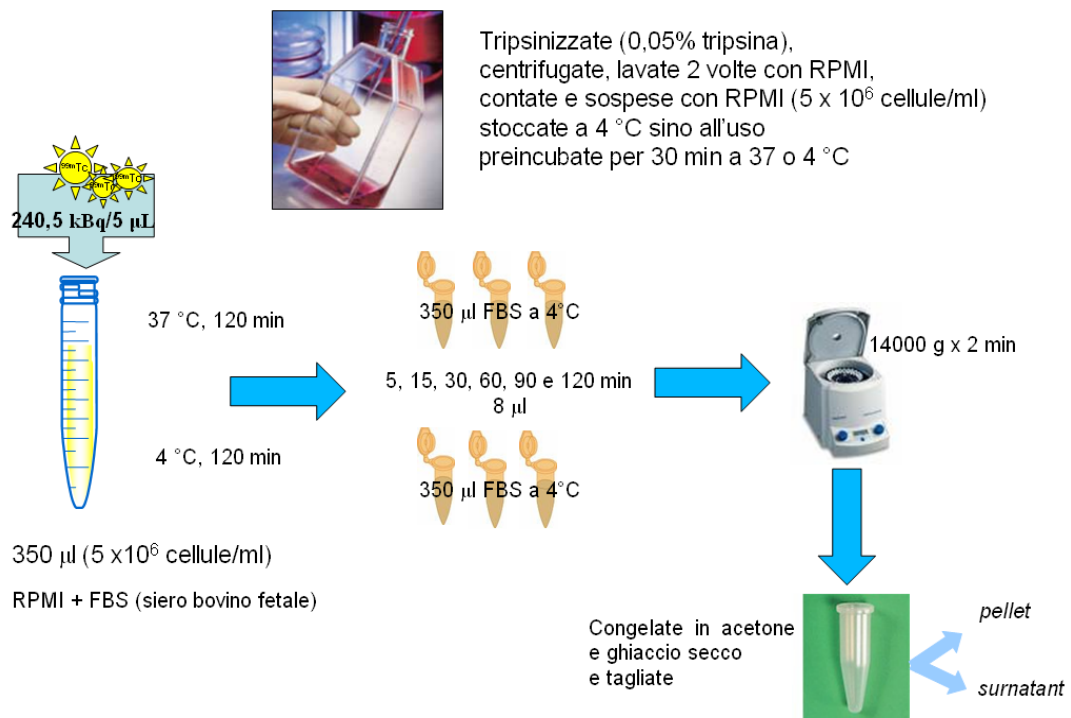


Figura B3.1. Rappresentazione schematica dell'esperimento di captazione cellulare del radiotracciante.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in doppio e ripetuti 4 volte.

La quantità di surnatante presente nel *pellet* è stata determinata essere $< 1\%$.

La vitalità cellulare, valutata prima e durante gli esperimenti mediante trypan blue è sempre stata $> 90\%$.

Al termine di ogni esperimento le cellule sono state trattate con CCCP.

B4 Risultati e Discussione

L'obiettivo del lavoro esposto consiste nel valutare, attraverso studi in-vitro, la possibilità di: i) validare $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ come substrato dei trasportatori P-gP MRP; ii) esplorare l'utilità di questo nuovo tracciante nell'imaging tumorale; iii) nella determinazione dell'attività, espressione e funzione delle P-gP e delle proteine ad esse associate.

A tal fine il complesso deve soddisfare alcuni criteri fondamentali:

- assente o irrilevante interazione non specifica con strutture cellulari quali membrane e altre regioni idrofobiche (*binding* aspecifico);
- elevata differenza dei livelli di captazione dell'agente radioattivo tra cellule sensibili ai farmaci e cellule che esprimono farmaco resistenza mediata da P-gP MDR e MRP_n;
- elevato aumento della captazione del tracciante nelle cellule farmaco resistenti dopo trattamento con MDR-modulatori/inibitori (es. Verapamil, Ciclosporina A, etc...).

Dal punto di vista sperimentale, lo sviluppo del progetto, ha considerato la valutazione di alcuni parametri di base quali la cinetica di accumulo (time course, 5-120 min) di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, a 4 e 37 °C, in diverse linee cellulari tumorali umane farmaco sensibili e nella corrispondente variante farmaco resistente, utilizzando ^{99m}Tc -Sestamibi come riferimento.

Linee cellulari C13*, DDP (cis diamino dicloro platino) resistenti, caratterizzate da un elevato potenziale di membrana plasmatico/mitocondriale, nonché da un'elevata espressione di trasportatori MPR-1 e MPR-2 e cellule transfettate del tipo MDCK-MRP1 sovra-esprimenti trasportatori MRP-1 sono state selezionate al fine di definire la capacità di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ di riconoscere la resistenza determinata da proteine MRP_n.

Gli esperimenti sono stati condotti a 4 e 37 °C per misurare rispettivamente l'uptake non specifico dei traccianti, indipendente dal potenziale di membrana, e l'accumulo netto degli stessi. A 4 °C, infatti, il metabolismo è ridotto e il potenziale di membrana si presenta meno polarizzato.

Nelle linee farmaco-resistenti la cinetica di captazione di entrambi i radio-complessi è stata determinata in presenza di MDR modulatori/inibitori classici, quali:

- *Verapamil*, bloccante dei canali del calcio;
- *Ciclosporina A*, agente immunosoppressivo, modulatore MDR ad ampio spettro;
- *Butionina sulfossimina* (BSO), inibitore della sintesi del glutatione: inibisce indirettamente l'attività MRP, attraverso la riduzione delle riserve di glutatione;
- *MK571*, inibitore selettivo delle MRP.
- Oltre ai P-gP MDR classici, è stata studiata la capacità inibitrice di nuove molecole a struttura 6,7-dimetossitetraidroisochinolinica: *MC18*, *MC134* e *MC150*.

La vitalità cellulare è stata determinata prima e durante tutti gli esperimenti mediante *trypan blu*, colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte.

Al termine di ogni esperimento, le cellule sono state trattate con CCCP 10 μM (Carbonil cianide m-clorofenil idrazone), agente in grado di provocare una depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale. Il Carbonil cianide m-clorofenil idrazone influisce sulle reazioni di sintesi proteica nei mitocondri. Nei mitocondri, il carbonil cianide m-clorofenil idrazone attraversa la membrana fosfolipidica in forma neutra e successivamente deprotona all'ammina secondaria:

riesce in forma anionica. Il CCCP, a questo punto in forma anionica, presenta una carica negativa ampiamente delocalizzata su circa dieci atomi, il che gli conferisce un campo elettrico molto debole. Ciò permette all'anione di ridiffondere facilmente nei mezzi non polari, quali le membrane fosfolipidiche. Il processo può essere ripetuto innumerevoli volte, distruggendo il potenziale di membrana. Anche una piccola quantità di CCCF può trasportare un enorme numero di protoni, distruggendo il gradiente di pH e cortocircuitando la catena respiratoria

In Tabella B4.1 sono riportati gli acronimi corrispondenti alle linee cellulari studiate (wild type e variante corrispondente farmaco resistente), specificando per ciascuna la tipologia di trasportatore ABC caratteristica, nonché gli inibitori d'elezione.

Linea cellulare wild type	Variante farmaco resistente	Trasportatore ABC	Inibitore
MCF7 (breast cancer)			
2008 (ovarian cancer)		PgP/MDR1 MRP1	Verapamile, Cyclosporina A, MC18 Cyclosporina A, MK571
A2780 (ovarian cancer)		-	-
MDCK (Madin-Darby-Canine-Kidney)		-	-
	MCF7/MDR+ (Breast cancer; Doxorubicine resistant)	PgP/MDR1 MRP1	Verapamile, Cyclosporina A, MC18, MC134 osporina A, MK571, MC
	C13* (ovarian cancer; DDP resistant)	MRP1 MRP2	losporin A, MK571, MC MK571
	A2780/Adr+ (ovarian cancer; Doxorubicine resistant)	MRP2 MRP1	71 sporina A, MK571, M
	MDCK/MRP1 (Madin-Darby-Canine-Kidney; MRP1)	MRP1	MK571, MC150

Tabella B4.1. Linee cellulari ed inibitori valutati in questo studio.

Ogni esperimento confronta la percentuale di captazione cellulare (uptake) del [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ con quella del ^{99m}Tc -Sestamibi.

Generalmente in termini di uptake cellulare, la differente lipoficità e solubilità dei due complessi influisce sulla loro permeabilità e relativa affinità per i trasportatori P-gP MDR1 determinando differenze nel loro iniziale accumulo.

I 'time course' dei due traccianti nelle diverse linee cellulari farmaco sensibili e nelle corrispondenti farmaco resistenti, a 4 e 37 °C, sono riportati nelle Tabelle B4.2-B4.5. I dati sono espressi come percentuale di uptake cellulare su una media di 4 esperimenti. $\Delta 0$ definisce la differenza nella percentuale di uptake basale registrato a 37 °C e 4 °C, mentre $\Delta 1$ definisce la differenza nella percentuale di uptake tra cellule normali e le corrispondenti farmaco resistenti.

In successione sono presentati i dati relativi allo studio in condizioni basali (4 e 37 °C) di [^{99m}Tc -Sestamibi] e [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ nelle linee:

- 2008/C13*
- MCF7 / MCF7/MDR
- A2780 / A2780/Adr+
- MDCK / MDCK/MRP1

2008	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ	MIBI Δ1
		media ± DS	media ± DS			media ± DS	media ± DS						
	5 min	1.78 ± 0.49	8.71 ± 1.21	6.93	2.03	1.92 ± 0.9	10.2 ± 2.25	8.28	1.12				
	15 min	1.80 ± 0.47	9.42 ± 0.67	7.62	1.39	2.17 ± 0.5	12.5 ± 3.15	10.28	0.59				
	30 min	2.21 ± 0.77	10.81 ± 1.63	8.6	2.97	1.80 ± 0.7	10.4 ± 2.01	8.64	-0.68				
	60 min	3.12 ± 0.73	10.93 ± 1.46	7.81	3.08	1.56 ± 0.5	11.6 ± 1.59	10.01	1.15				
	90 min	3.27 ± 1.37	10.58 ± 1.80	7.31	1.44	2.22 ± 0.9	10.3 ± 2.08	8.11	0.41				
	120 min	2.95 ± 0.99	10.29 ± 1.54	7.34	2.28	2.45 ± 1.3	10.5 ± 1.32	8.03	1.01				
C13*	ime cours	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBIΔ	MIBIΔ1
		media ± DS	media ± DS			media ± DS	media ± DS						
	5 min	2.72 ± 0.50	6.68 ± 1.49	3.96		2.58 ± 0.7	9.08 ± 1.58	6.5					
	15 min	2.18 ± 0.51	8.03 ± 0.95	5.85		2.96 ± 1	11.9 ± 2.42	8.9					
	30 min	2.56 ± 1.40	7.84 ± 1.03	5.28		2.46 ± 1.6	11.1 ± 1.15	8.66					
	60 min	1.17 ± 0.39	7.85 ± 0.78	6.68		2.16 ± 0.4	10.4 ± 2.12	8.26					
	90 min	2.60 ± 0.75	9.14 ± 1.90	6.54		2.06 ± 1	9.92 ± 2.32	7.86					
	120 min	1.79 ± 0.36	8.01 ± 2.45	6.22		2.44 ± 1.3	9.47 ± 2.05	7.03					

Tabella B4.2. Uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo 2008 e C13*.

Per una comprensione più rapida del dato tabulare, ogni Tabella è seguita da due grafici, dove in una forma squisitamente accattivante, è riportato l'andamento dei due traccianti in funzione del tempo.

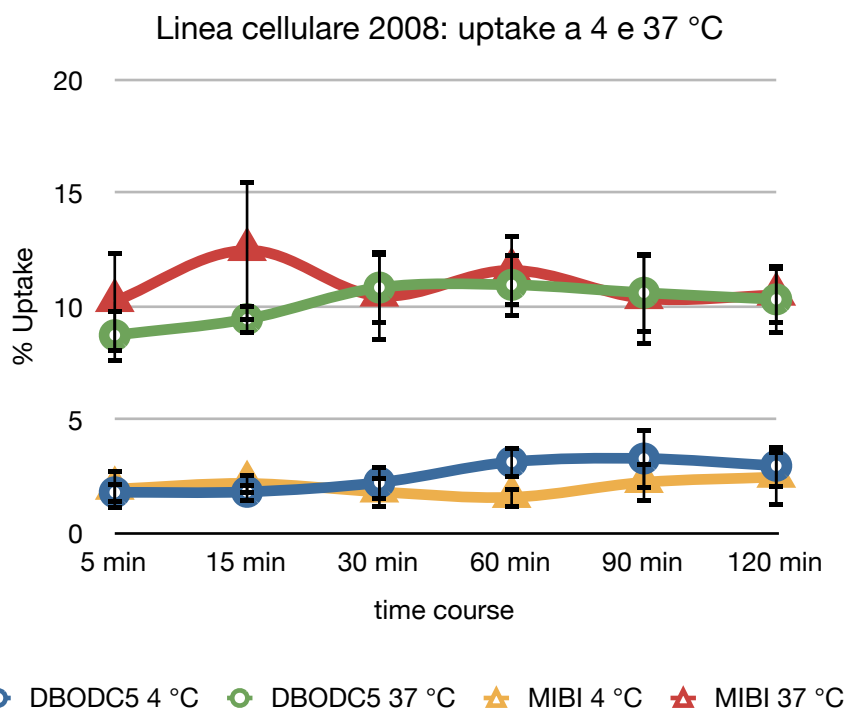


Grafico B4.1. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo 2008.

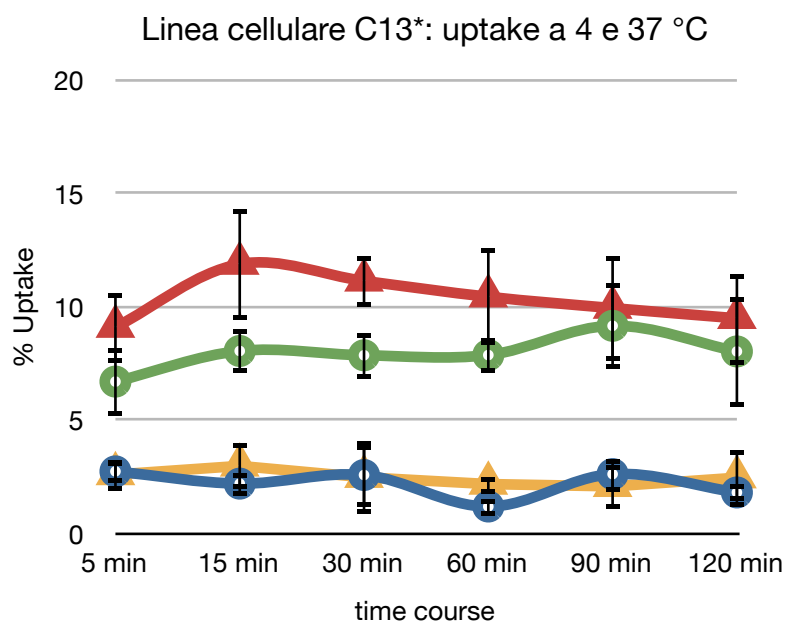
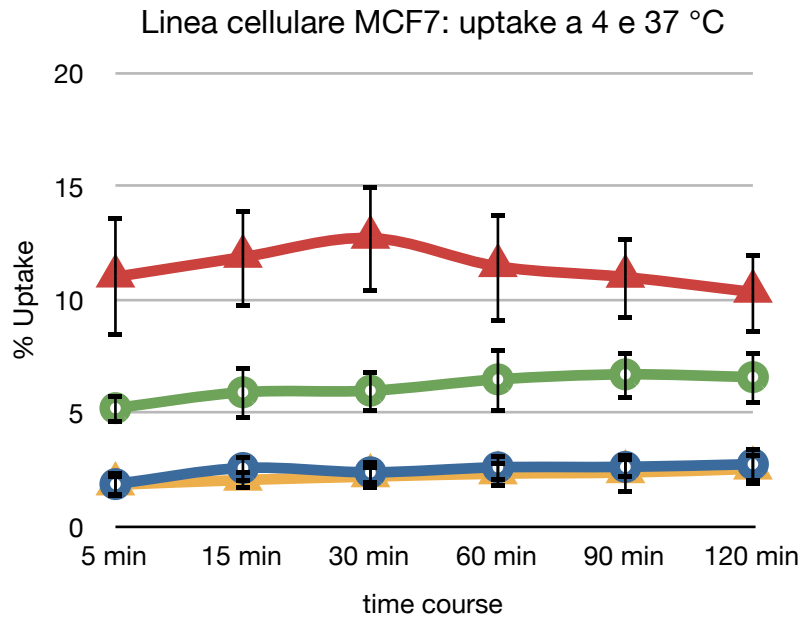


Grafico B4.2. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo C13*.

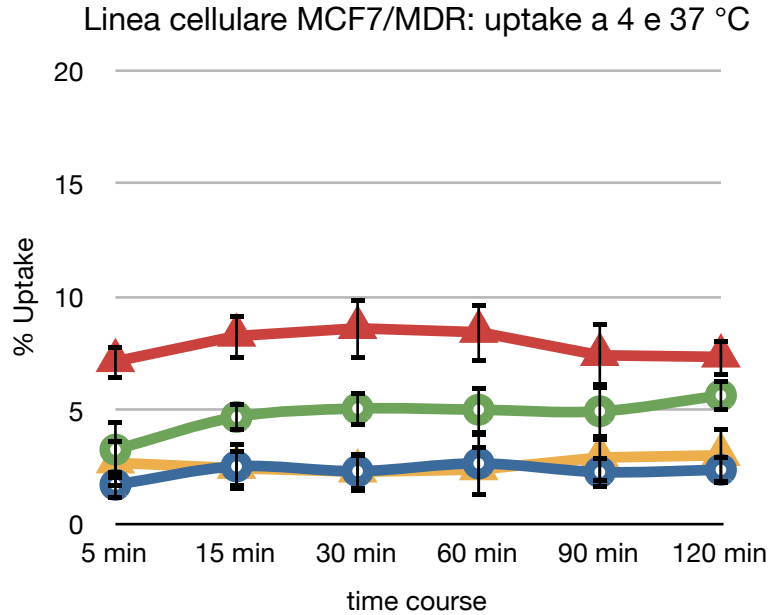
MCF7	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5) Δ 0	(5) Δ 1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ 0	MIBI Δ 1
		media \pm DS	media \pm DS	media \pm DS	media \pm DS			media \pm DS	media \pm DS				
	5 min	1.85 \pm 0.61	5.20 \pm 0.68	3.35	1.95	1.82 \pm 0.5	11 \pm 2.65	9.17	3.85				
	15 min	2.56 \pm 0.62	5.90 \pm 1.22	3.34	1.21	2.03 \pm 0.4	11.9 \pm 2.23	9.83	3.6				
	30 min	2.37 \pm 0.55	5.97 \pm 0.97	3.6	0.91	2.18 \pm 0.6	12.7 \pm 2.39	10.52	4.1				
	60 min	2.59 \pm 0.63	6.47 \pm 1.45	3.88	1.46	2.31 \pm 0.6	11.5 \pm 2.47	9.14	3.02				
	90 min	2.61 \pm 0.51	6.69 \pm 1.09	4.08	1.75	2.36 \pm 0.9	11 \pm 1.88	8.62	3.57				
	120 min	2.73 \pm 0.80	6.57 \pm 1.23	3.84	0.93	2.52 \pm 0.7	10.3 \pm 1.81	7.8	2.98				
MCF7/MDR	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5) Δ 0	(5) Δ 1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ 0	MIBI Δ 1
		media \pm DS	media \pm DS	media \pm DS	media \pm DS			media \pm DS	media \pm DS				
	5 min	1.70 \pm 0.67	3.25 \pm 1.32	1.55		2.67 \pm 1.1	7.14 \pm 0.81	4.47					
	15 min	2.51 \pm 1.06	4.69 \pm 0.65	2.18		2.43 \pm 0.8	8.26 \pm 1.05	5.83					
	30 min	2.30 \pm 0.87	5.06 \pm 0.77	2.76		2.27 \pm 0.9	8.60 \pm 1.37	6.33					
	60 min	2.64 \pm 1.45	5.01 \pm 1.09	2.37		2.37 \pm 1.2	8.43 \pm 1.34	6.06					
	90 min	2.26 \pm 0.74	4.94 \pm 1.31	2.68		2.90 \pm 1.1	7.41 \pm 1.49	4.51					
	120 min	2.36 \pm 0.67	5.64 \pm 0.71	3.28		3.00 \pm 1.3	7.34 \pm 0.87	4.34					

Tabella B4.3. Uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MCF7 e MCF7/MDR.



● DBODC5 4 °C ● DBODC5 37 °C ▲ MIBI 4 °C ▲ MIBI 37 °C

Grafico B4.3. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MCF7.



● DBODC5 4 °C ● DBODC5 37 °C ▲ MIBI 4 °C ▲ MIBI 37 °C

Grafico B4.4. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MCF7/MDR.

A2780 wt	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ	MIBI Δ1
		media ± DS		media ± DS				media ± DS		media ± DS			
	5 min	0.31 ± 0.10		12.25 ± 1.25		11.94	9.89	0.30 ± 0.1		14.4 ± 1.41		14.12	10.54
	15 min	0.35 ± 0.21		17.93 ± 2.15		17.58	15.02	0.33 ± 0.2		17.3 ± 2.22		16.93	12.67
	30 min	0.43 ± 0.30		17.67 ± 1.35		17.24	15.1	0.73 ± 0.7		19 ± 0.99		18.26	15.21
	60 min	0.45 ± 0.25		12.36 ± 1.42		11.91	9.05	0.86 ± 0.6		15.2 ± 2.33		14.33	11.01
	90 min	0.85 ± 0.63		10.34 ± 1.79		9.49	6.86	0.80 ± 0.8		14 ± 1.72		13.21	10.25
	120 min	0.72 ± 0.30		8.53 ± 1.40		7.81	5.82	0.36 ± 0.2		12 ± 0.96		11.63	8.15
A2780 /Adr	me cours	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBIΔ	MIBIΔ1
		media ± DS		media ± DS				media ± DS		media ± DS			
	5 min	1.29 ± 0.20		2.36 ± 0.89		1.07		2.35 ± 0.5		3.88 ± 1.76		1.53	
	15 min	2.45 ± 0.60		2.91 ± 0.88		0.46		1.59 ± 0.2		4.59 ± 1.47		3	
	30 min	2.02 ± 0.00		2.57 ± 0.95		0.55		2.74 ± 0.6		3.78 ± 1.15		1.04	
	60 min	2.34 ± 0.34		3.31 ± 0.95		0.97		3.78 ± 0.7		4.18 ± 1.54		0.4	
	90 min	2.28 ± 0.33		3.48 ± 1.81		1.2		3.13 ± 0.2		3.76 ± 1.28		0.63	
	120 min	3.60 ± 0.69		2.71 ± 1.29		-0.89		1.80 ± 0.2		3.84 ± 1.61		2.04	

Tabella B4.4. Uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo A2780 e A2780/Adr.

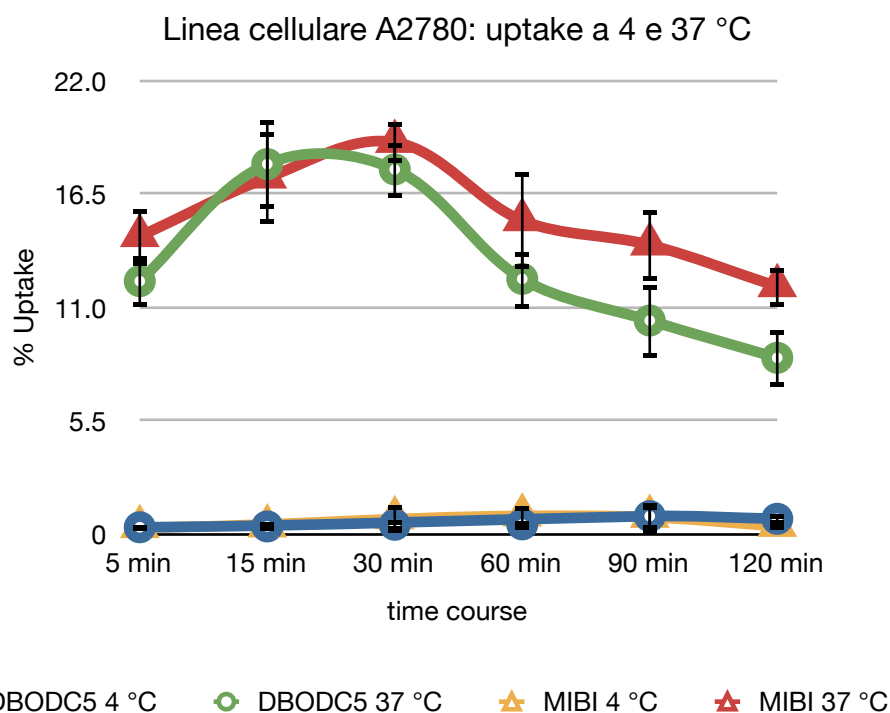


Grafico B4.5. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo A2780.

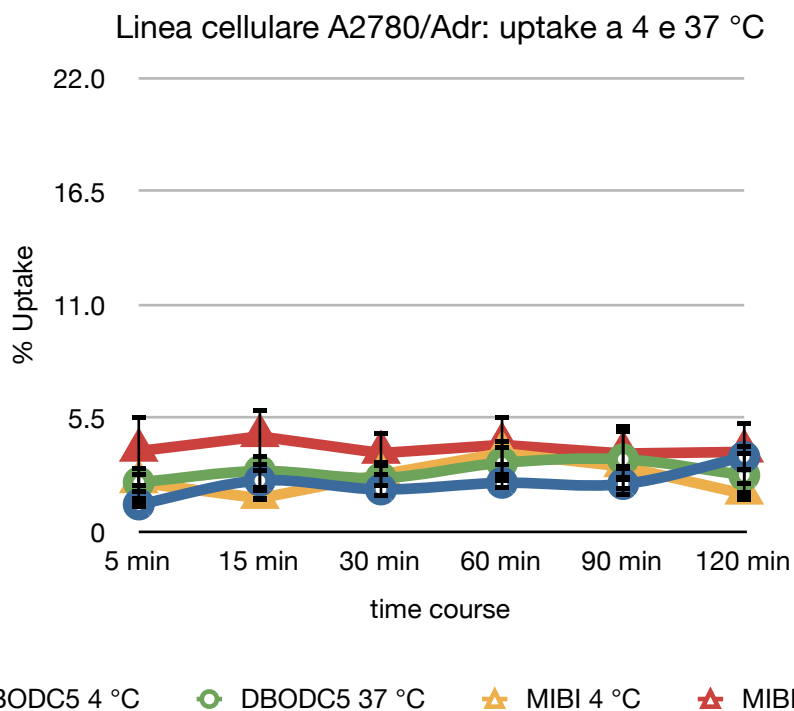
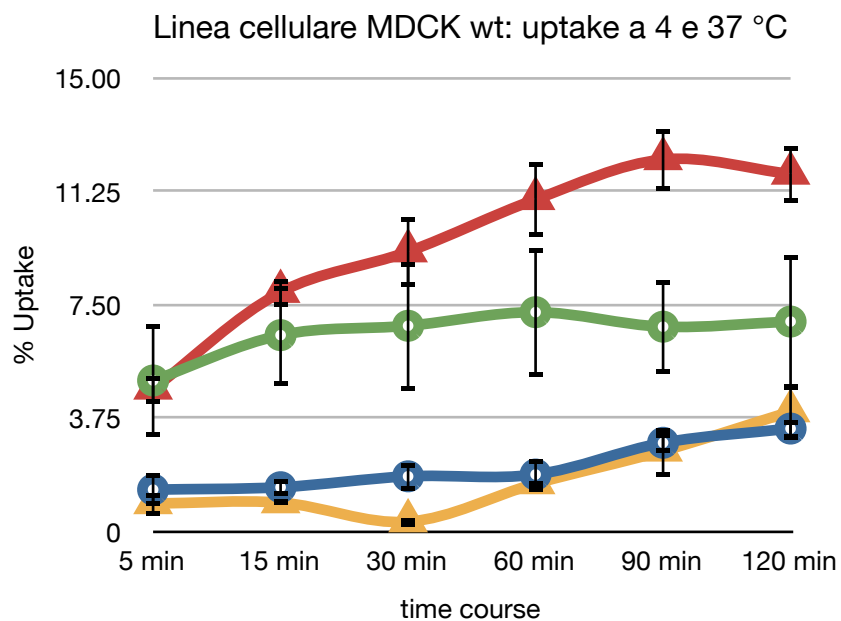


Grafico B4.6. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo A2780/Adr.

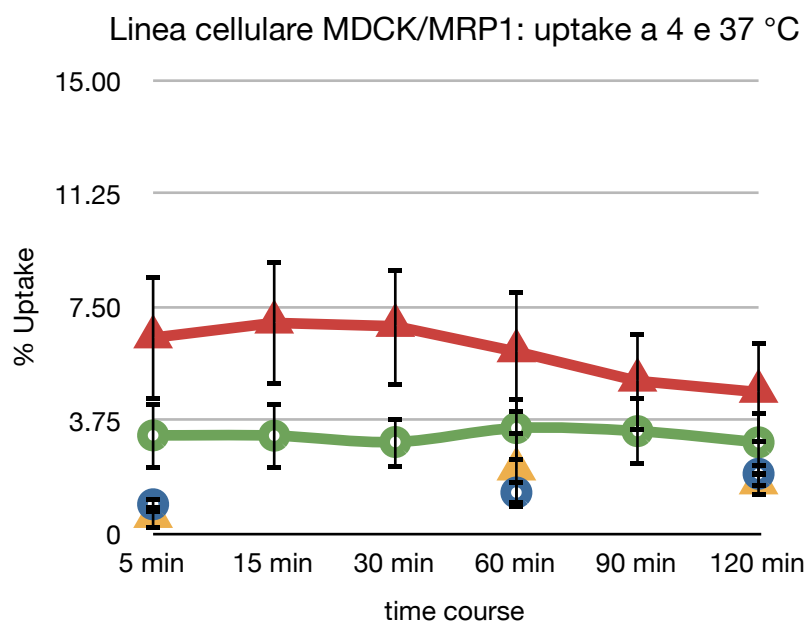
MDCK wt	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ	MIBI Δ1
		media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS	media ± DS
	5 min	1.37 ± 0.54	4.98 ± 1.86	3.61	1.74	0.91 ± 0.4	4.70 ± 0.48	3.79	-1.77				
	15 min	1.45 ± 0.29	6.48 ± 1.67	5.03	3.25	0.94 ± 0	7.90 ± 0.46	6.96	0.94				
	30 min	1.81 ± 0.46	6.79 ± 2.15	4.98	3.77	0.31 ± 0.2	9.24 ± 1.16	8.93	2.39				
	60 min	1.87 ± 0.57	7.24 ± 2.14	5.37	3.76	1.57 ± 0.1	11 ± 1.24	9.4	4.96				
	90 min	2.92 ± 0.32	6.76 ± 1.56	3.84	3.38	2.65 ± 0.8	12.3 ± 1.04	9.64	7.25				
	120 min	3.39 ± 0.34	6.93 ± 2.23	3.54	3.92	3.95 ± 0.9	11.8 ± 0.95	7.86	7.14				
MDCK /MRP1	time course	DBODC5 4 °C		DBODC5 37 °C		(5)Δ0	(5)Δ1	MIBI 4 °C		MIBI 37 °C		MIBI Δ	MIBI Δ1
	5 min	0.96 ± 0.29	3.24 ± 1.13	2.28	0.53 ± 0.4	6.47 ± 2.09	5.94						
	15 min	±	3.23 ± 1.12	±	6.96 ± 2.08								
	30 min	±	3.02 ± 0.87	±	6.85 ± 1.98								
	60 min	1.35 ± 0.40	3.48 ± 1.09	2.13	2.10 ± 1.3	6.01 ± 2.04	3.91						
	90 min	±	3.38 ± 1.15	±	5.04 ± 1.67								
	120 min	1.97 ± 0.44	3.01 ± 1.09	1.04	1.64 ± 0.4	4.67 ± 1.69	3.03						

Tabella B4.5. Uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MDCK e MDCK/MRP1.



● DBODC5 4 °C ● DBODC5 37 °C ▲ MIBI 4 °C ▲ MIBI 37 °C

Grafico B4.7. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MDCK.



● DBODC5 4 °C ● DBODC5 37 °C ▲ MIBI 4 °C ▲ MIBI 37 °C

Grafico B4.8. Confronto della percentuale di uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, valutato a 4 °C e 37 °C, in cellule del tipo MDCK/MRP1.

I complessi mostrano, nelle diverse linee cellulari, una cinetica di captazione simile, caratterizzata, a 37 °C, da un rapido incremento dell'attività nei primi 15 min dall'inizio dell'incubazione, sino a raggiungere un *plateau* che è mantenuto per la durata dell'esperimento.

Variazioni della percentuale di uptake dei due agenti nelle diverse linee cellulari è strettamente correlato alle caratteristiche intrinseche della cellula, in particolare alla diversa densità mitocondriale e espressione di proteine trasportatrici.

Marcate differenze si osservano nelle percentuali di uptake dei due complessi in linee cellulari quali MCF7, MDCK e C13*, dove il ^{99m}Tc-Sestamibi presenta una captazione più elevata rispetto a quella di [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺; nel dettaglio, la percentuale di uptake valutata, a 37 °C, dopo 60 min dall'inizio dell'incubazione del ^{99m}Tc-Sestamibi e del [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ sono rispettivamente: 11.5±2.47 (MIBIΔ0=9.14) e 6.47±1.45 ((5)Δ0=3.88) in MCF7; 11.00±1.24 (MIBIΔ0=9.4) e 7.24±2.14 ((5)Δ0=5.37) in MDCK; 10.42±2.12 (MIBIΔ0=8.26) e 7.85±0.78 ((5)Δ0=6.68) in C13*.

Le percentuali di uptake dei due agenti sono assolutamente comparabili nelle rimanenti linee cellulari.

A 4 °C la percentuale di uptake non specifico, per entrambi i composti, si assesta intorno al 2-3% dopo 60 min. Studi di vitalità cellulare indicano che le cellule sono vitali per tutta la durata dell'esperimento.

Dopo l'aggiunta di CCCP, più del 70% dell'attività accumulata nella cellula è stata rilasciata, riducendo la percentuale di attività associata alla componente internalizzata al 2% del totale.

I risultati ottenuti da questi esperimenti, indicano che l'uptake di [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ e di ^{99m}Tc-Sestamibi è strettamente correlato all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Infatti, il basso uptake di entrambi i complessi a 4°C indica una ridotta capacità di legame non specifico dei traccianti nei confronti della membrana plasmatica e delle sue strutture idrofobiche. In oltre, il considerevole rilascio dell'attività cellulare indotto da CCCP indica un selettivo accumulo di entrambi gli agenti in corrispondenza delle strutture mitocondriali.

Per entrambi i composti, si osserva una riduzione dell'uptake netto tra cellule farmaco sensibili e cellule farmaco resistenti. Tale parametro valutato attraverso la misura di MIBI/(5)Δ0 è dipendente da una diversa espressione di PgP/MDR e MRP1.

Nelle Tabelle B4.2-B4.5 e nei Grafici B4.1 - B4.8 sono riportate le cinetiche di accumulo del [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ e ^{99m}Tc-Sestamibi, a 4 e 37 °C, in cellule farmaco resistenti (C13*, MCF7/MDR⁺, A2780-Adr⁺, MDCK-MRP1) valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, MK-571, MC18, etc.).

In accordo con quanto riportato in letteratura, l'accumulo cellulare netto dei traccianti [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ e ^{99m}Tc-Sestamibi è inversamente proporzionale al livello di espressione delle PgP/MDR e MRP1 ed un aumento dell'uptake dei radio-complessi è stato osservato dopo esposizione a modulatori/inibitori MDR.

Nella linea C13*, variante DDP resistente della linea 2008, che esprime PgP e MRP1 e MRP2, la captazione di [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ risulta inferiore a quella riscontrata nelle 2008 (Δ~3) mentre quella di ^{99m}Tc-Sestamibi è paragonabile. In questa linea, il relativamente alto uptake, osservato a 37 °C per entrambi i traccianti, può essere correlato all'alta densità mitocondriale esibita da queste cellule, responsabile di un'augmentata attività metabolica e quindi di un potenziale di membrana più negativo.

In cellule MCF7/MDR⁺, l'uptake di [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ a 37 °C è inferiore rispetto a quello osservato nelle corrispondenti cellule wild type ($\Delta 0 \sim 2.5$). Il ^{99m}Tc-Sestamibi presenta un profilo di uptake comparabile con quello riportato in letteratura ed un valore $\Delta 0 \sim 6$, nettamente superiore rispetto a quello osservato per [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺.

In cellule A2780/Adr⁺ il $\Delta 1$ valutato per i due agenti dopo 30 minuti di incubazione è comparabile: [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ $\Delta 1 = 15.10$; ^{99m}Tc-Sestamibi $\Delta 1 = 15.21$.

In cellule MDCK-MPR1 il $\Delta 1$ valutato per i due agenti dopo 60 minuti di incubazione è di 4.96 per il ^{99m}Tc-Sestamibi e 3.76 per il [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺.

Gli effetti del Verapamil, noto inibitore della P-gp MDR1, utilizzato ad una concentrazione di 80 e a 50 μ M, in cellule 2008 e C13* sono riportati nei Grafici B4.9 e B4.10.

I valori di percentuale uptake nelle 2008 sono superiori di circa 3.3 volte per [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ e di 3.5 volte per il ^{99m}Tc-Sestamibi rispetto al basale, mentre nelle C13* l'incremento è di circa 3 volte per entrambi. Non si è evidenziata una significativa differenza nella risposta cellulare alle due diverse concentrazioni, conseguentemente la concentrazione utilizzata nelle altre linee cellulari è 50 μ M.

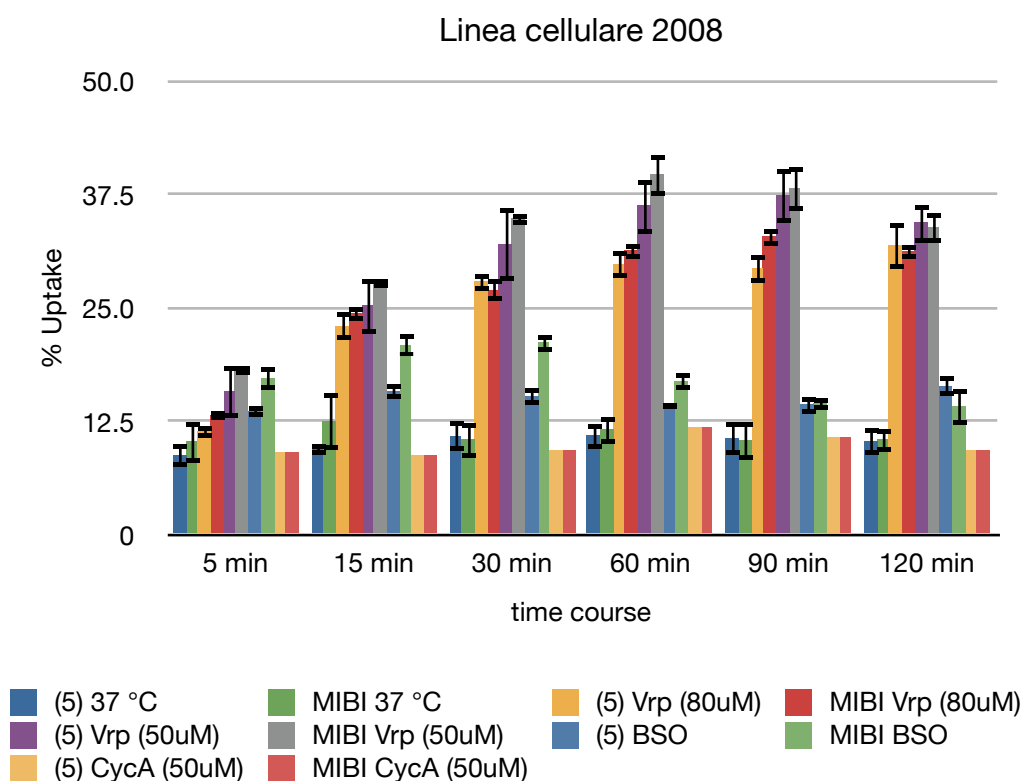


Grafico B4.9. Linea cellulare 2008, uptake di [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺ e ^{99m}Tc-Sestamibi a 37 °C ed in presenza di Verapamil 80 μ M, 50 μ M, Ciclosporina A 50 μ M e BSO.

A seguito del trattamento con il Verapamil, il valore di $\Delta 2$ e $\Delta 3$, a 60 min, che esprime rispettivamente la differenza di uptake cellulare determinato in presenza dell'inibitore alle due diverse concentrazioni 80 ($\Delta 2$) e a 50 μ M ($\Delta 3$), rispetto alle condizioni basali (37 °C) è rispettivamente di: 18.84 e 25.3 per [^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]⁺; 19.77 e 28.08 per ^{99m}Tc-Sestamibi

in cellule 2008; 13.56 e 13.03 per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, 18.06 e 19.21 per ^{99m}Tc -Sestamibi in cellule C13*. Il più alto valore di Δ riscontrato nelle 2008 può essere imputato alla selettiva azione di questo inibitore verso proteine P-gP MDR. Questo, da una prima indicazione del fatto che $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ analogamente a ^{99m}Tc -Sestamibi è riconosciuto come substrato da trasportatori P-gP MDR.

In queste linee cellulari l'aggiunta della Ciclosporina A, modulatore ad ampio spettro, porta inaspettatamente ad una riduzione della percentuale di captazione di entrambi i traccianti (Grafici B4.9 e B4.10).

Gli effetti del BSO, sui profili di captazione dei due traccianti in cellule 2008 e C13* sono riportati in rispettivamente nei Grafici B4.9 e B4.10. Tale composto inibisce indirettamente l'attività MRP, attraverso la riduzione delle riserve di glutatione. In generale si osserva per i due agenti un iniziale rapido aumento della captazione cellulare. In questo caso, i valori di $\Delta 5$ (differenza fra la percentuale di uptake dopo trattamento con BSO rispetto alla percentuale di uptake in condizioni basali), valutati nei primi 30 minuti dall'inizio dell'incubazione sono in genere più alti per ^{99m}Tc -Sestamibi (2008 $\Delta 5= 10.72$; C13* $\Delta 5= 6.03$) rispetto a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ (2008 $\Delta 5= 4.44$; C13* $\Delta 5=3.75$).

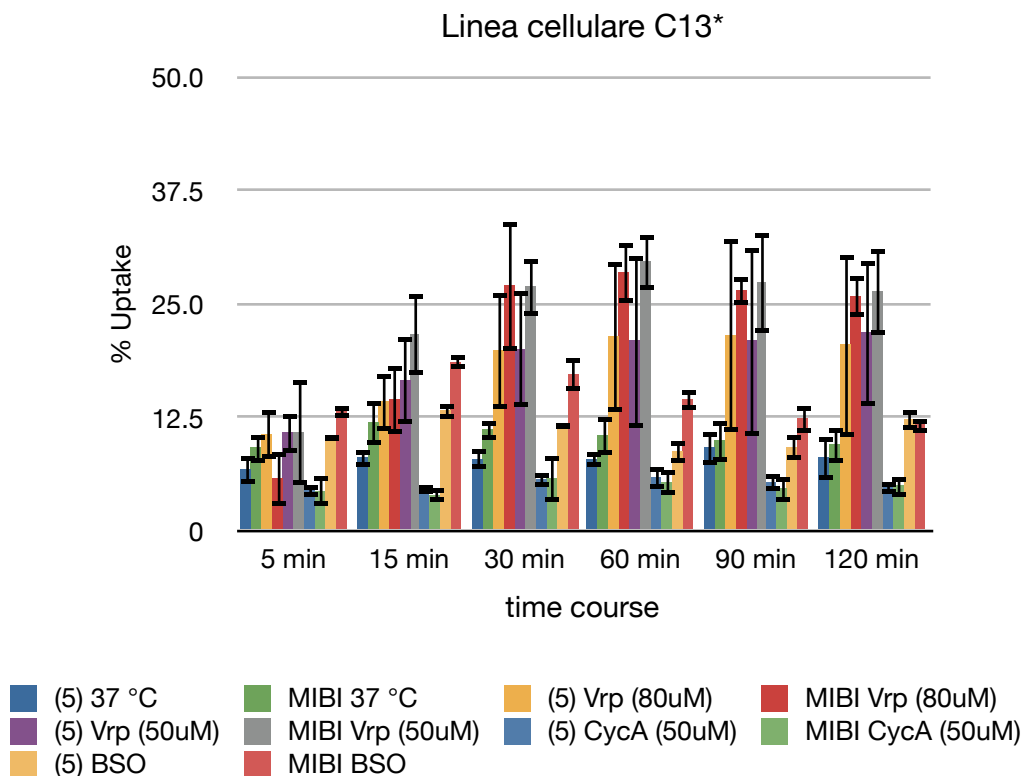


Grafico B4.10. Linea cellulare C13*, uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di Verapamil 80 μM , 50 μM , Ciclosporina A 50 μM e BSO.

Il profilo di uptake cellulare dei due traccianti, a seguito del trattamento con MK571 (50 μM) (Grafici B4.11 e B4.12), inibitore specifico di MPR1, è caratterizzato nei primi 30 minuti da una rapida ed elevata captazione cellulare che si mantiene per i successivi 90 minuti raggiungendo in entrambe le linee cellulari un valore circa 2.5 volte superiore rispetto al basale (2008) e circa 4 volte superiore rispetto al basale (C13*).

Linea cellulare 2008

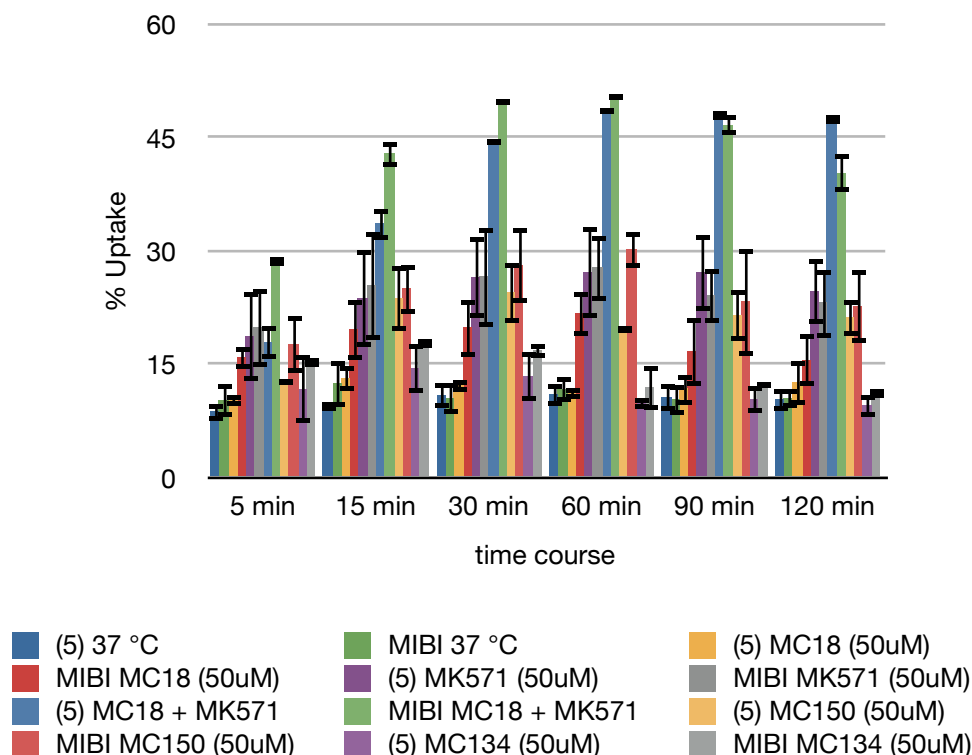


Grafico B4.11. Linea cellulare 2008: uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di MC18 50 μM , MK571 50 μM , MC18+MK571, MC150 50 μM e MC134 50 μM .

L'aggiunta di MC18 ad una concentrazione 50 μM (Grafici B4.11 e B4.12), porta ad una percentuale di uptake di poco superiore al basale per entrambi i traccianti nella linea cellulare C13*, raggiungendo valori di $\Delta 6$ (differenza tra la percentuale di uptake dopo aggiunta dell'inibitore rispetto alla percentuale di uptake in condizioni basali) di circa 1.5/2. Il $\Delta 6$, valutato a 90 minuti dall'inizio dell'incubazione, raggiunge valori negativi, mostrando un comportamento simile a quello riscontrato dopo trattamento con Ciclosporina A.

Nella linea cellulare 2008, l'aggiunta di questo inibitore (Grafici B4.9 e B4.10), che agisce selettivamente sulle P-gP MDR, porta ad una percentuale di uptake comparabile al basale per il $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, mentre con ^{99m}Tc -Sestamibi l'uptake aumenta di circa 2 volte.

L'aggiunta simultanea dei due inibitori (MK571 e MC18), sortisce una significativa modulazione della MDR: il $\Delta 8$ a 60 minuti nelle 2008 (Sinossi B4.1, raffronto B) risulta comparabile per entrambi i traccianti ($[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ $\Delta 8=37.53$; ^{99m}Tc -Sestamibi $\Delta 8=38.86$), mentre nelle C13* (Sinossi B4.1, raffronto B), il $\Delta 8$ per il $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ è nettamente superiore rispetto a quello di ^{99m}Tc -Sestamibi (a 60 minuti rispettivamente 43.49 contro 29.56).

Il maggiore effetto osservato nelle 2008 per azione di MC18 è dovuto all'espressione di proteine P-gP MDR. Questa azione è, infatti, pressoché trascurabile nelle C13* dove queste proteine sono assenti. In quest'ultima linea cellulare, caratterizzata da una elevata espressione di proteine MRP1 e MRP2, è significativo l'effetto inibitore di MK571.

Linea cellulare C13*

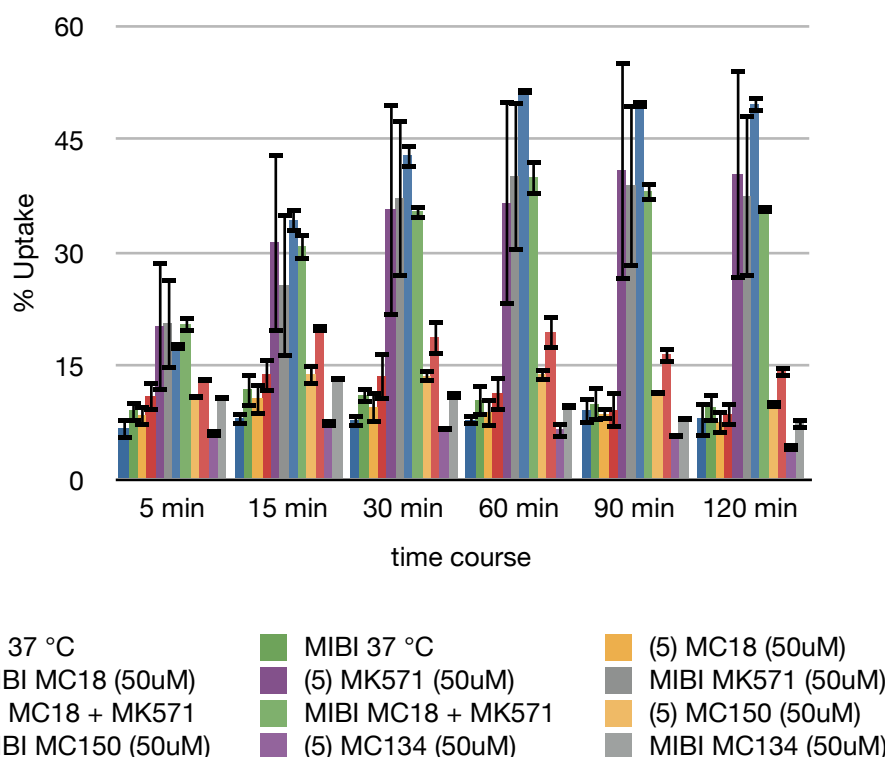


Grafico B4.12. Linea cellulare C13*: uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di MC18 50µM, MK571 50µM, MC18+MK571, MC150 50µM e MC134 50µM.

L'effetto dei due inibitori MC18 e MK571, utilizzati simultaneamente, è maggiore nelle 2008 rispetto alle C13*. Per entrambi i complessi l'effetto combinato dei due inibitori porta nelle 2008 ad un significativo incremento dell'attività accumulata.

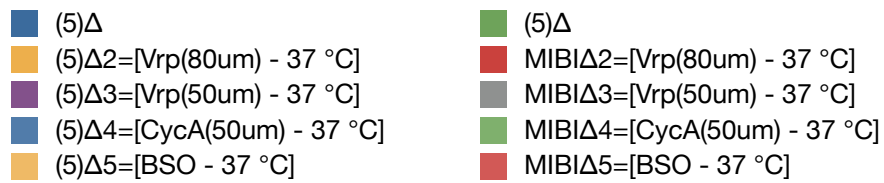
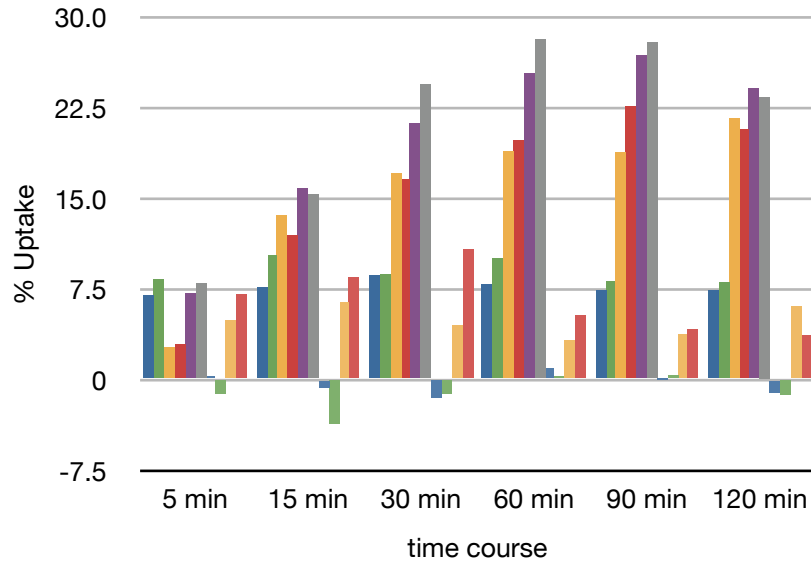
Questi risultati suggeriscono che $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ è riconosciuto come substrato non solo da P-gP MDR, ma anche da proteine MRP1 e MRP2. Inoltre, il riconoscimento dei due complessi da parte di queste ultime proteine sembra essere a favore di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$.

In entrambe le linee cellulari, l'impiego dei due nuovi inibitori: MC150, selettivo per MRPn, e MC134, attivo sulle P-gP MDR, ha permesso di apprezzare un profilo di uptake comparabile a quello ottenuto rispettivamente con MK571 e con MC18, di cui sono stetti analoghi (Sinossi B4.1, raffronto C e D), nonostante l'entità dell'effetto sia inferiore. In particolare con MC134 si ottengono valori di $\Delta 10$ negativi per entrambi i traccianti sia nelle C13* che nelle 2008, con un profilo comparabile a quello di MC18 e Ciclosporina A (Sinossi B4.2, raffronto C e D).

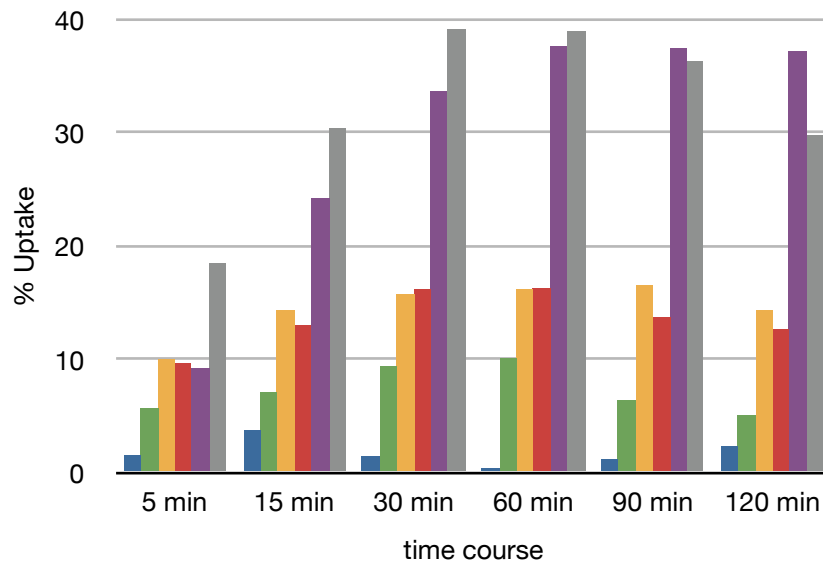
Nelle pagine seguenti, le Sinossi B4.1 (linea cellulare 2008) e B4.2 (linea cellulare C13*) riportano graficamente l'andamento dei Δ in funzione del tempo.

Ogni sinossi è seguita da una Tabella in cui per ciascun tempo sono riportate le cinetiche di accumulo di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, BSO, MK-571, MC18, MC150, MC134).

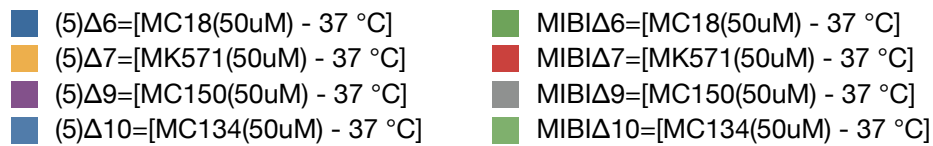
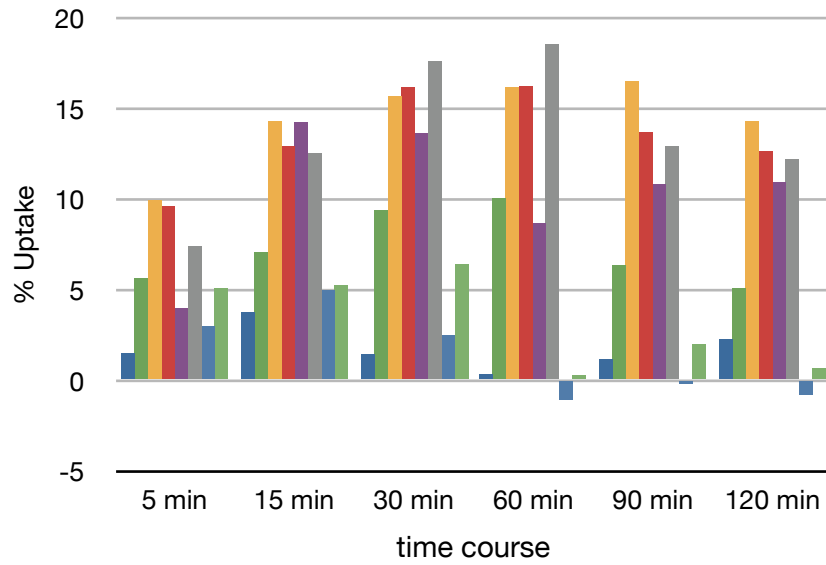
Linea cellulare 2008: raffronto A



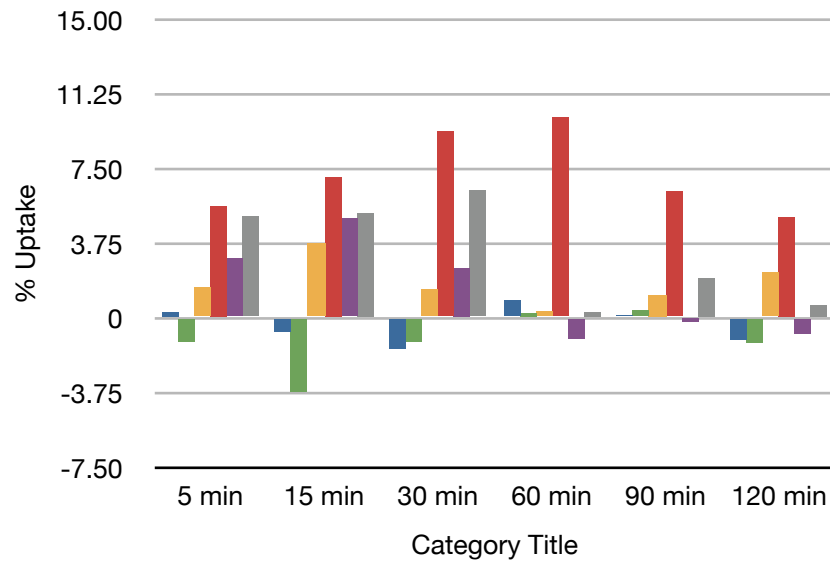
Linea cellulare 2008: raffronto B



Linea cellulare 2008: raffronto C



Linea cellulare 2008: raffronto D

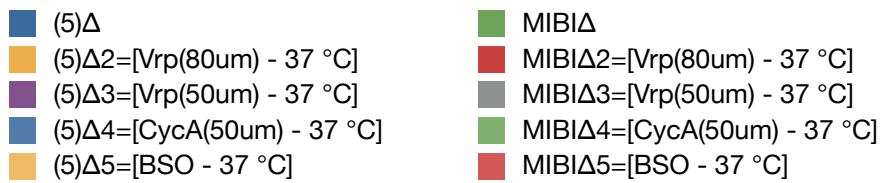
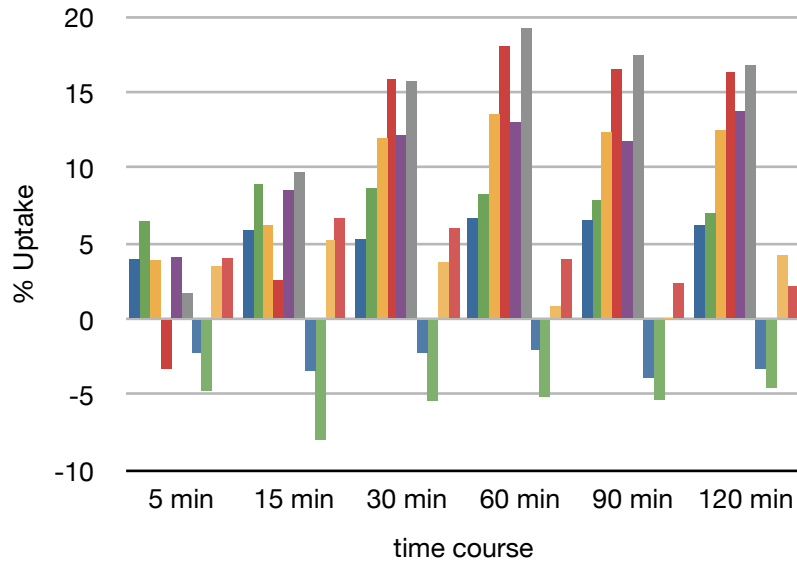


Sinossi B4.1. Linea cellulare 2008: raffronti A, B, C, D.

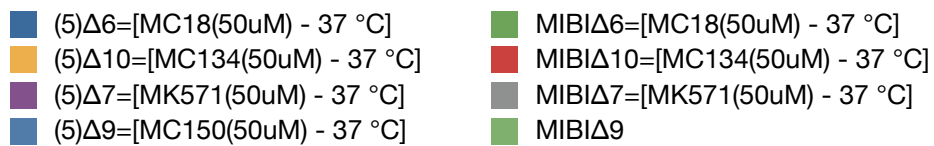
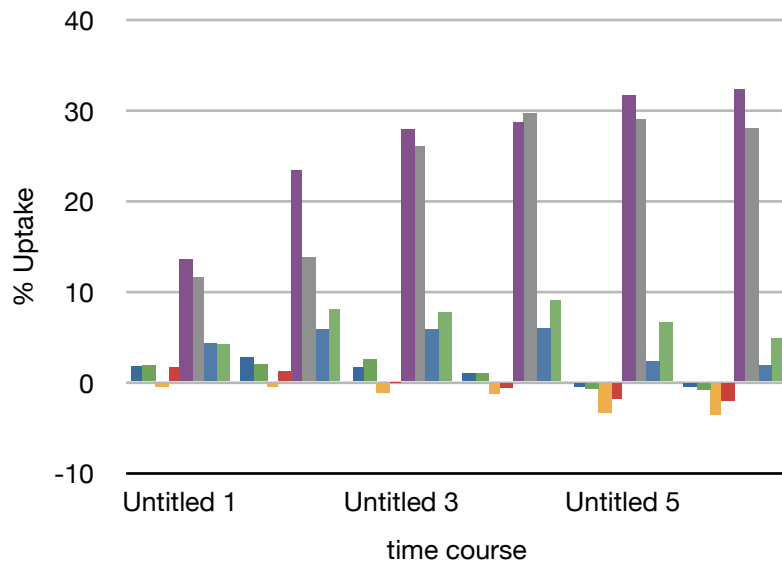
2008	time course	(5) 37 °C		(5) Vrp (80uM)		(5) Vrp (50uM)		(5) CycA (50uM)		(5) BSO	
		media ± DS	(5)Δ	media ± DS	(5)Δ2	media ± DS	(5)Δ3	media ± DS	(5)Δ4	media ± DS	(5)Δ5
	5 min	8.71 ± 1.21	6.93	11.31 ± 0.61	2.6	15.80 ± 2.89	7.09	8.98 ± 0.76	0.27	13.54 ± 0.60	4.83
	15 min	9.42 ± 0.67	7.62	22.97 ± 1.48	13.55	25.24 ± 3.08	15.82	8.74 ± 0.28	-0.68	15.78 ± 0.79	6.36
	30 min	10.81 ± 1.63	8.6	27.85 ± 0.98	17.04	32.00 ± 4.05	21.19	9.25 ± 0.46	-1.56	15.25 ± 0.92	4.44
	60 min	10.93 ± 1.46	7.81	29.77 ± 1.50	18.84	36.23 ± 3.06	25.3	11.79 ± 0.86	0.86	14.18 ± 0.31	3.25
	90 min	10.58 ± 1.80	7.31	29.31 ± 1.50	18.73	37.33 ± 2.99	26.75	10.68 ± 1.11	0.1	14.30 ± 1.00	3.72
	120 min	10.29 ± 1.54	7.34	31.87 ± 2.62	21.58	34.33 ± 2.18	24.04	9.21 ± 0.69	-1.08	16.35 ± 1.03	6.06
2008	time course	(5) MC18 (50uM)		(5) MK571 (50uM)		(5) MC18 + MK571		(5) MC150 (50uM)		(5) MC134 (50uM)	
		media ± DS	(5)Δ6	media ± DS	(5)Δ7	media ± DS	(5)Δ8	media ± DS	(5)Δ9	media ± DS	(5)Δ10
	5 min	10.21 ± 0.79	1.5	18.62 ± 5.90	9.91	17.87 ± 2.21	9.16	12.67 ± 0.41	3.96	11.68 ± 4.46	2.97
	15 min	13.14 ± 1.66	3.72	23.68 ± 6.47	14.26	33.57 ± 2.10	24.15	23.64 ± 4.28	14.22	14.39 ± 3.23	4.97
	30 min	12.23 ± 0.87	1.42	26.46 ± 5.38	15.65	44.41 ± 0.28	33.6	24.43 ± 3.92	13.62	13.29 ± 3.22	2.48
	60 min	11.23 ± 0.86	0.3	27.10 ± 6.04	16.17	48.46 ± 0.17	37.53	19.60 ± 0.44	8.67	9.86 ± 0.84	-1.07
	90 min	11.72 ± 2.10	1.14	27.07 ± 4.97	16.49	47.99 ± 0.63	37.41	21.39 ± 3.38	10.81	10.36 ± 1.87	-0.22
	120 min	12.55 ± 2.90	2.26	24.58 ± 4.26	14.29	47.41 ± 0.65	37.12	21.19 ± 2.46	10.9	9.48 ± 1.53	-0.81
2008	time course	MIBI 37 °C		MIBI Vrp (80uM)		MIBI Vrp (50uM)		MIBI CycA (50uM)		MIBI BSO	
		media ± DS	MIBIΔ	media ± DS	MIBIΔ2	media ± DS	MIBIΔ3	media ± DS	MIBIΔ4	media ± DS	MIBIΔ5
	5 min	10.20 ± 2.25	8.28	13.09 ± 0.48	2.89	18.12 ± 0.49	7.92	8.98 ± 0.76	-1.22	17.19 ± 1.19	6.99
	15 min	12.45 ± 3.15	10.28	24.37 ± 0.81	11.92	27.71 ± 0.45	15.26	8.74 ± 0.28	-3.71	20.84 ± 1.19	8.39
	30 min	10.44 ± 2.01	8.64	26.94 ± 1.21	16.5	34.86 ± 0.73	24.42	9.25 ± 0.46	-1.19	21.16 ± 1.01	10.72
	60 min	11.57 ± 1.59	10.01	31.34 ± 0.88	19.77	39.65 ± 2.29	28.08	11.79 ± 0.86	0.22	16.89 ± 0.90	5.32
	90 min	10.33 ± 2.08	8.11	32.87 ± 1.02	22.54	38.17 ± 2.43	27.84	10.68 ± 1.11	0.35	14.47 ± 0.70	4.14
	120 min	10.48 ± 1.32	8.03	31.15 ± 0.77	20.67	33.83 ± 1.68	23.35	9.21 ± 0.69	-1.27	14.08 ± 1.93	3.6
2008	time course	MIBI MC18 (50uM)		MIBI MK571 (50uM)		MIBI MC18 + MK571		MIBI MC150 (50uM)		MIBI MC134 (50uM)	
		media ± DS	MIBIΔ6	media ± DS	MIBIΔ7	media ± DS	MIBIΔ8	media ± DS	MIBIΔ9	media ± DS	MIBIΔ10
	5 min	15.80 ± 1.49	5.6	19.76 ± 5.19	9.56	28.60 ± 0.59	18.4	17.56 ± 3.71	7.36	15.27 ± 0.65	5.07
	15 min	19.52 ± 3.92	7.07	25.36 ± 7.18	12.91	42.82 ± 1.68	30.37	24.95 ± 3.30	12.5	17.70 ± 0.60	5.25
	30 min	19.78 ± 3.85	9.34	26.57 ± 6.69	16.13	49.53 ± 0.08	39.09	28.02 ± 4.98	17.58	16.82 ± 1.03	6.38
	60 min	21.62 ± 2.91	10.05	27.75 ± 4.33	16.18	50.43 ± 0.32	38.86	30.10 ± 2.31	18.53	11.86 ± 2.94	0.29
	90 min	16.66 ± 4.55	6.33	24.02 ± 3.56	13.69	46.59 ± 1.25	36.26	23.24 ± 7.19	12.91	12.33 ± 0.50	2
	120 min	15.52 ± 3.36	5.04	23.07 ± 4.57	12.59	40.21 ± 2.48	29.73	22.63 ± 4.84	12.15	11.11 ± 0.61	0.63

Tabella B4.7. Linea cellulare 2008: cinetiche di accumulo di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, BSO, MK-571, MC18, MC150, MC134).

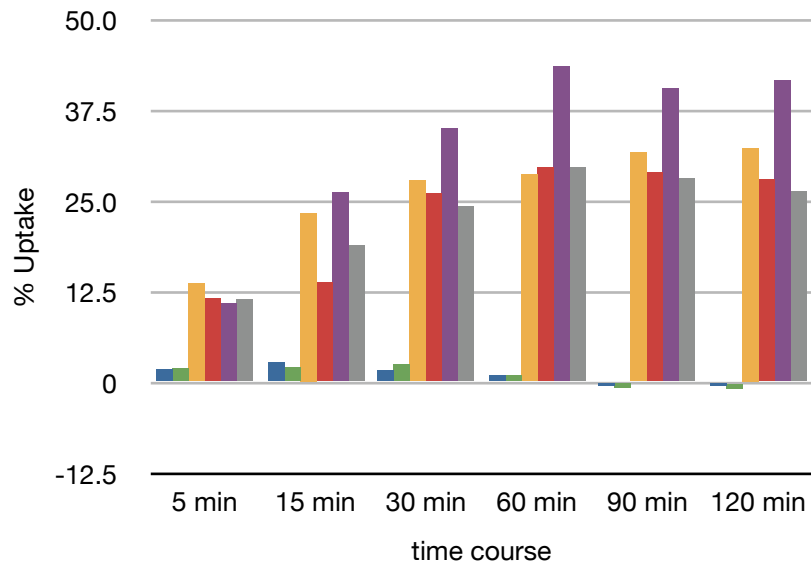
Linea cellulare C13*: raffronto A



Linea cellulare C13*: raffronto B

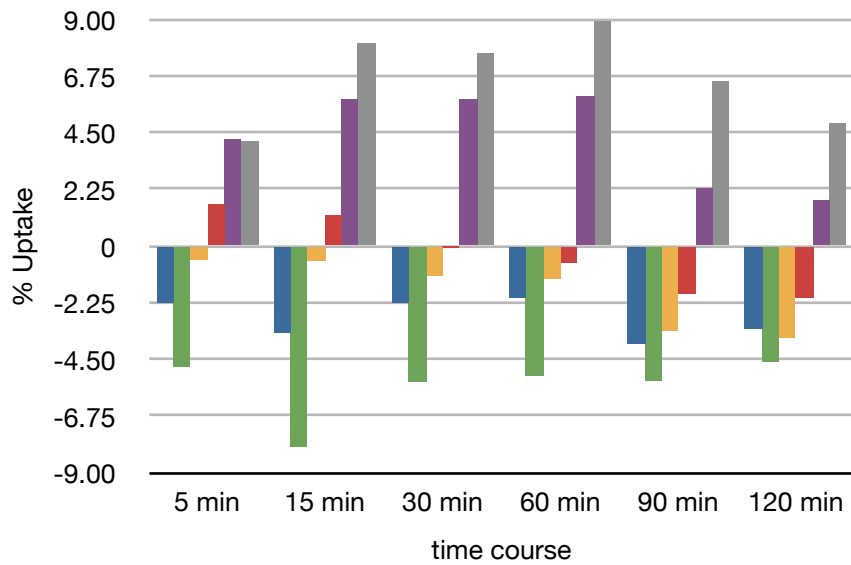


Linea cellulare C13*: raffronto C



- (5)Δ6=[MC18(50uM) - 37 °C]
- (5)Δ7=[MK571(50uM) - 37 °C]
- (5)Δ8=[MC18+MK571 - 37 °C]
- MIBIΔ6=[MC18(50uM) - 37 °C]
- MIBIΔ7=[MK571(50uM) - 37 °C]
- MIBIΔ8=[MC18+MK571 - 37 °C]

Linea cellulare C13*: raffronto D



- (5)Δ4=[CycA(50um) - 37 °C]
- (5)Δ10=[MC134(50uM) - 37 °C]
- (5)Δ9=[MC150(50uM) - 37 °C]
- MIBIΔ4=[CycA(50um) - 37 °C]
- MIBIΔ10=[MC134(50uM) - 37 °C]
- MIBIΔ9=[MC150(50uM) - 37 °C]

Sinossi B4.2. Linea cellulare C13*: raffronti A, B, C, D.

C13*	time course	(5) 37 °C		(5) Vrp (80uM)		(5) Vrp (50uM)		(5) CycA (50uM)		(5) BSO	
		media ± DS	(5)Δ	media ± DS	(5)Δ2	media ± DS	(5)Δ3	media ± DS	(5)Δ4	media ± DS	(5)Δ5
	5 min	6.68 ± 1.49	3.96	10.57 ± 2.71	3.89	10.74 ± 2.13	4.06	4.43 ± 0.68	-2.25	10.18 ± 0.33	3.5
	15 min	8.03 ± 0.95	5.85	14.26 ± 3.23	6.23	16.54 ± 4.75	8.51	4.57 ± 0.54	-3.46	13.22 ± 0.88	5.19
	30 min	7.84 ± 1.03	5.28	19.80 ± 6.37	11.96	19.99 ± 6.35	12.15	5.60 ± 0.83	-2.24	11.59 ± 0.39	3.75
	60 min	7.85 ± 0.78	6.68	21.41 ± 8.33	13.56	20.88 ± 9.52	13.03	5.80 ± 1.20	-2.05	8.72 ± 1.27	0.87
	90 min	9.14 ± 1.90	6.54	21.49 ± 10.6	12.35	20.89 ± 10.4	11.75	5.27 ± 0.94	-3.87	9.17 ± 1.35	0.03
	120 min	8.01 ± 2.45	6.22	20.47 ± 10.1	12.46	21.79 ± 8.08	13.78	4.72 ± 0.63	-3.29	12.24 ± 1.14	4.23
C13*	time course	(5) MC18 (50uM)		(5) MK571 (50uM)		(5) MC18 + MK571		(5) MC150 (50uM)		(5) MC134 (50uM)	
		media ± DS	(5)Δ6	media ± DS	(5)Δ7	media ± DS	(5)Δ8	media ± DS	(5)Δ9	media ± DS	(5)Δ10
	5 min	8.40 ± 1.51	1.72	20.24 ± 8.71	13.56	17.51 ± 0.55	10.83	10.92 ± 0.24	4.24	6.13 ± 0.65	-0.55
	15 min	10.74 ± 2.29	2.71	31.37 ± 12	23.34	34.26 ± 1.62	26.23	13.86 ± 1.51	5.83	7.45 ± 0.65	-0.58
	30 min	9.46 ± 2.12	1.62	35.72 ± 14.3	27.88	42.89 ± 1.74	35.05	13.66 ± 0.94	5.82	6.67 ± 0.41	-1.17
	60 min	8.82 ± 2.04	0.97	36.50 ± 13.6	28.65	51.34 ± 0.42	43.49	13.81 ± 0.91	5.96	6.55 ± 1.16	-1.3
	90 min	8.60 ± 0.89	-0.54	40.81 ± 14.5	31.67	49.70 ± 0.70	40.56	11.45 ± 0.46	2.31	5.79 ± 0.46	-3.35
	120 min	7.47 ± 1.62	-0.54	40.31 ± 14	32.3	49.58 ± 1.07	41.57	9.83 ± 0.54	1.82	4.36 ± 0.66	-3.65
C13*	time course	MIBI 37 °C		MIBI Vrp (80uM)		MIBI Vrp (50uM)		MIBI CycA (50uM)		MIBI BSO	
		media ± DS	MIBIΔ	media ± DS	MIBIΔ2	media ± DS	MIBIΔ3	media ± DS	MIBIΔ4	media ± DS	MIBIΔ5
	5 min	9.08 ± 1.58	6.5	5.77 ± 3.08	-3.31	10.78 ± 5.78	1.7	4.30 ± 1.62	-4.78	13.13 ± 0.69	4.05
	15 min	11.86 ± 2.42	8.9	14.45 ± 3.80	2.59	21.60 ± 4.48	9.74	3.88 ± 0.75	-7.98	18.56 ± 0.78	6.7
	30 min	11.12 ± 1.15	8.66	26.96 ± 7.14	15.84	26.86 ± 3.14	15.74	5.71 ± 2.53	-5.41	17.15 ± 1.77	6.03
	60 min	10.42 ± 2.12	8.26	28.48 ± 3.33	18.06	29.63 ± 3.04	19.21	5.27 ± 1.36	-5.15	14.40 ± 1.07	3.98
	90 min	9.92 ± 2.32	7.86	26.46 ± 1.57	16.54	27.38 ± 5.57	17.46	4.58 ± 1.41	-5.34	12.30 ± 1.57	2.38
	120 min	9.47 ± 2.05	7.03	25.83 ± 2.21	16.36	26.29 ± 4.75	16.82	4.89 ± 1.16	-4.58	11.62 ± 0.83	2.15
C13*	time course	MIBI MC18 (50uM)		MIBI MK571 (50uM)		MIBI MC18 + MK571		MIBI MC150 (50uM)		MIBI MC134 (50uM)	
		media ± DS	MIBIΔ6	media ± DS	MIBIΔ7	media ± DS	MIBIΔ8	media ± DS	MIBIΔ9	media ± DS	MIBIΔ10
	5 min	10.95 ± 1.99	1.87	20.63 ± 6.13	11.55	20.51 ± 1.07	11.43	13.26 ± 0.52	4.18	10.75 ± 0.42	1.67
	15 min	13.86 ± 2.47	2	25.62 ± 9.55	13.76	30.78 ± 1.83	18.92	19.91 ± 0.58	8.05	13.07 ± 0.01	1.21
	30 min	13.64 ± 3.26	2.52	37.12 ± 10.4	26	35.38 ± 1.01	24.26	18.78 ± 2.44	7.66	11.07 ± 0.54	-0.05
	60 min	11.36 ± 2.42	0.94	40.09 ± 9.94	29.67	39.98 ± 2.46	29.56	19.41 ± 2.31	8.99	9.74 ± 0.32	-0.68
	90 min	9.15 ± 2.48	-0.77	38.85 ± 10.8	28.93	38.03 ± 1.29	28.11	16.47 ± 1.13	6.55	8.02 ± 0.23	-1.9
	120 min	8.63 ± 1.63	-0.84	37.44 ± 10.8	27.97	35.77 ± 0.65	26.3	14.35 ± 0.86	4.88	7.40 ± 0.80	-2.07

Tabella B4.8. Linea cellulare C13*: cinetiche di accumulo di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, BSO, MK-571, MC18, MC150, MC134).

Nei Grafici B4.13 e B4.14 sono riportati gli effetti dei diversi modulatori/inibitori in cellule del tipo MCF7/MDR, esprimenti proteine trasportatrici P-gP MDR e MRP1.

Gli effetti del Verapamil, utilizzato ad una concentrazione di 80 μM e 50 μM , sono riportati nel Grafico B4.13 Per entrambi i composti si osserva un aumento percentuale della captazione. Ad ogni modo, rispetto alla quota basale, le percentuali di uptake sono superiori di circa 4.8 volte per $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$ e di circa 3.3 volte per il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi. Analogamente a quanto osservato in precedenza per cellule 2008 e C13*, non si è evidenziata una significativa differenza nella risposta cellulare alle due diverse concentrazioni.

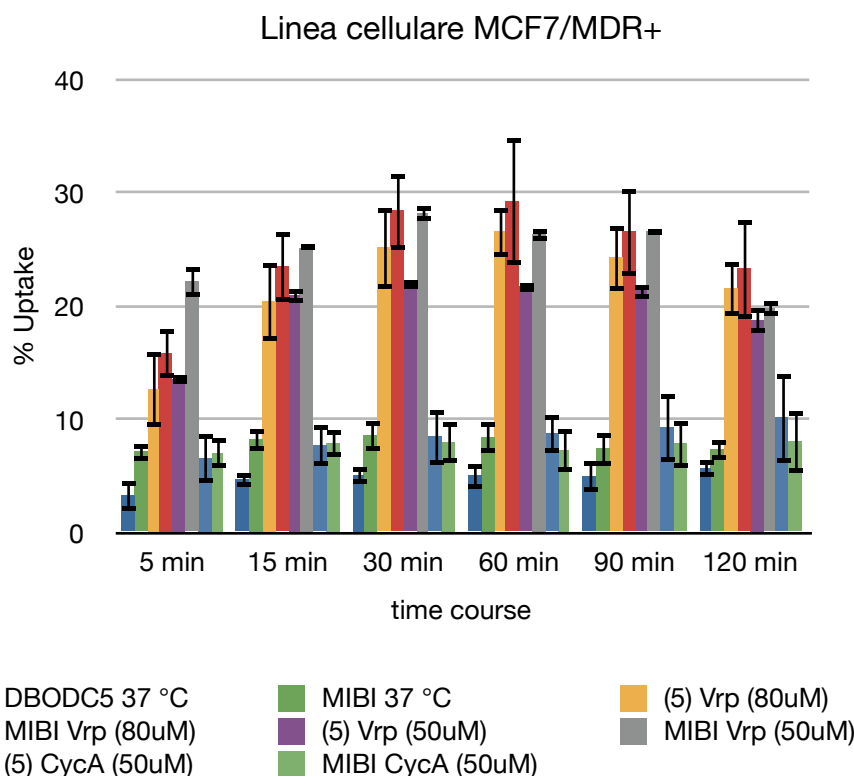


Grafico B4.13. Linea cellulare MCF7/MDR+, uptake di $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$ e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di Verapamil 80 μM , 50 μM e Ciclosporina A 50 μM .

In queste linea cellulare l'aggiunta della Ciclosporina A permette di osservare un incremento nella percentuale di captazione per $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$, mentre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi presenta lo stesso comportamento osservato nelle cellule 2008 (Grafico B4.13, cfr. Grafico B4.9).

A seguito del trattamento con MK571 (50 μM) (Grafico B4.14), il profilo di uptake cellulare dei due traccianti è comparabile nei primi 15 min. A tempi superiori la percentuale di captazione cellulare risulta favorevole per il $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$.

L'aggiunta di MC18 ad una concentrazione 50 μM (Grafico B4.14 e Sinossi B4.3), porta ad una variazione della percentuale di uptake di poco superiore alla quota basale per entrambi i traccianti: il $\Delta 6$ per il $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})^+$ raggiunge il valore massimo di 5.33, mentre per $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi è 3.52.

L'aggiunta simultanea dei due inibitori (MK571 e MC18), mostra una significativa modulazione della MDR con un profilo sovrapponibile a quello osservato in seguito a trattamento con MK571.

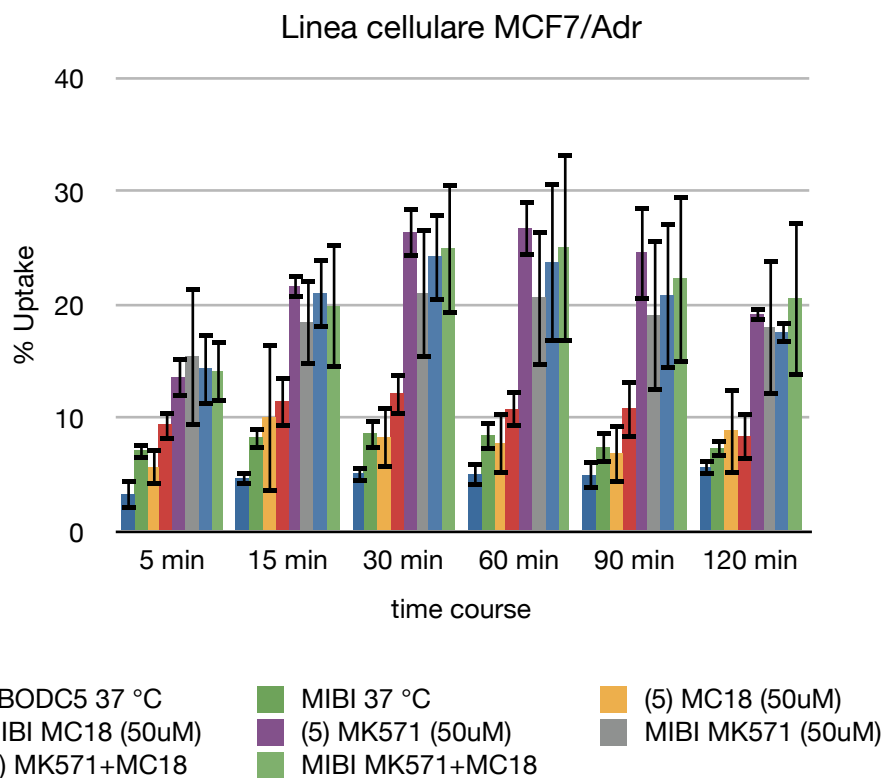


Grafico B4.14. Linea cellulare MCF7/MDR+: uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di MC18 50 μM , MK571 50 μM , MC18+MK571.

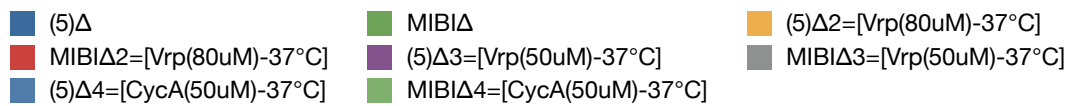
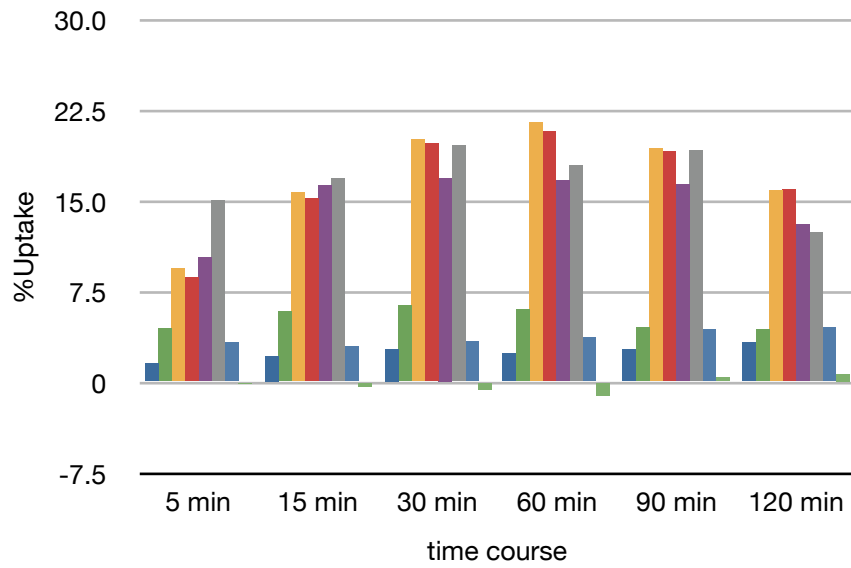
MCF7/ MDR+	time course	DBODC5 37 °C			(5) Vrp (80uM)			(5) Vrp (50uM)			(5) CycA (50uM)		
		media \pm DS	(5) Δ		media \pm DS	(5) Δ 2		media \pm DS	(5) Δ 3		media \pm DS	(5) Δ 4	
	5 min	3.25 \pm 1.32	1.55		12.66 \pm 3.34	9.41		13.5 \pm 0.37	10.29		6.57 \pm 2.19	3.32	
	15 min	4.69 \pm 0.65	2.18		20.41 \pm 3.47	15.72		20.9 \pm 0.69	16.25		7.67 \pm 1.80	2.98	
	30 min	5.06 \pm 0.77	2.76		25.14 \pm 3.61	20.08		22 \pm 0.44	16.9		8.46 \pm 2.44	3.4	
	60 min	5.01 \pm 1.09	2.37		26.53 \pm 2.20	21.52		21.7 \pm 0.44	16.69		8.75 \pm 1.71	3.74	
	90 min	4.94 \pm 1.31	2.68		24.27 \pm 2.91	19.33		21.3 \pm 0.70	16.4		9.29 \pm 2.99	4.35	
	120 min	5.64 \pm 0.71	3.28		21.54 \pm 2.44	15.9		18.7 \pm 1.06	13.09		10.2 \pm 3.97	4.52	
MCF7/ MDR+	time course	(5) MC18 (50uM)			(5) MK571 (50uM)			(5) MK571+MC18					
		media \pm DS	(5) Δ 6		media \pm DS	(5) Δ 7		media \pm DS	(5) Δ 8		media \pm DS	Δ	
	5 min	5.67 \pm 1.66	2.42		13.59 \pm 1.80	10.34		14.3 \pm 3.29	11.09		\pm		
	15 min	10.02 \pm 6.61	5.33		21.59 \pm 1.08	16.9		21 \pm 3.13	16.32		\pm		
	30 min	8.29 \pm 2.73	3.23		26.37 \pm 2.27	21.31		24.2 \pm 3.99	19.14		\pm		
	60 min	7.75 \pm 2.72	2.74		26.73 \pm 2.53	21.72		23.7 \pm 7.09	18.73		\pm		
	90 min	6.88 \pm 2.67	1.94		24.57 \pm 4.22	19.63		20.8 \pm 6.48	15.83		\pm		
	120 min	8.89 \pm 3.88	3.25		19.13 \pm 0.63	13.49		17.6 \pm 1.00	11.94		\pm		

MCF7/ MDR+	time course	MIBI 37 °C			MIBI Vrp (80uM)			MIBI Vrp (50uM)			MIBI CycA (50uM)		
		media ± DS	MIBIΔ		media ± DS	MIBIΔ2		media ± DS	MIBIΔ3		media ± DS	MIBIΔ4	
	5 min	7.14 ± 0.81	4.47		15.84 ± 2.21	8.7		22.2 ± 1.38	15.02		7.02 ± 1.30	-0.12	
	15 min	8.26 ± 1.05	5.83		23.46 ± 3.08	15.2		25.1 ± 0.03	16.83		7.89 ± 1.22	-0.37	
	30 min	8.60 ± 1.37	6.33		28.38 ± 3.39	19.78		28.2 ± 0.63	19.57		7.99 ± 1.85	-0.61	
	60 min	8.43 ± 1.34	6.06		29.21 ± 5.53	20.78		26.3 ± 0.58	17.9		7.28 ± 1.94	-1.15	
	90 min	7.41 ± 1.49	4.51		26.53 ± 3.82	19.12		26.6 ± 0.30	19.14		7.85 ± 2.09	0.44	
	120 min	7.34 ± 0.87	4.34		23.28 ± 4.44	15.94		19.8 ± 0.60	12.42		8.03 ± 2.77	0.69	
MCF7/ MDR+	time course	MIBI MC18 (50uM)			MIBI MK571 (50uM)			MIBI MK571+MC18					
		media ± DS	MIBIΔ6		media ± DS	MIBIΔ7		media ± DS	MIBIΔ8		media ± DS	Δ	
	5 min	9.39 ± 1.39	2.25		15.38 ± 6.13	8.24		14.1 ± 2.78	7		±		
	15 min	11.45 ± 2.31	3.19		18.41 ± 3.78	10.15		19.9 ± 5.56	11.61		±		
	30 min	12.12 ± 1.95	3.52		20.98 ± 5.80	12.38		24.9 ± 5.83	16.33		±		
	60 min	10.77 ± 1.66	2.34		20.60 ± 6.10	12.17		25 ± 8.41	16.61		±		
	90 min	10.81 ± 2.68	3.4		19.00 ± 6.73	11.59		22.3 ± 7.46	14.85		±		
	120 min	8.37 ± 2.18	1.03		17.97 ± 6.01	10.63		20.5 ± 6.89	13.18		±		

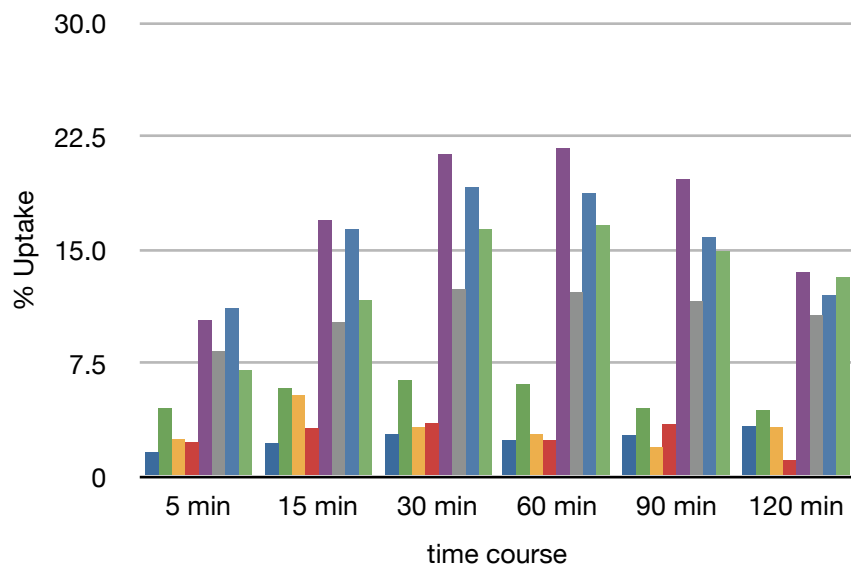
Tabella B4.9. Linea cellulare MCF7/MDR+: cinetiche di accumulo di [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, MK-571, MC18).

La sinossi grafica Sinossi B4.3: raffronto A e B, riporta l'andamento dei Δ in funzione del tempo per i due traccianti in esame in cellule del tipo MCF7/MDR+.

Linea cellulare MCF7/MDR+: raffronto A



Linea cellulare MCF7/MDR+: raffronto B



Sinossi B4.3. Linea cellulare MCF7/MDR+: raffronti A, B.

Nei Grafici B4.15 e B4.16 sono riportati gli effetti dei diversi modulatori/inibitori in cellule del tipo A2780/Adr, esprimenti proteine trasportatrici MRP2 e MRP1.

Il trattamento con Verapamil, utilizzato ad una concentrazione di 50 μM , determina un notevole aumento della percentuale di captazione cellulare dei due prodotti, con un effetto decisamente più evidente per $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi rispetto che $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ (Grafico B4.15). L'aggiunta della CsA, porta ad un incremento della percentuale di captazione per $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, mentre la percentuale di captazione di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi resta inalterata, a 60 minuti il suo valore di $\Delta 4$ raggiunge valori negativi. (Grafico B4.15 e Sinossi B4.4).

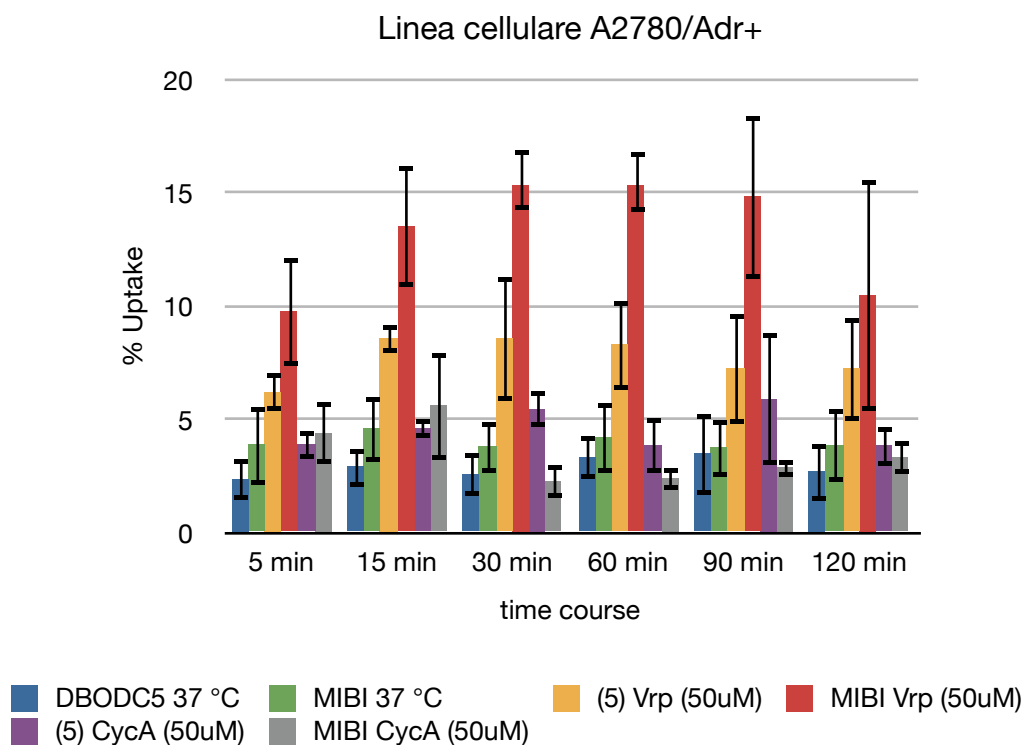


Grafico B4.15. Grafico B4.13. Linea cellulare A2780/Adr+, uptake di $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di Verapamil 50 μM e Ciclosporina A 50 μM .

L'aggiunta di MC18 ad una concentrazione 50 μM (Grafico B4.16 e Sinossi B4.4), permette di osservare una variazione nella percentuale di uptake di poco superiore rispetto alla quota basale per $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$, mentre il valore di $\Delta 6$ di $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi raggiunge il massimo di 3.2.

A seguito del trattamento con MK571 (50 μM) (Grafico B4.16 e Sinossi B4.4), il profilo di uptake cellulare dei due traccianti, è comparabile raggiungendo a 30 minuti il valore massimo di $\Delta 7$ di 9.12 per $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e 5.12 per $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi.

L'effetto preponderante si osserva a seguito dell'aggiunta simultanea degli inibitori MK571 e MC18. In questo caso si osserva per il $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ un più elevato aumento della captazione cellulare con un valore di $\Delta 8$ pari a circa 11; per il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi tale valore raggiunge un massimo di 10.86.

Le cinetiche di captazione dei due traccianti a seguito dell'aggiunta di MC150 e MC134 sono confrontabili tra loro e comparabili a quelle osservate a seguito di trattamento con MK571 e MC18 di cui sono analoghi.

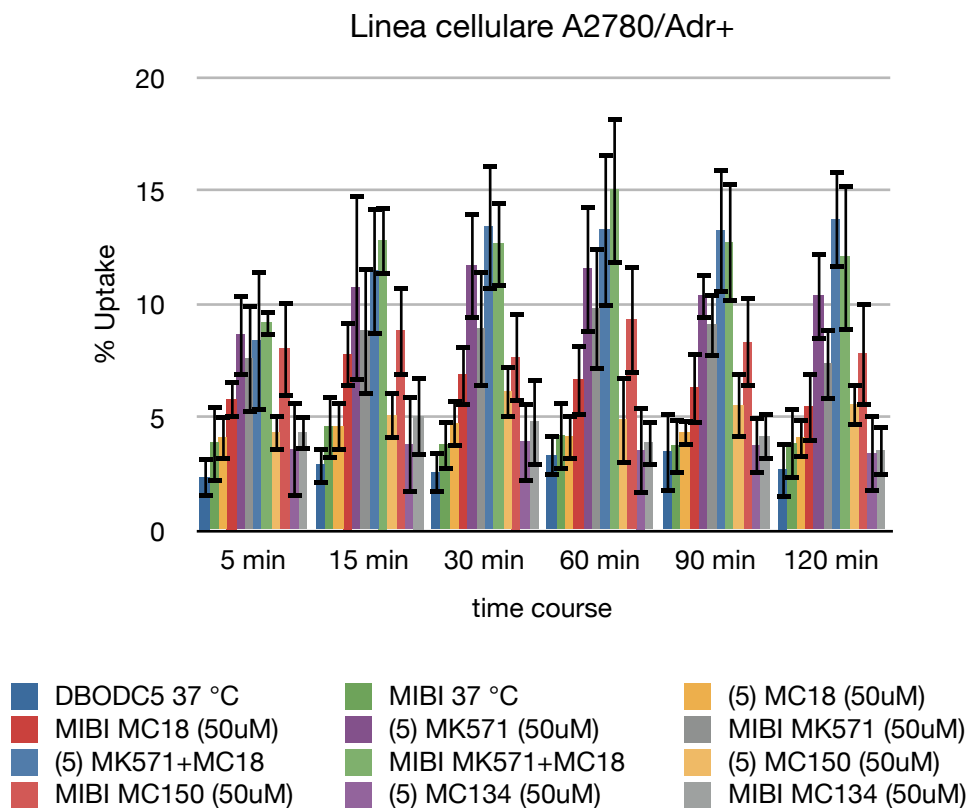


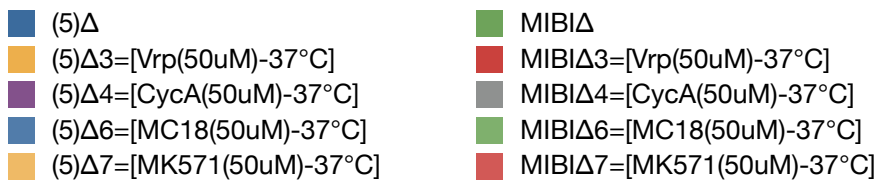
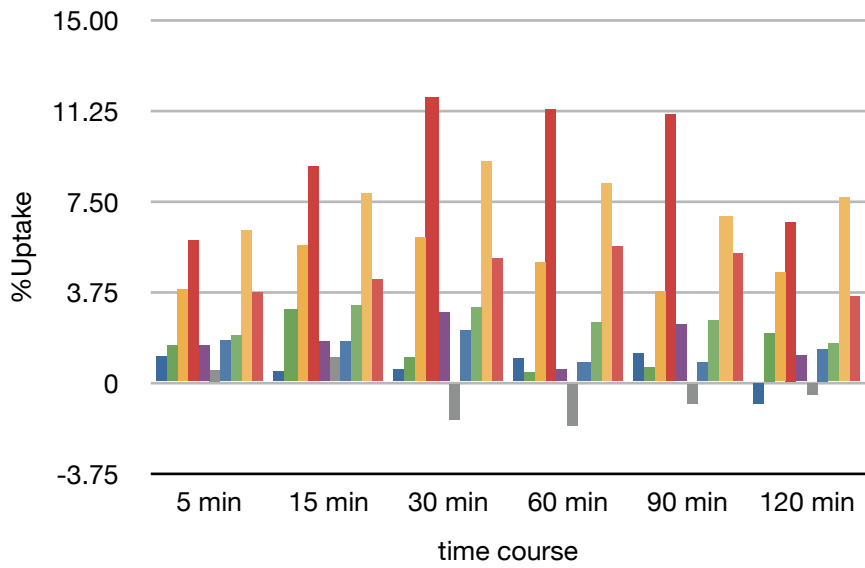
Grafico B4.16. Linea cellulare A2780/Adr: uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di MC18 50 μM , MK571 50 μM , MC18+MK571, MC150 50 50 μM e MC134 50 50 μM .

A2780/Adr	time course	DBODC5 37 °C			(5) Vrp (50uM)			(5) CycA (50uM)			media ± DS	(5)Δ				
		media ± DS	(5)Δ		media ± DS	(5)Δ3		media ± DS	(5)Δ4							
	5 min	2.36 ± 0.89	1.07		6.19 ± 0.83	3.83		3.87 ± 0.60	1.51							
	15 min	2.91 ± 0.88	0.46		8.58 ± 0.62	5.67		4.60 ± 0.43	1.69							
	30 min	2.57 ± 0.95	0.55		8.56 ± 2.74	5.99		5.45 ± 0.78	2.88							
	60 min	3.31 ± 0.95	0.97		8.28 ± 1.96	4.97		3.84 ± 1.18	0.53							
	90 min	3.48 ± 1.81	1.2		7.23 ± 2.42	3.75		5.89 ± 2.89	2.41							
	120 min	2.71 ± 1.29	-0.89		7.24 ± 2.29	4.53		3.83 ± 0.86	1.12							
A2780/Adr	time course	(5) MC18 (50uM)			(5) MK571 (50uM)			(5) MK571+MC18			(5) MC150 (50uM)			(5) MC134 (50uM)		
	5 min	4.09 ± 1.01	1.73		8.63 ± 1.85	6.27		8.37 ± 3.13	6.01		4.31 ± 0.85	1.95		3.58 ± 2.12	1.22	
	15 min	4.60 ± 1.14	1.69		10.72 ± 4.13	7.81		11.45 ± 2.86	8.54		5.06 ± 1.07	2.15		3.79 ± 2.18	0.88	
	30 min	4.71 ± 1.07	2.14		11.69 ± 2.37	9.12		13.39 ± 2.80	10.82		6.14 ± 1.21	3.57		3.91 ± 1.81	1.34	
	60 min	4.14 ± 1.04	0.83		11.54 ± 2.86	8.23		13.26 ± 3.44	9.95		4.88 ± 1.98	1.57		3.55 ± 1.96	0.24	
	90 min	4.32 ± 0.62	0.84		10.35 ± 1.03	6.87		13.24 ± 2.80	9.76		5.52 ± 1.48	2.04		3.75 ± 1.30	0.27	
	120 min	4.09 ± 0.92	1.38		10.35 ± 1.97	7.64		13.72 ± 2.18	11.01		5.54 ± 0.95	2.83		3.40 ± 1.72	0.69	
A2780/Adr	time course	MIBI 37 °C			MIBI Vrp (50uM)			MIBI CycA (50uM)			media ± DS	MIBIΔ				
	5 min	3.88 ± 1.76	1.53		9.76 ± 2.40	5.88		4.39 ± 1.36	0.51							
	15 min	4.59 ± 1.47	3		13.50 ± 2.66	8.91		5.60 ± 2.39	1.01							
	30 min	3.78 ± 1.15	1.04		15.54 ± 1.30	11.76		2.24 ± 0.71	-1.54							
	60 min	4.18 ± 1.54	0.4		15.47 ± 1.30	11.29		2.40 ± 0.51	-1.78							
	90 min	3.76 ± 1.28	0.63		14.83 ± 3.64	11.07		2.89 ± 0.40	-0.87							
	120 min	3.84 ± 1.61	2.04		10.47 ± 5.07	6.63		3.31 ± 0.73	-0.53							
A2780/Adr	time course	MIBI MC18 (50uM)			MIBI MK571 (50uM)			MIBI MK571+MC18			MIBI MC150 (50uM)			MIBI MC134 (50uM)		
	5 min	5.80 ± 0.85	1.92		7.60 ± 2.46	3.72		9.18 ± 0.64	5.3		8.01 ± 2.15	4.13		4.31 ± 0.77	0.43	
	15 min	7.78 ± 1.49	3.19		8.83 ± 2.87	4.24		12.81 ± 1.58	8.22		8.83 ± 2.05	4.24		5.05 ± 1.77	0.46	
	30 min	6.88 ± 1.41	3.1		8.90 ± 2.61	5.12		12.67 ± 1.94	8.89		7.65 ± 2.02	3.87		4.81 ± 1.97	1.03	
	60 min	6.64 ± 1.60	2.46		9.78 ± 2.73	5.6		15.04 ± 3.29	10.86		9.30 ± 2.43	5.12		3.88 ± 1.05	-0.3	
	90 min	6.31 ± 1.63	2.55		9.07 ± 1.44	5.31		12.70 ± 2.66	8.94		8.30 ± 2.00	4.54		4.16 ± 1.08	0.4	
	120 min	5.46 ± 1.57	1.62		7.38 ± 1.64	3.54		12.07 ± 3.29	8.23		7.79 ± 2.34	3.95		3.52 ± 1.14	-0.32	

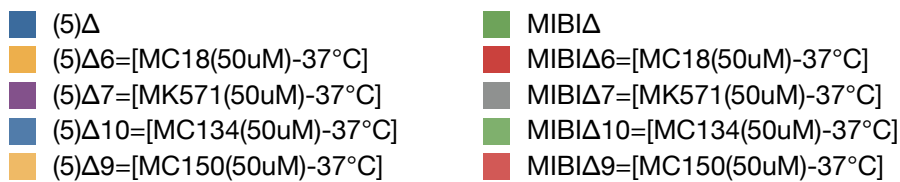
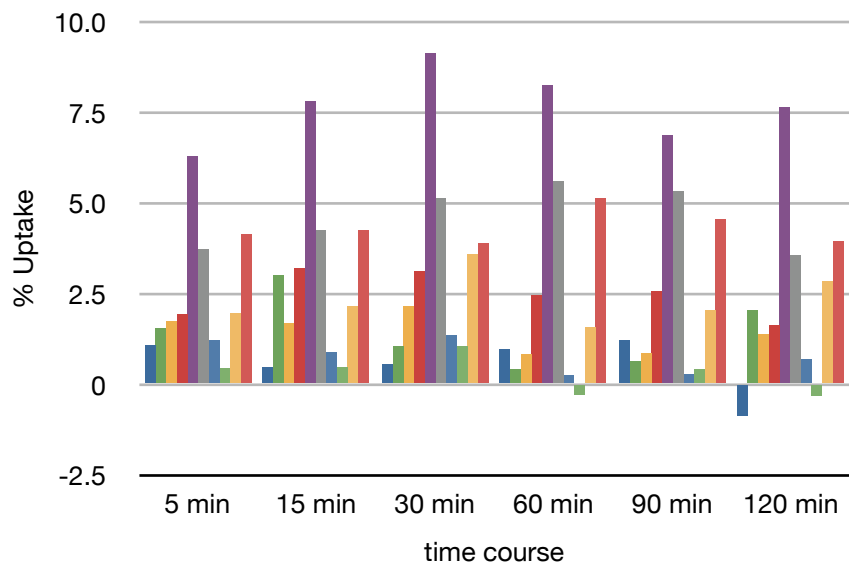
Tabella B4.10. Linea cellulare A2780/Adr+: cinetiche di accumulo di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, MK-571, MC18, MC150, MC134).

La sinossi grafica Sinossi B4.4: raffronto A, B, C, D riporta l'andamento dei Δ in funzione del tempo per i due traccianti in esame in cellule del tipo A2780/Adr+.

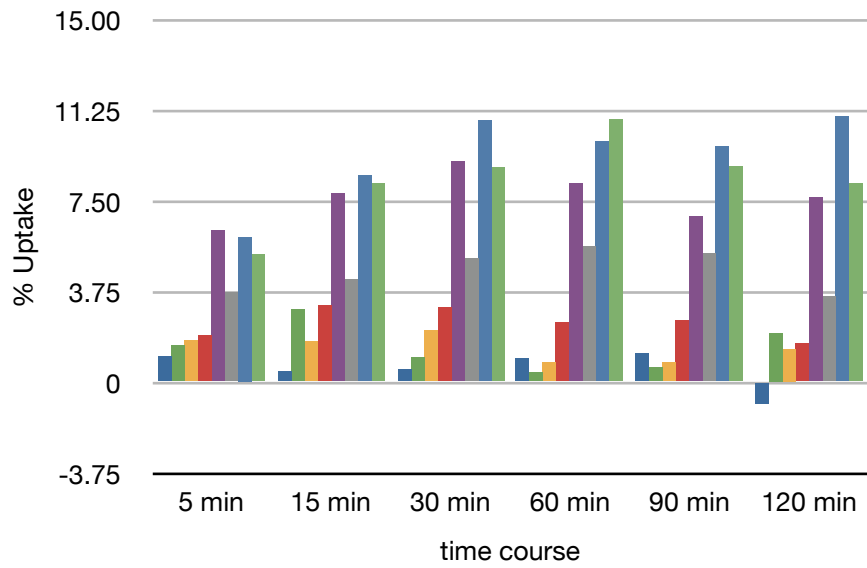
Linea cellulare A2780/Adr+: raffronto A



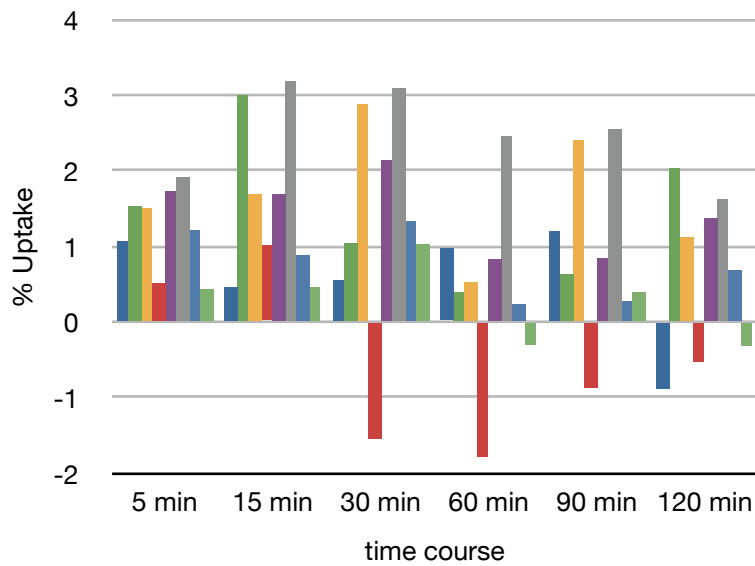
Linea cellulare A2780/Adr+: raffronto B



Linea cellulare A2780/Adr+: raffronto C



Linea cellulare A2780/Adr+: raffronto D



Sinossi B4.4. Linea cellulare A2780/Adr+: raffronti A, B, C, D.

La P-glicoproteina (P-gP) è una proteina di membrana con funzione di pompa la cui attività nota sembra essere quella di estrarre dal citoplasma sostanze anfipatiche neutre o debolmente basiche penetrate nella cellula. Consuma ATP. Espressa su neuroni, astrociti, cellule endoteliali, placenta, trofoblasto, ovaie, testicoli e cellule tumorali, enterociti (riduce l'assorbimento di sostanza tossiche), epatociti, cellule tubulari renali. La p-glicoproteina svolge quindi una funzione di barriera funzionale tra questi tessuti e il sangue. Svolge un importante ruolo protettivo di distretti "nobili" come il sistema nervoso centrale (contribuisce alla formazione della barriera ematoencefalica), feto e gonadi. In questa sezione, si valuta l'andamento delle cinetiche dei due traccianti su cellule MDCK/ MRP1.

Le cinetiche di captazione dei complessi in cellule trasfettate del tipo MDCK-MRP1, sovraesprimenti trasportatori MRP-1, sono riportate nei Grafici B4.17 e B4.18.

Come per le altre linee cellulari, il trattamento con Verapamil (50 µM) causa un significativo incremento della percentuale di uptake cellulare con valori di Δ3, valutati a 30 minuti, di circa 14 per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e di 9.67 per ^{99m}Tc -Sestamibi. Per entrambi i composti, in seguito a trattamento con Ciclosporina A (50 µM), non si osserva alcun significativo aumento della percentuale di captazione cellulare (Grafico B4.17).

A seguito dell'inibizione con MC18 e MC134, la percentuale di uptake cellulare del $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ rimane invariata, mentre quella di ^{99m}Tc -Sestamibi subisce una leggera variazione con valori di Δ6 di circa 2.5.

Il trattamento con inibitori specifici delle MRP1 quali MK571 (50 µM) e MC150 (50 µM) hanno rivelato che mentre il primo non ha portato significative differenze nelle percentuali di uptake dei due traccianti, MC150 risulta più attivo con valori di Δ9, valutati a 30 minuti, di 4.37 e 4.67 rispettivamente per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi.

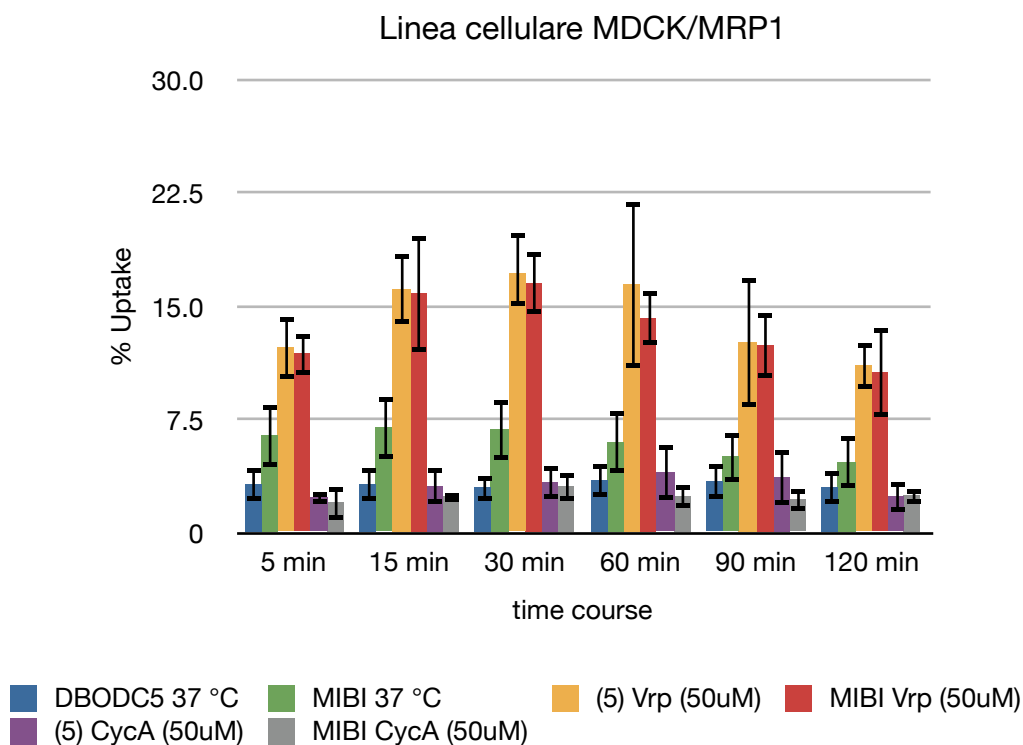


Grafico B4.17. Linea cellulare MDCK/MRP1, uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di Verapamil 50µM e Ciclosporina A 50µM.

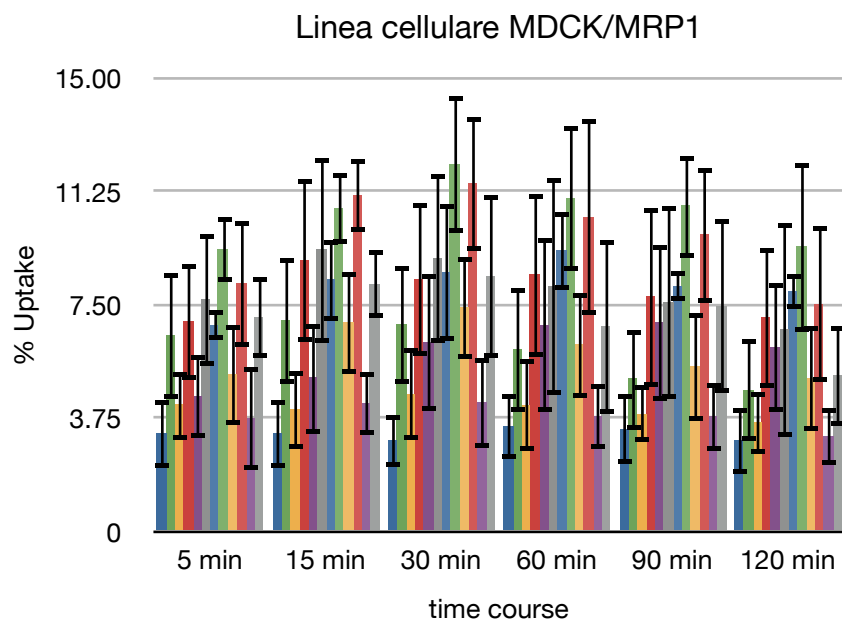


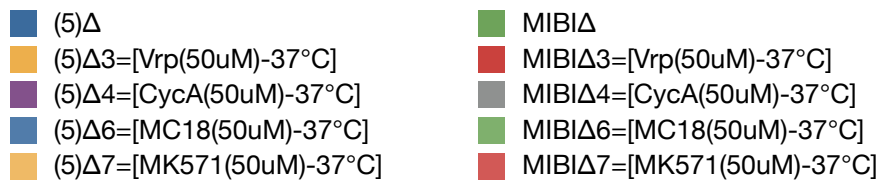
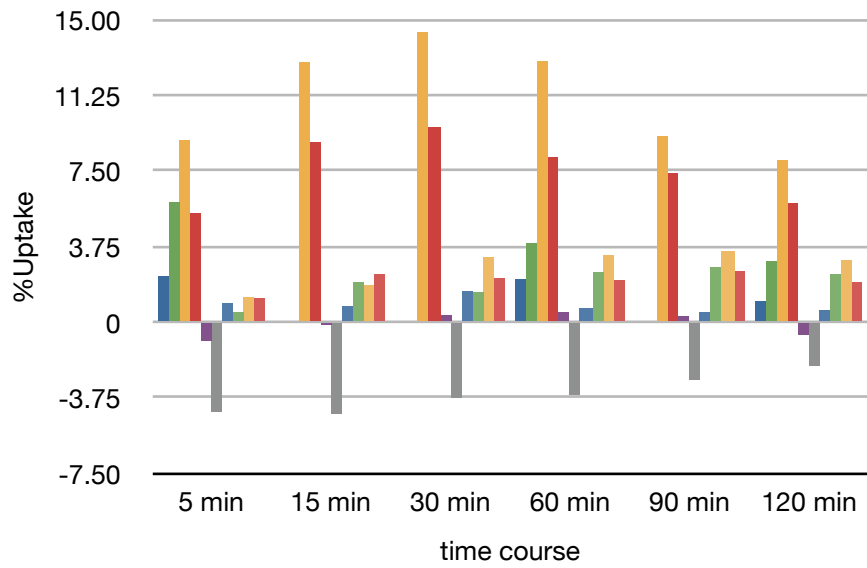
Grafico B4.18. Linea cellulare MDCK/MRP1, uptake di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi a 37 °C ed in presenza di MC18 50µM, MK571 50µM, MC18+MK571, MC150 50 50µM e MC134 50 50µM.

MDCK/MRP1	time course	DBODC5 37 °C			(5) Vrp (50uM)			(5) CycA (50uM)			(5) MC150 (50uM)			(5) MC134 (50uM)		
		media ± DS	(5)Δ	(5)Δ3	media ± DS	(5)Δ3	(5)Δ4	media ± DS	(5)Δ4	(5)Δ5	media ± DS	(5)Δ9	(5)Δ10	media ± DS	(5)Δ9	(5)Δ10
	5 min	3.24 ± 1.13	2.28	9	12.24 ± 2.05	9	2.32 ± 0.40	-0.92								
	15 min	3.23 ± 1.12			16.12 ± 2.30	12.89	3.08 ± 1.15	-0.15								
	30 min	3.02 ± 0.87			17.41 ± 2.41	14.39	3.34 ± 1.09	0.32								
	60 min	3.48 ± 1.09	2.13		16.43 ± 5.53	12.95	3.98 ± 1.77	0.5								
	90 min	3.38 ± 1.15			12.61 ± 4.28	9.23	3.67 ± 1.78	0.29								
	120 min	3.01 ± 1.09	1.04		11.05 ± 1.53	8.04	2.39 ± 1.00	-0.62								
MDCK/MRP1	time course	(5) MC18 (50uM)			(5) MK571 (50uM)			(5) MK571+MC18			(5) MC150 (50uM)			(5) MC134 (50uM)		
	5 min	4.18 ± 1.14	0.94		4.46 ± 1.38	1.22	6.81 ± 0.49	3.57		5.19 ± 1.65	1.95	3.73 ± 1.68	0.49			
	15 min	4.04 ± 1.32	0.81		5.08 ± 1.85	1.85	8.33 ± 1.35	5.1		6.92 ± 1.71	3.69	4.24 ± 1.04	1.01			
	30 min	4.54 ± 1.51	1.52		6.25 ± 2.26	3.23	8.56 ± 2.27	5.54		7.39 ± 1.68	4.37	4.27 ± 1.49	1.25			
	60 min	4.17 ± 1.50	0.69		6.82 ± 2.87	3.34	9.28 ± 1.29	5.8		6.18 ± 1.76	2.7	3.81 ± 1.09	0.33			
	90 min	3.88 ± 0.93	0.5		6.91 ± 2.58	3.53	8.11 ± 0.50	4.73		5.44 ± 1.77	2.06	3.79 ± 1.13	0.41			
	120 min	3.60 ± 1.05	0.59		6.07 ± 2.12	3.06	7.93 ± 0.58	4.92		5.07 ± 1.74	2.06	3.15 ± 0.94	0.14			
MDCK/MRP1	time course	MIBI 37 °C			MIBI Vrp (50uM)			MIBI CycA (50uM)								
	5 min	6.47 ± 2.09	5.94		11.85 ± 1.37	5.38	2.01 ± 1.11	-4.46								
	15 min	6.96 ± 2.08			15.87 ± 3.86	8.91	2.41 ± 0.32	-4.55								
	30 min	6.85 ± 1.98			16.52 ± 2.03	9.67	3.07 ± 0.91	-3.78								
	60 min	6.01 ± 2.04	3.91		14.20 ± 1.78	8.19	2.42 ± 0.74	-3.59								
	90 min	5.04 ± 1.67			12.40 ± 2.14	7.36	2.19 ± 0.75	-2.85								
	120 min	4.67 ± 1.69	3.03		10.59 ± 2.93	5.92	2.48 ± 0.52	-2.19								
MDCK/MRP1	time course	MIBI MC18 (50uM)			MIBI MK571 (50uM)			MIBI MK571+MC18			MIBI MC150 (50uM)			MIBI MC134 (50uM)		
	5 min	6.95 ± 1.93	0.48		7.67 ± 2.19	1.2	9.33 ± 1.09	2.86		8.19 ± 2.10	1.72	7.08 ± 1.33	0.61			
	15 min	8.96 ± 2.70	2		9.32 ± 3.07	2.36	10.68 ± 1.16	3.72		11.11 ± 1.21	4.16	8.18 ± 1.12	1.22			
	30 min	8.33 ± 2.53	1.48		9.04 ± 2.81	2.19	12.14 ± 2.28	5.29		11.52 ± 2.24	4.67	8.43 ± 2.70	1.58			
	60 min	8.48 ± 2.72	2.47		8.11 ± 3.59	2.1	11.02 ± 2.39	5.01		10.39 ± 3.23	4.38	6.76 ± 2.88	0.75			
	90 min	7.76 ± 2.99	2.72		7.58 ± 3.19	2.54	10.77 ± 1.72	5.73		9.81 ± 2.24	4.76	7.44 ± 2.87	2.4			
	120 min	7.06 ± 2.30	2.39		6.66 ± 3.54	1.99	9.41 ± 2.80	4.74		7.50 ± 2.56	2.83	5.15 ± 1.65	0.48			

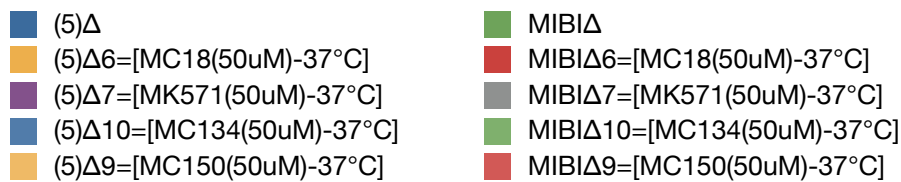
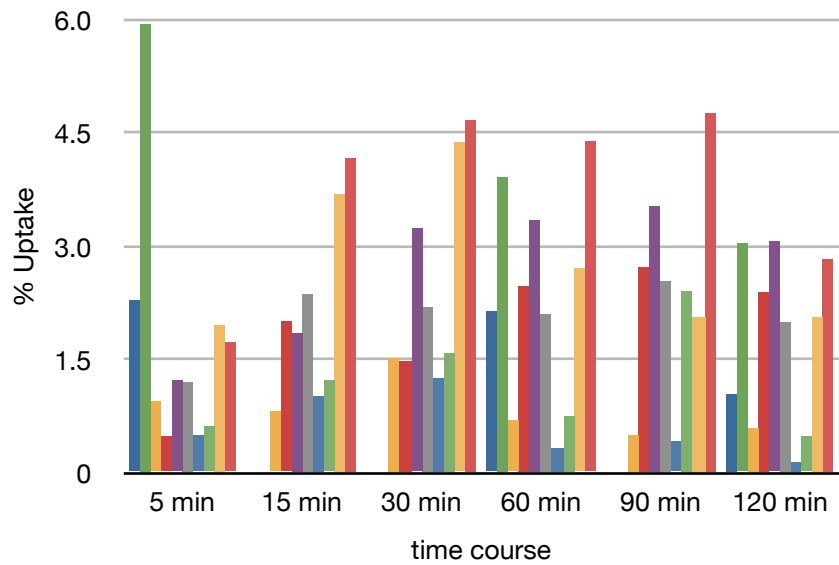
Tabella B4.11. Linea cellulare MDCK/MRP1: cinetiche di accumulo di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi, a 4 e 37 °C, valutate in presenza e non di opportuni modulatori/inibitori (Verapamil, Ciclosporina A, MK-571, MC18, MC150, MC134).

La sinossi grafica Sinossi B4.5: raffronto A, B, C, D riporta l'andamento dei Δ in funzione del tempo per i traccianti in esame in cellule del tipo MDCK/MRP1.

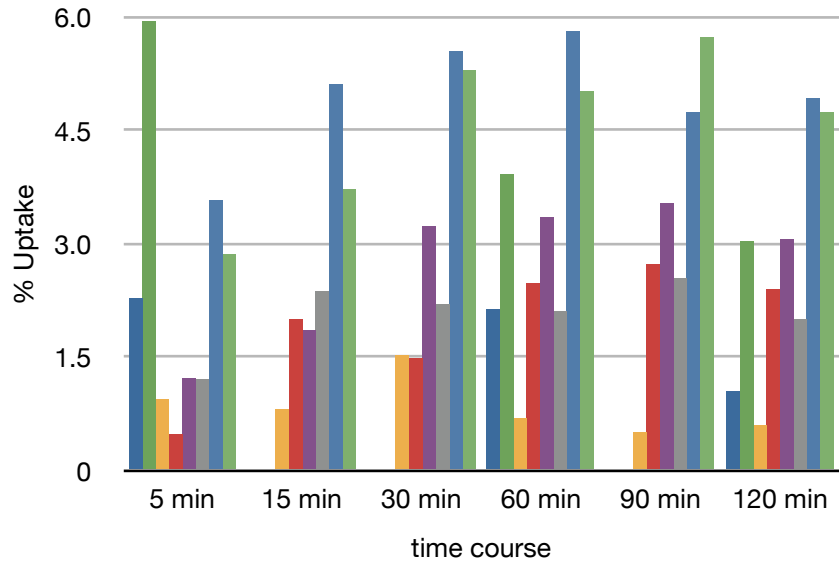
Linea cellulare MDCK/MRP1: raffronto A



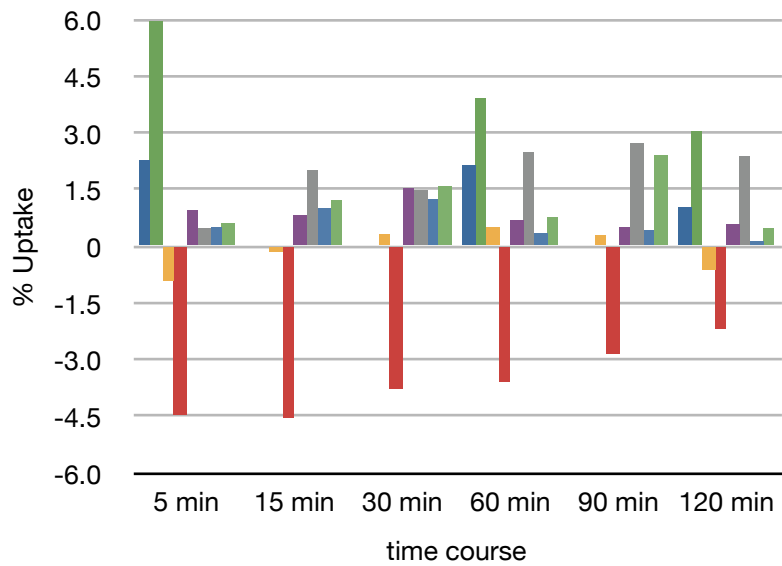
Linea cellulare MDCK/MRP1: raffronto B



Linea cellulare MDCK/MRP1: raffronto C



Linea cellulare MDCK/MRP1: raffronto D



Sinossi B4.5. Linea cellulare MDCK/MRP1: raffronti A, B, C, D.

B5 Conclusioni

La P-glicoproteina ha destato molto interesse per il suo possibile ruolo nella farmacoresistenza tumorale.

Le cellule neoplastiche possono presentare un'aumentata espressione di trasportatori, capaci di ridurre attivamente le concentrazioni intracellulari di vari importanti agenti strutturalmente non correlati (antracicline, alcaloidi della Vinca, tassani, etoposide) e di conferire al tumore proprietà di farmacoresistenza multipla. La più studiata di tali pompe d'efflusso è la P-glicoproteina (P-gP), descritta da Juliano e Ling nel 1976 e che nell'uomo è prodotta dal gene *mdr-1*.

La captazione cellulare di $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ e ^{99m}Tc -Sestamibi è correlata all'attività metabolica cellulare: basse temperature inibiscono l'uptake di entrambi i traccianti, indicando una ridotta captazione non specifica da parte di strutture cellulari, quali membrane o altre regioni idrofobiche.

L'accumulo cellulare è funzione del livello di espressione di P-gP/MPR: si osserva una chiara differenza nei livelli di uptake dell'agente radioattivo, tra cellule sensibili ai farmaci e cellule che esprimono farmaco resistenza, mediata da MDR/P-gP. Inoltre, si nota un elevato aumento della captazione del tracciante nelle cellule farmaco resistenti dopo trattamento con inibitori o modulatori di MDR.

I risultati preliminari, ottenuti in diverse linee cellulari, indicano che $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ sia preferibile a ^{99m}Tc -Sestamibi nella valutazione della farmaco resistenza mediata da P-gP/MPR.

Il potenziale selettivo riconoscimento di questi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})$ -traccianti, originariamente sviluppati per la visualizzazione tramite tecniche SPECT del miocardio, come substrati dei trasportatori P-gP/MDR, correlato al chiaro tropismo mitocondriale, può estendere la loro applicazione clinica dalla cardiologia nucleare all'oncologia, ovvero agli studi di imaging di MDR.

In base a questi risultati, il $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ può rappresentare un primo esempio per lo sviluppo di marcatori tumorali più specifici e sensibili.

B6 Riferimenti bibliografici

3. Del Vecchio S., Salvatore, M. (2004) ^{99m}Tc -MIBI in the evaluation of breast cancer biology. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 31, suppl.1, S88-S96.
4. Multidrug Resistance: biological and pharmaceutical advances in antitumour treatment. (2008) Colabufo, N.A. Edt. Published by Research Signpost.
5. Sharma, V., Piwnica-Worms, D. (2005) Monitoring multidrug resistance P-glycoprotein drug transport activity with single-photon emission computer tomography and positron emission tomography radiopharmaceuticals. *Top Curr Chem*, 252, 155-178.
6. Colabufo, N. A., Berardi, F., Cantore, M., Contino, M., Inglese, C., Niso, M., and Perrone, R. (2010) Perspectives of P-Glycoprotein Modulating Agents in Oncology and Neurodegenerative Diseases: Pharmaceutical, Biological, and Diagnostic Potentials. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 1883-1897.
7. Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesman, M.M., Sarkadi, B. (1993) Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein *J Biol Chem* 268, 21493.
8. Sharma, V. (2004) Radiopharmaceuticals for assessment of multidrug resistance P-glycoprotein-mediated drug transport activity. *Bioconjugate Chem.* 15, 1464-1474.
9. Moretti, J.L., Hauet, N., Caglar, M., Rebillard, O., Burak, Z. To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2005, 32, S36-842.
10. Bolzati, C., Boschi, A., Uccelli, L., Tisato, F., Refosco, F., Cagnolini, A., Duatti, A., Prakash, S., Bandoli, G and Vittadini, A. (2002) Chemistry of the Strong Electrophilic Metal Fragment $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ (PNP= Diphosphine Ligand). A Novel Toll for the Selective Labelling of Small Molecules *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11468-11479.
11. Boschi, A., Bolzati, C., Benini, E., Malago, E., Uccelli, L., Duatti, A., Piffanelli, A., Refosco, F., and Tisato, F. (2001) A novel approach to the high-specific-activity labeling of small peptides with the technetium-99m fragment $[\text{Tc-99m}(\text{N})(\text{PXP})]^{2+}$ (PXP = diphosphine ligand). *Bioconjugate Chemistry* 12, 1035-1042.
12. Boschi, A., Bolzati, C., Uccelli, L., Duatti, A., Benini, E., Refosco, F., Tisato, F., and Piffanelli, A. (2002) A class of asymmetrical nitrido ^{99m}Tc heterocomplexes as heart imaging agents with improved biological properties. *Nucl. Med. Commun.* 23, 689-693.

13. Boschi, A., Uccelli, L., Bolzati, C., Duatti, A., Sabba, N., Moretti, E., Di Domenico, G., Zavattini, G., Refosco, F., and Giganti, M. (2003) Synthesis and biologic evaluation of monocationic asymmetrical ^{99m}Tc -nitride heterocomplexes showing high heart uptake and improved imaging properties. *J. Nucl. Med.* 44, 806-814.

14. Cittanti, C., Uccelli, L., Pasquali, M., Boschi, A., Flammia, C., Bagatin, E., Casali, M., Stabin, M. G., Feggi, L., Giganti, M., and Duatti, A. (2008) Whole-Body Biodistribution and Radiation Dosimetry of the New Cardiac Tracer ^{99m}Tc -N -DBODC. *J. Nucl. Med.* 49, 1299-1304.

15. Bolzati, C., Cavazza-Ceccato, M., Agostini, S., Tokunaga, S., Casara, D., and Bandoli, G. (2008) Subcellular Distribution and Metabolism Studies of the Potential Myocardial Imaging Agent [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DBODC})(\text{PNP5})$] $^+$. *J. Nucl. Med.* 49, 1336-1344.

16. Bolzati, C., Cavazza-Ceccato, M., Gandin, V., Marzano, C., Refosco, F., Dolmella, A., Colabufo, N. A., Berardi, F., Perrone, R., and Bandoli, G. (2009) ^{99m}Tc -(N)-DBODC5 from cardiology to oncology. Preliminary in vitro study [PW142]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36 Supplement 2, S309

17. Bolzati, C., Cavazza-Ceccato, M., Agostini, S., Refosco, F., Yamamichi, Y., Tokunaga, S., Carta, D., Salvatorese, N., Bernardini, D. and Bandoli, G. (2010) Biological in vitro and in vivo studies of a series of new asymmetrical cationic [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DTC-Ln})(\text{PNP})$] $^+$ complex (DTC-Ln = alicyclic dithiocarbamate, PNP = bisphosphinoamine). *Bioconjugate Chem.* Doi 10.1021/bc900493e.

18. Kim, Y. S., He, Z., Hsieh, W. Y., and Liu, S. (2006) A novel ternary ligand system useful for the preparation of cationic ^{99m}Tc -diazenido complexes and ^{99m}Tc -labelling small biomolecules. *Bioconjugate Chem.* 17, 473-484.

19. Liu, S., He, Z., Hsieh, W. Y., and Kim, Y. S. (2006) Evaluation of novel cationic ^{99m}Tc -nitrido complexes as radiopharmaceuticals for heart imaging: improving liver clearance with crown ether groups. *Nucl. Med. Biol.* 33, 419-432.

20. He, Z., Hsieh, W. Y., Kim, Y. S., and Liu, S. (2006) Evaluation of novel cationic $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ - tricarbonyl complexes as potential radiotracers for myocardial perfusion imaging. *Nucl. Med. Biol.* 33, 1045-1053.

21. Kim, Y. S., He, Z., Hsieh, W. Y., and Liu, S. (2007) Impact of bidentate chelators on lipophilicity, stability, and biodistribution characteristics of cationic ^{99m}Tc -nitrido complexes. *Bioconjugate Chem.* 18, 929-936.

22. Kim, Y. S., Wang, J. J., Broisat, A., Glover, D. K., and Liu, S. (2008) Tc-^{99m}-N-MPO: Novel cationic Tc-99m radiotracer for myocardial perfusion imaging. *J. Nucl. Cardiol.* 15, 535- 546.
23. Kim, Y. S., Shi, J. Y., Zhai, S. Z., Hou, G. H., and Liu, S. (2009) Mechanism for myocardial localization and rapid liver clearance of Tc-99m-N-MPO: A new perfusion radiotracer for heart imaging. *J. Nucl. Cardiol.* 16, 571-579.
24. Colabufo, N. A., Berardi, F., Perrone, M. G., Cantore, M., Contino, M., Inglese, C., Niso, M., Perrone, R. (2009) Multi Drug Resistance reverting agents: 2-aryloxazole and 2-arylthiazole derivatives as potent BCRP or MRP1 inhibitors. *Chem.Med.Chem.* 4, 188-195.
25. Van Waarde, A., Ramakrishnan, K., Rybczynska, A.A., Elsinga, P.H., Berardi, F., de Jong, J. R., Kwizera, C., Perrone, R., Cantore, M., Sijbesma, J. W. A., Dierckx, R. A., Colabufo, N. A. (2009) Synthesis and preclinical evaluation of novel PET probes for P-glycoprotein function and expression. *J. Med. Chem.*, 52, 4524-4532.
26. 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. Nucl. Med.*, 2004, 45, 2095-2101
27. 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)]⁺”, *J. Nucl. Med.*, 2008, 49, 1336-1344.
28. 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 ^{99m}Tc-N-DBODC5 when injected during vasodilator stress in canine models of coronary stenoses”, *J. Nucl. Card.*, 2006
29. Tisato, F. Refosco, C. Bolzati, S. Agostini, M. Porchia, M. Cavazza-Ceccato, S. Tokunaga “Intermediate compound of technetium nitride complex for radiodiagnostic imaging” 2006, PCT/JP 2006/301260.
30. C. Bolzati, f. Refosco, A. Cagnolini, F. Tisato, A. Boschi, A. Duatti, L. Uccelli, A. Dolmella, E. Marotta, M. Tubaro “Synthesis, solution-state and solide-state structural characterization of monocationic nitrido heterocomplexes [M(N)(DTC)(PNP)]⁺ (M=^{99m}Tc and Re; DTC=dithiocarbamate; PNP=heteridiphosphine)”, 2004, *Eur. J. Inorg. Chem.* 1902].

Sezione C

Applicabilità della tecnologia $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$
alla preparazione di radiofarmaci target specifici

C1 Obiettivo

In questa Sezione l'attività è stata rivolta all'applicazione del sistema $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ 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), dotati di 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 uno dei radionuclidi ideali. 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, $(\text{CO})_3$ /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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{Cys}\sim)]^{+0}$ 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 1 della melanocortina (MC1), che risulta sovraespresso sulle cellule di melanoma ed è contenuto anche in più dell'80% delle cellule metastatiche, che attaccano cervello, reni e polmoni.

Gli analoghi sintetici del neuropeptide endogeno α -MSH NAP-NS1 e NAP-NS2, per la loro elevata affinità per i recettori MC1, sono stati selezionati quali molecole recettore-specifiche ed opportunamente derivatizzate all'estremità N-terminale con l'amminoacido cisteina: agente chelante per il Tc-99m 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 C1.1. Indicati come PNP3, PNP10 e PNP43 sono stati studiati e selezionati per conferire ai complessi finali diverse caratteristiche di lipofilia. In particolare il legante PNP43 è stato progettato e sintetizzato allo scopo di modulare la lipofilia e quindi il profilo farmacocinetico in vivo del complesso finale.

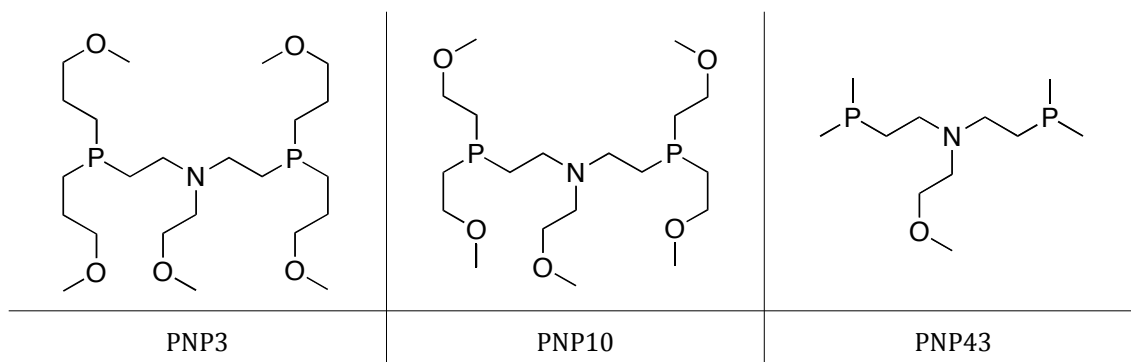


Figura C1.1. Leganti aminodifosfinici PNP3, PNP10 e PNP43.

I 6 complessi ottenuti a livello di Tecnezio-99m sono stati oggetto di un'intenso studio volto a valutarne la stabilità in vitro (stabilità idrolitica e transchelazione) ed il profilo biodistributivo in ratti Sprague-Dawley.

Un'ulteriore obiettivo presentato in questa Sezione consiste nel tentato trasferimento del *know-how* acquisito nello sviluppo della tecnologia del frammento metallico $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ 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 ($E_{\beta\text{max}}=2.12$ MeV, $t_{1/2}=16.8$ h; $E_{\gamma}=155$ 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 sé 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ alla preparazione di analoghi complessi dissimmetrici di Re-188 del tipo $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{Cys}\sim)]^{+/0}$, aventi un core nitruro $\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})$ 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.

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.

Allo scopo di creare la coppia teragnostica tecnezio-99m/renio-188, gli analoghi NAP-NS1 e NAP-NS2 sono stati utilizzati in studi preliminari volti al tentato ottenimento della specie asimmetrica $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS1})]^{+/0}$.

C2 Introduzione

C2.1	Imaging Molecolare	181
C2.2	Radiofarmaci <i>target</i> specifici	182
C2.3	Imaging recettoriale con peptidi	183
C2.4	Analoghi radiomarcanti di α -MSH: lo stato dell'arte	184
C2.5	Renio-186 e Renio-188	188
C2.6	Chimica di coordinazione del Renio	191
C2.7	Reattività dei complessi di Renio	193
C2.8	Strategie sintetiche di marcatura di biomolecole con ^{186}Re e ^{188}Re	194
C2.9	Radiofarmaci di Re-188	197

C2.1 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 esemplificativo, 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 [$^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6$]⁺ (MIBI= 2-metossi-2-metilpropilisonitrile) e ^{99m}Tc -Tetrofosmin [$^{99m}\text{TcO}_2(\text{Tetrofosmin})_2$]⁺ (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 $^{99m}\text{TcO}(\text{ECD})$, (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.

C2.2 Radiofarmaci *target* specifici

Negli ultimi quindici anni la ricerca medico nucleare si è rivolta allo studio di radiofarmaci target-specifici, ovvero ligandi radiomarcanti 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.

Radiofarmaco	Nome commerciale	Applicazione Clinica
Indio-111 capromab pendetide	ProstaScint [®]	Imaging cancro prostatico
Indio-111 pentetretotide	Octreoscan [®]	Imaging tumori neuroendocrini
Indio-111 satumomab pendetide	OncoScint [®]	Imaging di complicazioni metastatiche associate al cancro colonrettale e ovarico
Tc-99m Apcitide	AcuTest [®]	Peptide sintetico per l'imaging della trombosi venosa profonda
Tc-99m Arcitumomab	CEA-Scan [®]	Anticorpo monoclonale per il cancro colonrettale
Tc-99m Depreotide	Neotect [®]	Tumore polmonare esprime recettori per la somatostatina
Y-90 Ibitumomab tiuxetan	Zevalin [®]	Linfoma non-Hodgkin
I-131 Tositumomab	Bexxar [®]	Linfoma non-Hodgkin

Tabella C2.1. 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, nonché ad un più preciso utilizzo delle risorse terapeutiche, grazie alla identificazione di marcatori in grado di predire la sensibilità o resistenza a diversi farmaci.

C2.3 *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 autoradiografia *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].

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 radiomarcanti 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 le dosi 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.

C2.4 Analoghi radiomarcanti di α -MSH: lo stato dell'arte

Come si è detto precedentemente, il recettore MC1 rappresenta un potenziale target molto interessante nello sviluppo di possibili farmaci specifici per il melanoma. Nel campo della Medicina Nucleare, questo significa radiomarcare l' α -melanocortina, o suoi derivati, con nuclidi adatti ad un approccio diagnostico o terapeutico.

Durante gli anni 1970 e 1980 la ricerca si è focalizzata su studi di marcatura di α -MSH e di suoi analoghi con trizio. I composti sperimentati, pur dimostrando adeguati profili di biodistribuzione e di stabilità in vivo, non possedevano sufficiente attività specifica (valori riscontrati compresi tra i 12 e i 21 GBq/ μ mol), risultando poco efficienti.

Per contro, la marcatura con Iodio-125 (a livello della Tyr²) ha fornito composti ad attività specifica molto più elevata (dell'ordine dei 100 GBq/ μ mol), i quali tuttavia si sono dimostrati poco stabili, poiché subivano facilmente dealogenazione in vivo; lo Iodio-125 liberato si accumulava nella

tiroide, rendendo impossibile la visualizzazione delle metastasi nei tessuti. A tutt'oggi il composto ^{125}I -[Nle,D-Phe]- α -MSH (NDP-MSH, Figura C2.1) risulta il più utilizzato come riferimento per gli studi in vitro, in qualità di "gold standard", perché realizza affinità di binding al recettore nell'ordine sub-nanomolare; esso mantiene però l'inconveniente della deiodogenazione in vivo.



Figura C2.1. Sequenza primaria del peptide NDP-MSH.

All'interno della sequenza peptidica gli amminoacidi contenenti gruppi sulfidrilici nelle catene laterali, a maggior rischio di ossidazione enzimatica in vitro e in vivo, si presentano sostituiti da amminoacidi resistenti. Anche la fenilalanina, sebbene appartenesse alla sequenza fondamentale per il binding, è stata sostituita dall'analoga appartenente alla serie D.

Anche i nuclidi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re sono stati utilizzati per radiomarcare analoghi dell' α -MSH. In questo ambito, si è stabilito che la ciclizzazione della sequenza peptidica attorno al core metallico (nella fattispecie i core "oxo" $[\text{TcO}]^{3+}$ e $[\text{ReO}]^{3+}$), come mostrato in fig. 1.10, migliora notevolmente la stabilità in vivo, l'affinità di binding al recettore, l'uptake ed il tempo di ritenzione da parte del tessuto neoplastico.

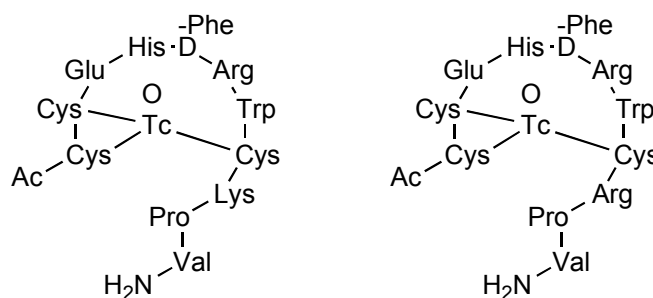


Figura C2.2. Struttura $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{O})\text{-CCMSH}$ e $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{O})\text{-(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$. Si noti come la sequenza peptidica mantenga sempre il segmento di binding His-(D-)Phe-Arg-Trp, ma presenti numerose variazioni rispetto ad α -MSH.

Il composto $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{O})\text{-CCMSH}$ (a) manifesta buona specificità nei confronti delle cellule di melanoma, ma presenta problemi legati ad un alto uptake da parte del tessuto renale. Questo inconveniente è stato superato mediante sostituzione della Lys^{11} con una Arg (complesso $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{O})\text{-(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$), (b). Anche il core $^{188}\text{ReO}^{3+}$ è stato applicato alla struttura (Arg¹¹)CCMSH ed i risultanti complessi mostrano un uptake tumorale aumentato del 30%, a fronte di un uptake renale diminuito del 43%.

In aggiunta a questi promettenti dati, si è testato il complesso $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{O})\text{-(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ su topi inoculati con cellule di melanoma primario B16/F1 e melanoma metastatico B16/F10: Esso ha mostrato un ottimo profilo farmacocinetico, caratterizzato da elevato uptake tumorale recettore-mediato e rapida clearance sistemica. Le immagini dei tessuti tumorali sono state ottenute con Micro-SPECT/CT, dimostrando la sua potenziale utilità nell'imaging target-specifico (Figura. C2.3).

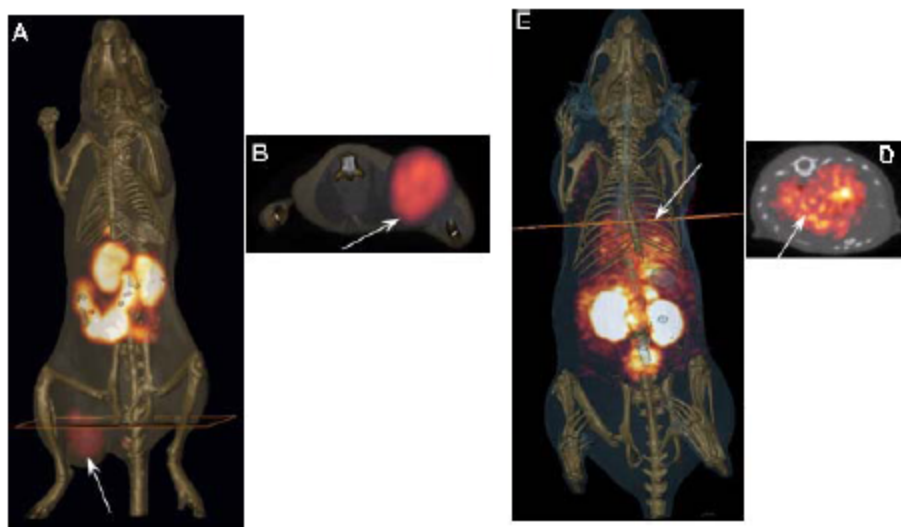


Figura C2.3: immagini Micro-SPECT/CT ottenute con il complesso $^{99m}\text{Tc(O)-(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ in topi C57 inoculati con melanoma primario B16/F1 sviluppatosi nel fianco (A: whole body; B: transaxial), a due ore dall'iniezione; immagini Micro-SPECT/CT ottenute con il complesso $^{99m}\text{Tc(O)-(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ in topi C57 inoculati con melanoma metastatico polmonare B16/F10 (C: whole body; D: transaxial).

Come precedentemente accennato, un peptide radiomarcato si può altresì ottenere utilizzando la "strategia bifunzionale". Un simile approccio è stato applicato anche agli analoghi dell' α -MSH, impiegando i nuclidi ^{99m}Tc e ^{188}Re con chelanti bifunzionali tra cui Ac-Cys-Gly-Cys-Gly-(CGCG), tetrafluorofenil-mercapto-acetylglcylglycyl-gamma-amminobutirrato (MAG2), dietilnetriamene pentaacetato (DTPA) e 1,4,7,10,-tetraazaciclodododcano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA) (Figura C2.4).

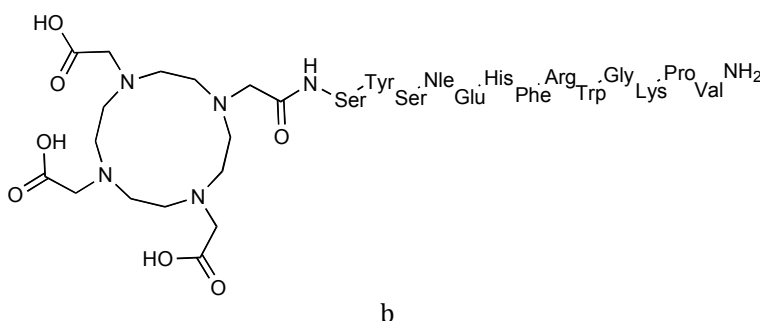
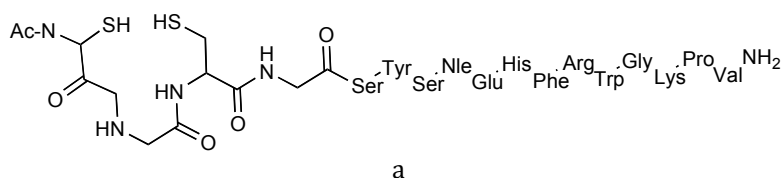


Figura C2.4. a) CGCG-NDP-MSH e b) DOTA-NDP-MSH.

Confrontando il composto $^{99m}\text{Tc}(\text{O})\text{-CGCG-NDP-MSH}$ con quello ottenuto mediante MAG2 e con $^{125}\text{I}\text{-[Nle,D-Phe]-}\alpha\text{-MSH}$, si è riscontrato che il primo detiene il miglior rapporto tumore/sangue e tumore/muscolo, sebbene presenti un moderato uptake da parte delle cellule di melanoma.

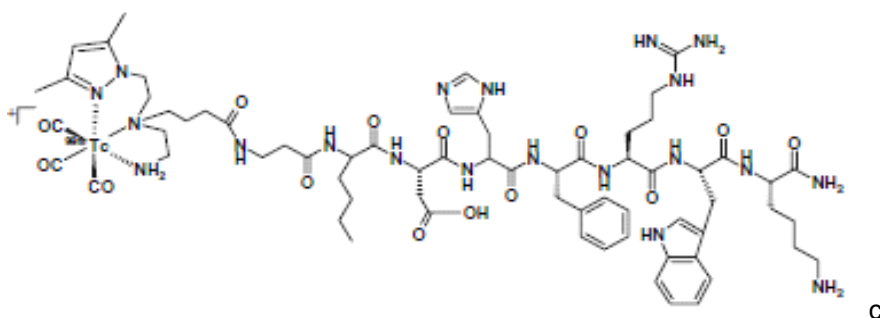
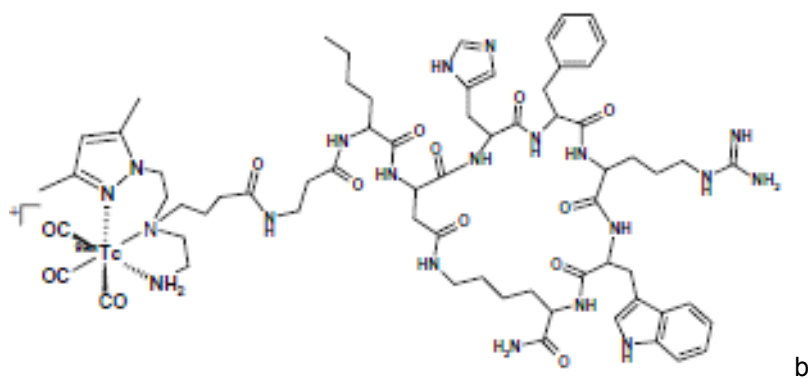
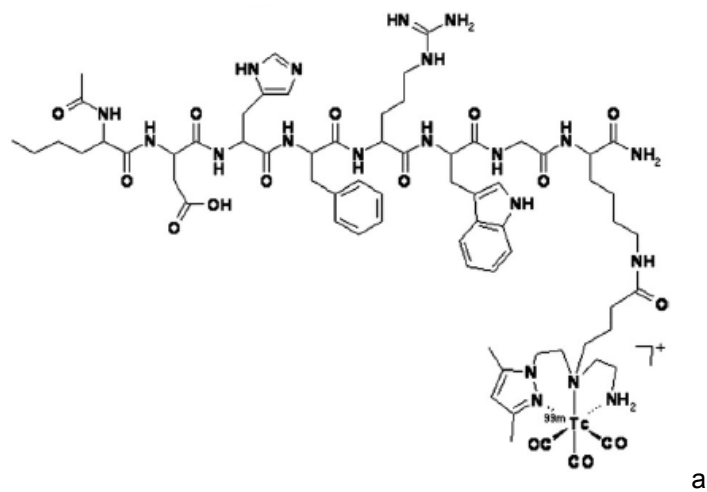


Figura C2.5. I complessi radiomarcanti $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-(Ac-Nle}^4, \text{Asp}^5, \text{D-Phe}^7, \text{Lys}^{11})\alpha\text{-MSH}_{4-11}]$ (a), $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-}\beta\text{Ala-Nle-cyclo[Asp-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-NH}_2$ (b) e $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-}\beta\text{Ala-Nle-Asp-D-Phe-Arg-Trp-Lys-NH}_2$ (c).

Recentissimi lavori presentano analoghi dell' $\alpha\text{-MSH}$, ciclici e lineari, marcati con il frammento metallico $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ per mezzo di un chelante bifunzionale avente struttura pirazolil-diamminica (pz). Le strutture sono presentate in Figura C2.5.

Il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-(Ac-Nle}^4, \text{ Asp}^5, \text{ D-Phe}^7, \text{ Lys}^{11})\alpha\text{-MSH}_{4-11}]$ (a) possiede elevata stabilità in vitro ed esibisce buoni livelli di uptake e di ritenzione da parte della linea cellulare B16/F1 di melanoma murino; anche in vivo, su topi inoculati C57BL6 mostra un significativo uptake tumorale.

Il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-}\beta\text{Ala-Nle-cyclo[Asp-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-NH}_2$ (b), in cui il peptide è un lattame ciclico analogo dell' α -MSH, dimostra alta attività specifica, alta purezza radiochimica ed un ottimo grado di uptake e di ritenzione cellulare in vitro.

Per il suo analogo lineare (c), al contrario, i livelli di uptake e ritenzione da parte del tessuto tumorale sono significativamente più bassi, indice che in questi casi la ciclizzazione può essere una caratteristica strutturale vantaggiosa. ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾

Si può quindi concludere che l'approccio bifunzionale sia applicabile alla marcatura con ^{99m}Tc e $^{186/188}\text{Re}$ di analoghi dell' α -MSH; risultati promettenti sono stati già ottenuti. Questo offre il razionale per uno studio di sintesi di una nuova categoria di agenti per imaging, di struttura generale $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNPX})(\text{analogoMSH})]^x$, utilizzando la strategia bifunzionale applicata al metodo del frammento metallico $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNPX})]^{2+}$.

C2.5 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 C2.2).

Nuclide	$T_{1/2}$	Decadimenti	Penetrazione in tessuto molle
^{186}Re	90.7 h	γ , $E_\gamma=137$ keV	5 mm
		β^- , $E_\beta=1.07, 0.93$ MeV	
^{188}Re	16.98 h	γ , $E_\gamma=155$ keV	11 mm
		β^- , $E_\beta=2.12$ MeV	

Tabella C2.2. Proprietà nucleari degli isotopi di Re di interesse in Medicina Nucleare.

Re-186 decade emettendo particelle β^- di $E_{\text{max}}=1.07$ MeV con abbondanza 91% e un fotone γ , con $E_\gamma=137$ 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: $[^{185}\text{Re}(n,\gamma)^{186}\text{Re}]$. 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 [$^{187}\text{Re}(n,\gamma)^{188}\text{Re}$] sia mediante generatore $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ a base di allumina e resine a scambio ionico. Tale generatore, simile a quello $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, permette di ottenere Re-188 nella forma chimica di anione tetraossigenato [$^{188}\text{ReO}_4^-$] (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 C2.6).

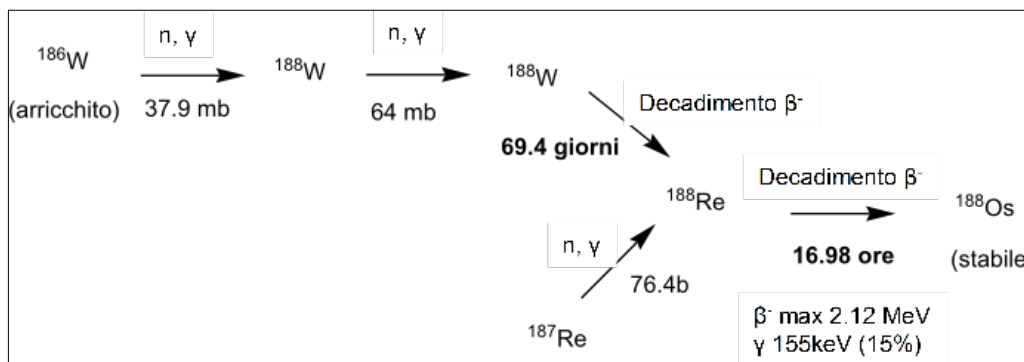


Figura C2.6. Produzione e schema di decadimento di W-188.

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 [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 $[\text{Tc}^{\text{IV}}\text{Cl}_6]^{2-}$ e $[\text{Re}^{\text{IV}}\text{Cl}_6]^{2-}$ 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 C2.3). 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	$E^\circ(\text{V})$
$\text{ReO}_4^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 3 \text{e}^- = \text{ReO}_2 + 4 \text{OH}^-$	- 0.594
$\text{ReO}_4^- + 4 \text{H}_2\text{O} + 7 \text{e}^- = \text{Re} + 8 \text{OH}^-$	- 0.584
$\text{ReO}_4^- + 8 \text{H}^+ + 7 \text{e}^- = \text{Re} + 4 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.362
$\text{ReO}_4^- + 4 \text{H}^+ + 3 \text{e}^- = \text{ReO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.510
$\text{TcO}_4^- + 4 \text{H}^+ + 3 \text{e}^- = \text{TcO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.7

Tabella C2.3. Potenziali standard di riduzione, E° , di alcune coppie ossido riduttive ottenute da $[\text{ReO}_4]^-$ e $[\text{TcO}_4]^-$.

Appare evidente come in condizioni standard risulti molto più difficile ridurre l'anione perrenato, $[^{188}\text{ReO}_4]^-$, rispetto al corrispondente anione del Tecnezio, $[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$. 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 tecnezati, 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.

C2.6 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 $[\text{Re}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$ ed il diossido $\text{Re}^{\text{IV}}\text{O}_2$, 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 $[\text{ReO}_4]^-$, base coniugata dell'acido perrenico (HReO_4). Lo ione $[\text{ReO}_4]^-$ 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 C2.4).

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 ₃ Cl(2,2-bipyridine)] e trigonale [Re(NHSC ₆ H 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 bipyramidale a base pentagonale [ReF ₇] ⁻
		6	geometria ottaedrica del tipo [ReOX ₄ L] quale [ReOCl ₄ H ₂ O]
		5	trigonale [Re(S ₂ C ₂ Ph ₃) ₃]
		4	geometria piramidale a base quadrata [ReNCl ₄] ⁻ , [ReO ₅] ⁻ 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 ₃ L ₂], [ReO ₂ L ₄] ⁺ , [Re(NR) ₃ L 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 ₅ L] ⁻ , [MX ₄ L ₂], esempi: [K ₂ ReCl ₆] ReO ₂ , ReS ₂ , qualche esempio di legame Re-Re
III (d ⁴)	1,5-2,1 MB	7	geometria a bipyramide pentagonale [K ₄ Re(CN) ₇ ·2H ₂ O], [ReX ₂ L ₄] ⁺ , [ReX ₃ L ₃], [ReX ₄ L ₂]
		6	geometria ottaedrica [Re(acac) ₂ Cl ₂] ⁻
		5	geometria trigonale bipyramidale [Re(SAr) ₃ (NCMe)(PPh ₃)] -dimeri con legame Re-Re: [Re ₂ X ₈] ²⁻ , [Re ₂ X ₆ L ₂] -clusters trinucleari: [Re ₂ X ₁₂] ³⁻ , [Re ₃ X ₁₁] ²⁻ , [Re ₃ X ₁₀] ⁻ , [Re ₃ X ₉ L ₂]
II (d ⁵)		6	geometria ottaedrica, complessi molto rari, del tipo [ReX ₂ L ₄], [MXL ₅] ⁺ , esempio: [ReClN ₂ (PMe ₂ Ph) ₄] ⁺ .

Stato di Ossidazione	Momento magnetico	Numero di coordinazione	Caratteristiche
I (d ⁶)	Diamagnetico	6	geometria ottaedrica [K ₅ Re(CN) ₆] trigonale bipyramidale [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 C2.4. Caratteristiche dei complessi di renio a vari stati di ossidazione^[9].

C2.7 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 [ReOCl₃(PPh₃)₂], [ReOX₄]⁻ per il Re(V), e [ReCl₃(MeCN)(PPh₃)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 d²sp³, che possiedono almeno un orbitale d vuoto, quali complessi di Re(V) d², Re(VI) d¹, Re(VII) d⁰ presentano nelle reazioni di scambio una elevata reattività nei confronti di agenti nucleofili. Complessi ottaedrici con orbitali d maggiormente occupati, quindi Re(I) d⁶, Re(II) d⁵, Re(III) d⁴, Re(IV) d³ 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) penicillamina]: 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 10³-10⁴ 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.

C2.8 Strategie sintetiche di marcatura di biomolecole con ^{186}Re e ^{188}Re

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 $[\text{Re}^{\text{V}}=\text{O}]^{3+}$, 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, glucoptonato 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 $\text{N}_x\text{S}_{(4-x)}$, (Figura C2.7) quali:

- N_2S_2 come diamminotiooli (DADT), diamidetioli (DADS) e monoamidemonoamminoditiolo (MAMA),
- N_3S triamidetioli e mercaptoacetilglicina (MAG₃),
- N_4 propilenammina-ossima (PnAO).

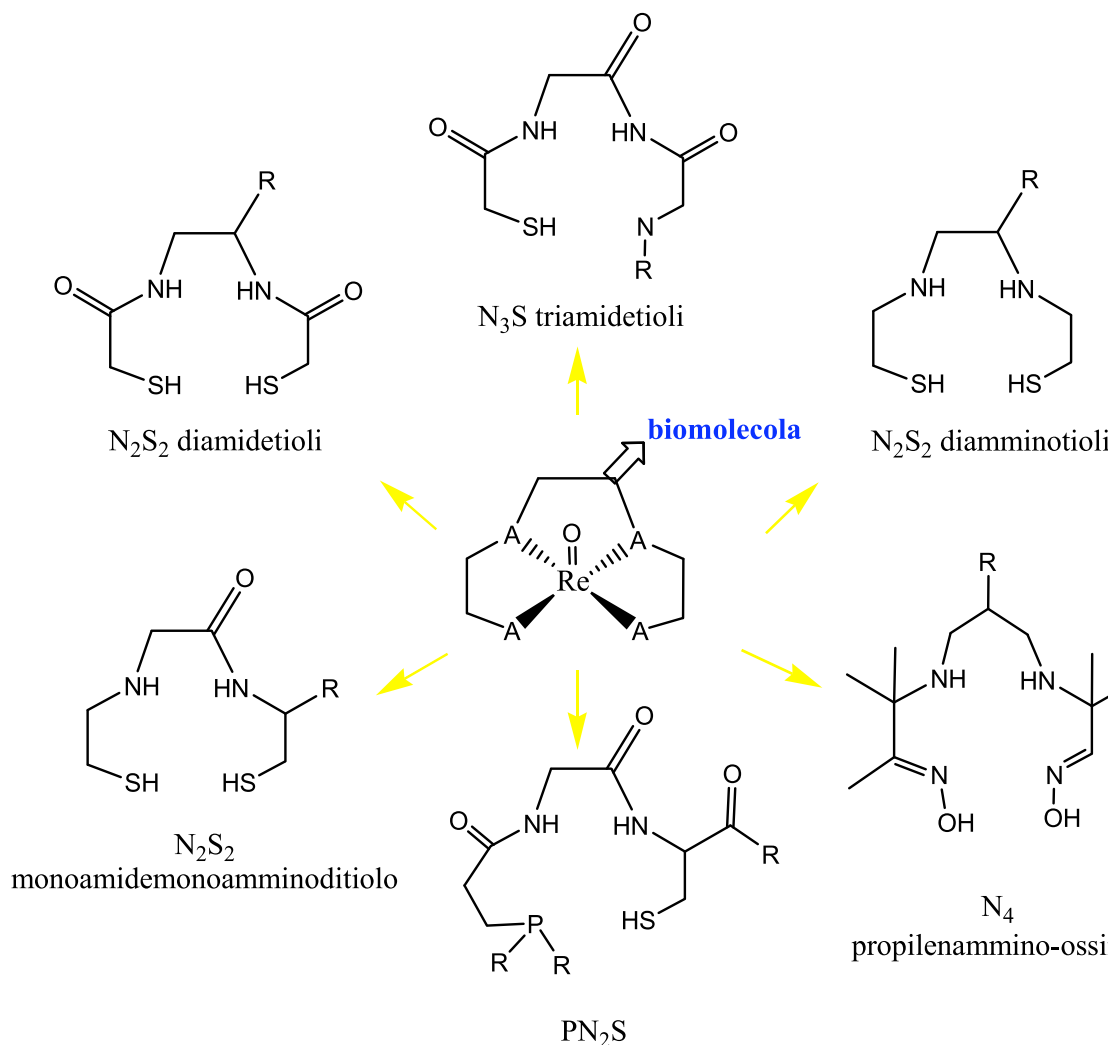


Figura C2.7. Leganti bifunzionali disponibili per la coordinazione del *core* $[\text{Re}^{\text{V}}=\text{O}]^{3+}$.

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 diastereoisomeri 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 $\text{N}_x\text{S}_y\text{P}_z$, 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 P₂S₂ contenenti gruppi idrossimetil-fosfinici (HMP, -P(CH₂OH)₂), in grado di formare con il metallo in soluzione acquosa complessi stabili ed in alta resa del tipo [ReO₂(P₂S₂)]⁺, caratterizzati da una spiccata polarità e solubilità nel mezzo acquoso ^[21-24].

L'introduzione nello scheletro carbonioso del sistema chelante di un gruppo carbossilico ((CH₂)₄COOH) (Figura C2.8) permette l'introduzione, di una biomolecola mediante formazione di un legame carboamidico. Un primo esempio è rappresentato dai complessi [^{186/188}ReO₂(P₂S₂)]-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].

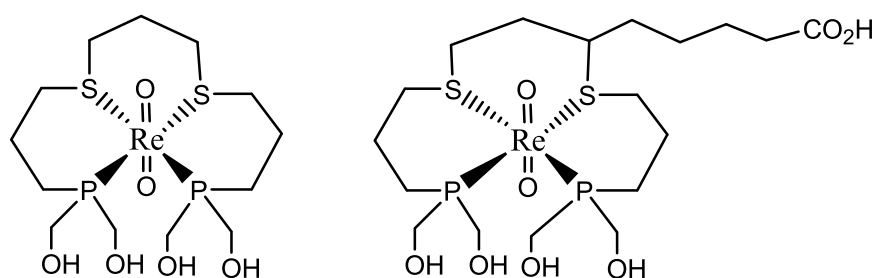


Figura C2.8. Complessi del tipo [ReO₂(P₂S₂)]⁺.

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-X-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(OH₂)₃(CO)₃]⁺ è ottenuto in alta resa per riduzione e carbonilazione di [^{186/188}ReO₄]⁻ in presenza di Na[H₃BCO₂H] e NH₃·BH₃, 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 d⁶ del metallo nello stato di ossidazione (I) in un campo ottaedrico. Studi condotti sulla reattività di *fac*-[^{186/188}Re(OH₂)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 10⁻⁵M.

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, L₂, legato covalentemente alla biomolecola (BAM) ed uno monodentato, L₁ quali imidazolo o isocianide nell'ottenimento, in alta resa, del complesso [^{186/188}Re(L₂-BAM)L₁(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 NaBH₄, 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.

C2.9 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 ¹⁸⁸Re-HEDP (idrossietilidendifosfonato) [40] e ¹⁸⁸Re-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 vettore, 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 NS₃ (T.P. Quinn, PNAS, 95, 1998; University of Missouri), (Figura C2.9); il peptide P2045 che coordina il renio, sempre con atomi N₃S, nella formazione del complesso [¹⁸⁸Re(O)(N₃S-P2045)] Neotide, in grado di legare con elevata affinità e specificità i

recettori della somatostatina sstr2 e sstr5, in Fase I di sperimentazione clinica per la terapia del tumore polmonare a piccole cellule e non [42].

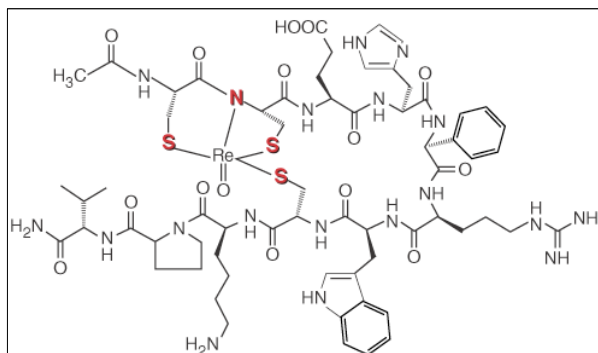


Figura C2.9. Complesso di [Re(O)-(NS₃-CCMSH)].

Nella radioimmunoterapia i pazienti ad alto rischio di leucemia mieloide o sindrome mieloidoplastica 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), ¹⁸⁸ReN-DEDC [bis(dietilditiocarbammato)], avente un core azoturo coordinato da due leganti del tipo ditiocarbammato (Figura C2.10), somministrato per iniezione arteriosa intraepatica con una miscela di acidi grassi di derivazione vegetale (lipiodol) [45, 46].

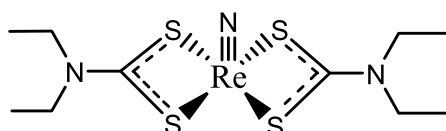


Figura C2.10. Struttura di ¹⁸⁸ReN-DEDC.

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 microsfeere 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 [¹⁸⁸ReO₄], dopo angioplastica, ottenendo una riduzione della restenosi del 40%.

C3 Parte Sperimentale

C3.1	Materiali	199
C3.2	Sintesi del legante amminodifosfinico PNP43	200
C3.3	Sintesi dei derivati di α -MSH: NAP-NS1 e NAP-NS2	203
C3.4	Sintesi dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	205
C3.5	Studi in vitro dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	207
C3.6	Biodistribuzione dei complessi <i>syn/anti</i> [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$	207
C3.7	Sintesi di [$^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})$] $^{+}$	208
C3.8	Sintesi di HOOC-PEG ₆₀₀ -DTCZ	209
C3.9	Sintesi di NOTA-NAP-NS1nc	209
C3.10	NOTA-NAP-NS1nc, marcatura con Cu-64 e Ga-68	210

C3.1 Materiali

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 "Helmoltz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazie", sito in Rossendorf, Dresda (Germania), in collaborazione con il Prof. H.-J. Pietzsch e con il Dr. S. Thieme.

$\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$ in soluzione fisiologica è stato ottenuto da un generatore $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ a umido Elumatic III di Schering.

$\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$ è eluito con soluzione 0.9% NaCl da un generatore $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Oak Ridge National Laboratories, Oak Ridge, TN).

S-metil-N-metilditiocarbazato e L-cisteina-N-Acetilato 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 gruppi fosfinici, in presenza di diossigeno atmosferico, sono facilmente ossidati a fosfinossido; tutte le reazioni sono, pertanto, condotte in atmosfera inerte di diazoto, con solventi dediossigenati prima dell'uso.

Per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastre di SiO_2 F_{254S} e C₁₈ F_{254S} (Merck). I composti non radioattivi sono stati rivelati mediante lampada UV e/o mediante reazione con I_2 . La radioattività presente sulle lastre 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 ($\lambda = 215$ nm) e un detector radioattivo Model 3200 Bioscan; precolonna a fase inversa ODS C₁₈ Vydac (4.6 x 45 mm, 5 μ m), colonna ODS C₁₈ (Vydac, 4,6 x 250 mm, 5 μ m).

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 μ m), dotato di un detector radioattivo DAD LA-480, $\lambda = 254$ 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 Bruker AMX 300, utilizzando Me₄Si come riferimento interno per ¹H ed una soluzione all'85% di H₃PO₄ come riferimento esterno per il ³¹P. I valori di chemical shifts sono espressi in ppm (δ) e sono riferiti al picco caratteristico del CHCl₃ (7.26 ppm) in CDCl₃.

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

C3.2 Sintesi del legante amminodifosfinico PNP43

In base al lavoro svolto, la procedura sintetica porta all'ottenimento del legante in soli 4 passaggi, riducendo il numero delle purificazioni intermedie e snellendo l'economia e la pratica sintetica. Eccone una dettagliata descrizione.

PREPARAZIONE BISOSTITUITO = PNP43 [(EtO)₂P(O)CH₂CH₂]₂N(CH₂CH₂OMe)

<i>Compound</i>	<i>CAS-Numer</i>	<i>MM</i>	<i>mmol</i>	<i>Eq</i>	<i>d</i>	<i>mg</i>	<i>ml</i>
Diethyl vinylphosphonate	682-30-40	164.14	5	2	1.068 g·ml ⁻¹	820.7	0.768
2-Methoxyethylamine	109-85-3	75.11	2.5	1	0.864 g·ml ⁻¹	187.77	0.217
LiClO ₄	7791-03-9	106.39	2.5	1	-	256.97	-

In un vial si lascia reagire la miscela composta da dietilvinilfosfonato (5 mmol, 820.7 mg, 768 μ l), 2-metossietilammina (2.5 mmol, 187.7 mg, 217 μ l) e LiClO₄ (2.5 mmol, 256.9 mg), a 75 °C per 24 ore. Al termine, la soluzione appare di colore giallo chiaro, di consistenza oleosa. I rapporti equivalenti indicati in tabella sono stati oggetto di un breve studio...il raddoppio degli equivalenti di LiClO₄ non porta ad un aumento di resa, così come crescere in eccesso il quantitativo di dietilvinilfosfonato.

Recupero

Si diluisce l'olio giallo con CHCl₃ (5ml x 2), portando la soluzione in imbuto separatore. Si aggiunge H₂O (5ml), avendo cura di raccogliere la parte organica in un pallone da 50 ml a 2 colli. La

frazione organica recuperata è sottoposta ad una seconda estrazione con 5 ml di H₂O. Si elimina il solvente tramite evaporatore rotante e si tira per alcuni minuti in pompa da vuoto.

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 32.847 (bisPNP43), 17.936 (dietilvinilfosfonato).

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 4.21-4.14 (m, 8H, -OCH₂CH₃); 3.94 (t, 2H, NCH₂CH₂OCH₃); 3.71 (s, 3H, NCH₂CH₂OCH₃); 3.06-2.85 (m, 6H, NCH₂CH₂OCH₃, PCH₂CH₂N); 2.12 (m, 4H, PCH₂CH₂N); 1.78 (m, 12H, -OCH₂CH₃).

Dall'analisi NMR è possibile ricavare un rapporto bisPNP43/dietilvinilfosfonato pari a 3.7 a 1.

Il prodotto bisostituito è purificato dal residuo di vinile, probabilmente anche da un resto di ammina, mediante distillazione sotto vuoto, realizzata attraverso un apparato costituito da un pallone e da una speciale coda piegata. Si immerge il pallone monocollo contenente il prodotto nel bagno e si riscalda gradualmente sino e non oltre i 90 °C (temperatura dell'olio del bagno) a 6·10⁻² torr. Una temperatura superiore sembra essere la causa di un alterazione del bisfosfonato.

RIDUZIONE

Si pesano in un pallone a 2 colli (preventivamente seccato con pistola riscaldante) da 100 ml 548.9 mg di bisostituito distillato (403.3871 Da, 1.3607 mmol). Si aggiungono 10 ml di Et₂O distillato di fresco, si raffredda qualche minuto in bagno di ghiaccio e poi tramite setto di gomma si aggiungono (in 2 minuti circa) 8.5 ml di LiAlH₄ 1M in soluzione eterea. Rapporto molare equivalente bisostituito : LiAlH₄= 1:6. Si osserva da subito sviluppo di gas e si percepisce il tipico odore di fosfina. Si toglie il ghiaccio e si lascia sotto agitazione per 60 min.

NOTA: è bene mantenere il pallone in agitazione per 60 min per avere una riduzione quantitativa del bisfosfonato.

QUENCHING

Si rimette il pallone in bagno di ghiaccio e si aggiungono goccia a goccia 3ml di una soluzione satura di Na₂SO₄ in H₂O, preventivamente degasata per 15min con N₂. Ora a temperatura ambiente si aggiunge, attraverso un imbuto a collo sufficientemente largo, Na₂SO₄ anidro solido (3-5 gr) (tenuto in essiccatore). Dopo che il solido all'interno della miscela ha assunto, sotto agitazione, un aspetto polverulento si cessa l'aggiunta (nel frattempo a causa della presenza del flusso di N₂ può essere necessario aggiungere dell'altro Et₂O (10ml).

Si filtra sotto N₂ (in un pallone a 2 colli da 100ml preventivamente pesato con i corrispondenti 2 tappi ed un'adeguata ancorotta), su speciale filtro a 2 coni maschi. Si procede per un totale di 4 lavaggi da 10 ml di Et₂O ciascuno. E' importante rispettare il numero dei lavaggi per estrarre il massimo di fosfina ridotta. Un eventuale riscontro di bassa resa di reazione richiede un rispetto del numero dei lavaggi. Si evapora l'Et₂O con soffio di N₂ ed al termine si tira per almeno 30 min. in pompa da vuoto.

Resa: 219.1 mg di (H₂PCH₂CH₂)₂NCH₂CH₂OCH₃ corrispondenti a 1.1231 mmol. Resa di riduzione: 82.5%.

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) = -145.103

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 3.51 (t, 2H, NCH₂CH₂OCH₃); 3.39 (s, 3H, NCH₂CH₂OCH₃); 2.97 (t, 2H, H₂P-); 2.69 (m, 4H, PCH₂CH₂N); 2.32 (t, 2H, H₂P-); 1.38 (m, 4H, PCH₂CH₂N).

NOTA: una volta isolato il prodotto ridotto, è bene procedere alla fase sintetica successiva senza indugiare oltre. La fosfina primaria è abbastanza stabile in soluzione eterea, ma diventa facilmente

ossidabile una volta rimosso totalmente il solvente anche se mantenuta in ambiente anaerobico. In un tentativo di sintesi, il prodotto lasciato nel pallone, seppur sotto N₂, per una notte non ha reagito portando all'ottenimento del prodotto finale (³¹P NMR CDCl₃ = 26.271 ppm, al termine della reazione di alchilazione, probabilmente non avvenuta!).

ALCHILAZIONE

A T° ambiente, si aggiungono 10ml di THF anidro (distillato di fresco) all'(H₂PCH₂CH₂)₂NCH₂CH₂OCH₃ (219.1 mg, 1.1231 mmol) e con siringa di plastica tramite un setto di gomma si gocciolano 3.1 ml di n-BuLi 1.6M (rapporto 1:4+10%). Il colore della soluzione vira progressivamente dal giallo al verde cupo intenso. Dopo 15 min si porta il pallone a -78 °C con acetone e azoto liquido. Si aggiungono in 30 minuti con imbuto gocciolatore la dose di CH₃I (0.300 ml, 4.49 mmol), preventivamente diluita in 10 ml di THF. Terminata l'aggiunta, si attende che la temperatura raggiunga circa i -40, -20 °C per procedere all'aggiunta di acqua degasata per la neutralizzazione dell'alchilante.

NOTA: questa operazione va eseguita di seguito alla precedente ed è un passaggio chiave per impedire la formazione di una serie di prodotti secondari collaterali responsabili di un crollo della resa di reazione.

RECUPERO

Si evapora con flusso di N₂ la soluzione a circa 1/3 del volume iniziale. Si raffredda con bagno di ghiaccio e si aggiunge, goccia a goccia, H₂O degasata (5 ml). Si formano due strati: quello organico soprastante incolore e quello sottostante acquoso giallo (colorazione riconducibile alla presenza di ioduri). Si aggiungono 10 ml di Et₂O degasato e si porta in imbuto separatore a due colli (preventivamente "flussato" con N₂), mediante un ago flessibile per evitare il contatto con l'aria.

Sempre in atmosfera di N₂ si recupera lo strato acquoso sottostante in un altro imbuto separatore e lo si tratta con altri 10 ml di Et₂O. Si riuniscono le fasi eteree dei due imbuto separatori in un unico pallone da 100 ml flussato e contenente Na₂SO₄ anidro preventivamente tirato per alcuni minuti in pompa da vuoto.

Dopo circa 10 minuti si filtra la soluzione eterea in un pallone e si rilava il solido con Et₂O anidro (2 x 10 ml). Si concentra prima con flusso di N₂ e poi si tira in pompa da vuoto.

Resa: 223 mg PNP43. MM_{PNP43}=251.29 Da, corrispondenti a 0.887 mmol. *RESA*=79%.

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) = -52.830

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 3.51 (t, 2H, NCH₂CH₂OCH₃); 3.39 (s, 3H, NCH₂CH₂OCH₃); 2.71 (m, 6H, PCH₂CH₂N, NCH₂CH₂OCH₃); 1.43 (m, 4H, PCH₂CH₂N); 1.08 (s, 12H, -P(CH₃)₄).

ESI-MS: 252.1602 (M+H⁺)

NOTA: nelle preparazione riuscite è sempre presente un segnale di scarsa importanza al ³¹P a -42.94~. Per completezza si riportino i seguenti valori di chemical shift per il segnale del fosforo: 26.271 (fosfina "ridotta" ossidata) e 54.586 (PNP43 ossidata).

Lo schema completo di sintesi e di seguito riportato (Figura C3.1).

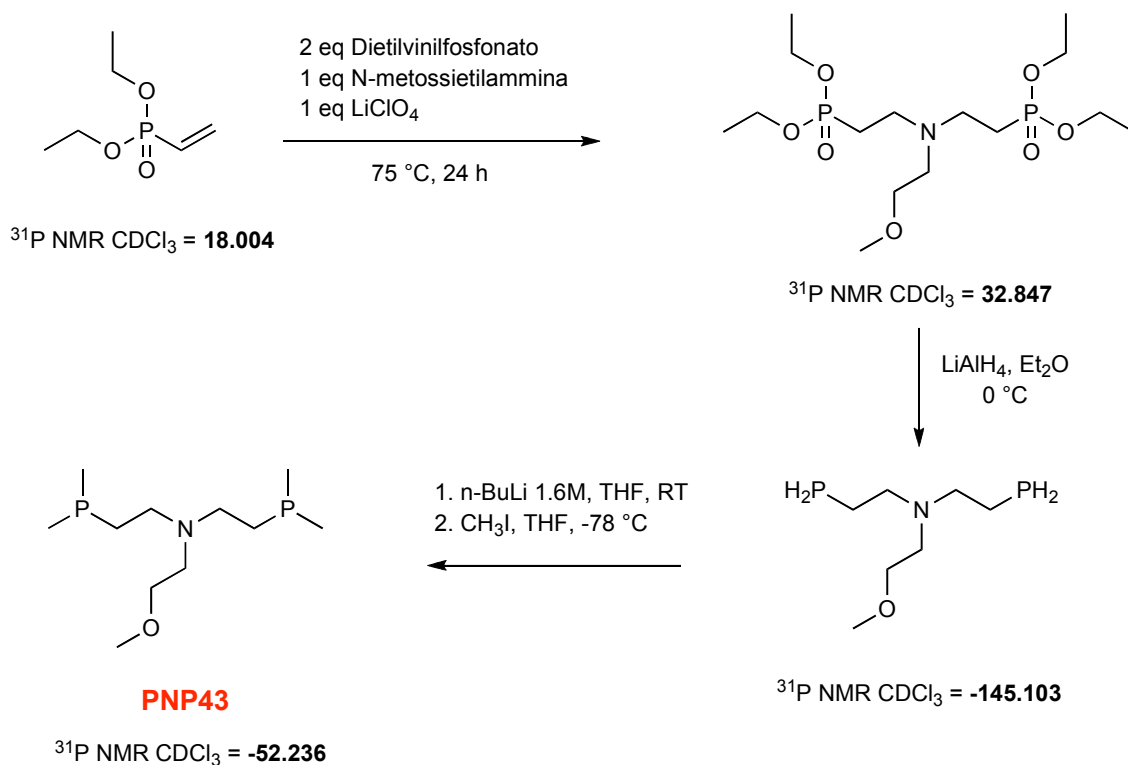


Figura C3.1. Schema di sintesi per il legante amminodifosfinico PNP43.

C3.3 Sintesi dei derivati di α -MSH: NAP-NS1 e NAP-NS2

Sono stati sintetizzati due derivati di α -MSH: NAP-NS1 e NAP-NS2. Oltre a questi, è stata inoltre sintetizzata una terza sequenza, analoga a NAP-NS1, ma priva dell'amminoacido Cys. I peptidi sono stati realizzati in collaborazione con il Dr. Paolo Ruzza dell'ICB-CNR di Padova.

Sintesi di **NAP-NS1**: H-Cys-Ahx- β Ala-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂.

Il peptide lineare H-Cys-Ahx- β Ala-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂ è sintetizzato a partire da 0.12 mmol di resina Rink Ammide MBHA-resina (loading 0.73 mmol/g, 136.98 mg), secondo le consuete procedure di sintesi in fase solida seguendo il protocollo Fmoc, che prevede l'impiego di α -amminoacidi protetti in modo ortogonale. Si opera la rimozione del peptide con miscela di TFA al 95%, TIPS al 2%, Anisolo al 2%, H₂O all'1% che contemporaneamente causa la rimozione delle protezioni dei gruppi funzionali in catena laterale. Si ottengono 112.63 mg di peptide (PM=1214.59), con una resa del 77.27%.

25.02 mg del peptide grezzo sono stati purificati tramite HPLC preparativa su colonna Vydac C18 218TP1022, 10 μ , 300 Å, 25.0 \times 22.0 mm. Gli eluenti impiegati sono A: 0.05% TFA in H₂O, B: 0.05% TFA in CH₃CN/H₂O (9:1 v/v). Flusso: 12ml/min, λ =216 nm. Eluizione isocratica per 3 minuti al 20% di B, poi gradiente lineare dal 20% al 50% di B in 30 minuti.

Rt=16 minuti. $[\text{M}+\text{H}]^+=1215.5\text{ m/z}$; $[\text{M}+\text{H}]^{2+}=608.8\text{ m/z}$; $[\text{M}+\text{H}]^{3+}=406.1\text{ m/z}$.

Sono stati ottenuti 19.57 mg di peptide puro con una resa del 78.28%.

Sintesi di **NAP-NS1nc**: H-Ahx- β Ala-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂.

Il peptide lineare H-Ahx- β Ala-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂ è sintetizzato a partire da 0.06 mmol di resina Rink Ammide MBHA-resina (loading 0.73 mmol/g, 87.05 mg), secondo le consuete procedure di sintesi in fase solida seguendo il protocollo Fmoc, che prevede l'impiego di α -amminoacidi protetti in modo ortogonale. Si opera la rimozione del peptide con miscela di TFA al 95%, TIPS al 2%, Anisolo al 2%, H₂O all'1% che contemporaneamente causa la rimozione delle protezioni dei gruppi funzionali in catena laterale. Si ottengono 88.68 mg di peptide (PM=1214.59), con una resa del 91.36%.

La purificazione del peptide grezzo è avvenuta tramite HPLC preparativa su colonna Vydac C18 218TP1022, 10 μ , 300 Å, 25.0 \times 22.0 mm. Gli eluenti impiegati sono A: 0.05% TFA in H₂O, B: 0.05% TFA in CH₃CN/H₂O (9:1 v/v). Flusso: 12ml/min, λ =216 nm. Eluizione isocratica per 3 minuti al 20% di B, poi gradiente lineare dal 20% al 50% di B in 30 minuti.

Rt=13.5 minuti. [M+H]⁺=1112.59.

Sono stati ottenuti 53.56 mg di peptide puro con una resa del 60.39%.

Sintesi di **NAP-NS2**: H-Cys-Ahx- β Ala-c[Lys-Glu-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Glu]-Arg-Pro-Val-NH₂.

Il peptide ciclico H-Cys-Ahx- β Ala-c[Lys-Glu-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Glu]-Arg-Pro-Val-NH₂ è sintetizzato a partire da 0.06 mmol di resina Rink Ammide MBHA-resina (loading 0.73 mmol/g, 87.84 mg), secondo le consuete procedure di sintesi in fase solida seguendo il protocollo Fmoc, che prevede l'impiego di α -amminoacidi protetti in modo ortogonale.

Per la contemporanea rimozione dei gruppi protettori -Alloc e -Allyl alla funzione amminica e carbossilica dei residui Lys⁴ e Glu¹⁰, il peptide ancorato alla resina e completamente protetto, è sospeso in DCM in atmosfera di argon, in presenza di 1.50 mmol (0.18 ml) di PhSiH₃ e di 0.015 di Pd(PPh₃) (17.03 μ g). La reazione è lasciata decorrere sotto agitazione per 45 minuti. Dopo eliminazione dell'eccesso di reagenti per filtrazione, la resina è lavata con DCM e si ripete la procedura sopra descritta.

La reazione di ciclizzazione tra le catene laterali dei residui di Lys⁴ e Glu¹⁰ sul peptide ancorato alla resina è condotta in NMP (N-metil pirrolidone) in presenza di 6 equivalente di PyBop (193.50 mg), 6 equivalenti di HOBt (50.25 mg) e 12 equivalenti di DIEA (0.13 ml). La miscela di reazione è mantenuta in agitazione per un'ora al termine della quale si allontanano i reattivi in eccesso per filtrazione. La resina è quindi lavata con NMP e DCM.

0.03 mmol (95.81 mg) di peptide ciclico condensati alla resina sono trattati con opportuna miscela di sblocco costituita da TFA al 95%, TIPS al 2%, Anisolo al 2%, H₂O all'1% per 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo filtrazione della resina il peptide grezzo è precipitato con Et₂O, ottenendo 17.89 mg di prodotto grezzo, con una resa del 36.12%.

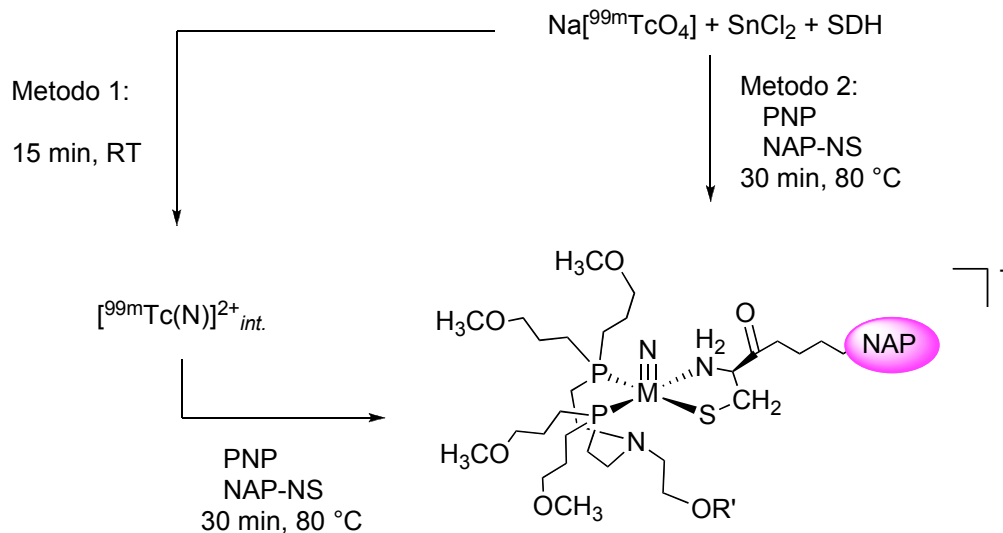
La purificazione del peptide grezzo è avvenuta tramite HPLC preparativa su colonna Vydac C18 218TP1022, 10 μ , 300 Å, 25.0 \times 22.0 mm. Gli eluenti impiegati sono A: 0.05% TFA in H₂O, B: 0.05% TFA in CH₃CN/H₂O (9:1 v/v). Flusso: 12ml/min, λ =216 nm. Eluizione isocratica per 3 minuti al 17% di B, poi gradiente lineare dal 17% al 30% di B in 26 minuti.

Rt=21 minuti. [M+H]⁺=1651.9 m/z; [M+H]²⁺=551.6 m/z.

Sono stati ottenuti 7.47 mg di peptide puro con una resa del 41.75%.

C3.4 Sintesi dei complessi *syn/anti* [^{99m}Tc(N)(PNP)(NAP-NS)]⁺

La preparazione degli eterocomplessi dissimetrici del tipo *syn,anti*-[^{99m}Tc^V(N)(PNP)(NAP-NS)]⁺ è condotta in soluzione acquosa seguendo due differenti vie sintetiche (Figura C3.2).



Schema 1. Vie di sintesi (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≡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 SnCl₂ (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 Soluzione Fisiologica) quale donatore di gruppi nitruro. Nel secondo passaggio sono contemporaneamente aggiunti alla miscela di azoturo-complessi il legante amminodifosfinico PNP (1.0 mg sospeso in 0.5 ml di una soluzione ottenuta disciogliendo 2 mg di γ -ciclodestrina in 1 ml di Soluzione Fisiologica), il peptide NAP-NS (0.20 mg - 0.1 mg disciolti in 0.20 ml - 0.1 ml di HCl 10⁻² N) e 0.200 ml di tampone fosfato 0.2 M, pH=7.4). La miscela è posta ad incubare a 80 °C per 30 minuti. Il pH a fine reazione è \approx 7.0.

La seconda via sintetica (Metodo 2) prevede un singolo passaggio, in cui una soluzione di Na[^{99m}TcO₄] (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 Soluzione Fisiologica), SnCl₂ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), PNP (1.0 mg sospeso in 0.5 ml di una soluzione ottenuta disciogliendo 2 mg di γ -ciclodestrina in 1 ml di Soluzione Fisiologica), il peptide NAP-NS (0.20 mg - 0.1 mg disciolti in 0.20 ml - 0.1 ml di HCl 10⁻² N) e 0.200 ml di tampone fosfato 0.2 M, pH=7.4). La miscela è posta ad incubare a 80 °C per 30 minuti. Il pH a fine reazione è \approx 7.0.

I mg di peptide NAP-NS necessari per l'ottenimento di ciascun complesso, la resa radiochimica, RCY, così come i risultati ottenuti mediante caratterizzazione HPLC, nonché le condizioni di analisi, sono riassunti in Tabella C3.1.

Composto	Rt, min	RCY	mg NAP-NS	mg PNP	logP	Metodo
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})]^+$	26.8 30.4	91.00	0.100	1	-1.436	1
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS1})]^+$	14.9 18.7	90.05	0.075	0.250	-1.524	2
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$	13.1 17.8	94.28	0.100	0.250	-1.736	3
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$	13.70 18.17	60.30 25.54	0.075	1	-1.481	4
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS2})]^+$	11.00 13.23	46.22 26.25	0.020	0.450	-1.653	5
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})]^+$	15.49 18.86	65.71 26.84	0.020	0.250	-1.592	6

Tabella C3.1. Caratterizzazione HPLC dei complessi ottenuti.

Le analisi HPLC sono state condotte su precolonna Reverse Phase Vydac 218TP C18 (5 μm 4,6 x 45 mm) e colonna Vydac 218TP C18 (5 μm 4.6 x 250 mm). Flusso di 1 ml/min. I metodi cromatografici sono i seguenti

Metodo 1: 0-35 min, B=28%; 35-36 min, B=90%; 36-41 min, B=90%; 41-42 min, B=28%.

Metodo 2: 0-3 min, B=25%; 3-25 min, B=35%; 25-26 min, B= 90%; 26-30 min, B=90%; 30-31 min, B=25%.

Metodo 3: 0-1 min, B=15%; 1-11 min, B=23%; 11-31 min, B=23%; 31-32 min, B=90%; 32-37 min, B=90%; 37-38 min, B=15%; 38-40 min, B=15%.

Metodo 4: 0-22 min, B=25%; 22-23 min, B=90%; 23-28 min, B=90%; 28-29 min, B=25%; 29-30 min, B=25%.

Metodo 5: 0-15 min, B=23%; 15-17 min, B=28%; 25-26 min, B=90 min; 26-31 min, B=90%; 31-32 min, B=23%; 32-35 min, B=23%.

Metodo 6: 0-1 min, B=18%; 1-21 min, B=25%; 21-22 min, B=90%; 22-27 min, B=90%; 27-30 min, B=18%;

Per la purificazione, la miscela di reazione è diluita con 8 ml di H₂O e caricata su una colonna Sep-Pak RP-C18 precedentemente attivata con 5 ml di EtOH 95% e condizionata con 5 ml di H₂O.

Per la purificazione della miscela di reazione di $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3,10})(\text{NAP-NS1,2})]^+$ si lava la Sep-Pak in successione con 20 ml H₂O 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1,2})]^+$ si lava la colonna in successione con 20 ml H₂O, 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.

C3.5 Studi in vitro dei complessi *syn/anti* [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$

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 [$^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$ purificato (100 μL) è aggiunta una soluzione acquosa (50 μL) di Cisteina cloridrato a diverse concentrazioni (1 mM e 10 mM) oppure di Glutazione (10 mM). Le miscele sono incubate a 37 °C per 24 ore. In parallelo è 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 presentati nel capitolo Risultati e Discussione.

STUDI DI STABILITÀ IN SIERO UMANO, SIERO DI RATTO E OMOGENATO DI FEGATO DI RATTO.

Frazioni di complesso purificato [$^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$ (50 μL) o alternativamente sono aggiunte a:

- soluzione salina (950 μL);
- siero umano (450 μL);
- siero di mouse (450 μL);
- omogenato di fegato di ratto (450 μL);
- Tampone fosfato 0.2 M, pH=7.4.

Le miscele sono 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.

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 presentati nel capitolo Risultati e Discussione.

C3.6 Biodistribuzione dei complessi *syn/anti* [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$

Studi di biodistribuzione *ex vivo* degli eterocomplessi *syn,anti*-[$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$ sono stati eseguiti sui prodotti purificati ed opportunamente diluiti con una soluzione fisiologica.

Studi di biodistribuzione dei complessi [$^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})$] $^{+}$ sono stati eseguiti sui prodotti purificati ed opportunamente diluiti con una soluzione fisiologica.

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

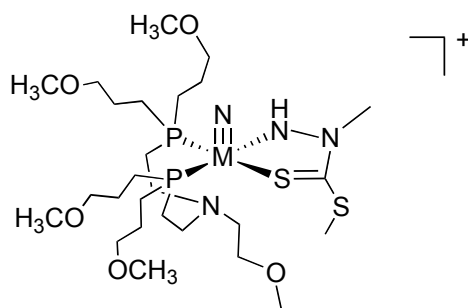
0.1 ml (contenenti 10 μ Ci) della soluzione contenente il complesso marcato e purificato sono iniettati attraverso la vena giugulare, chirurgicamente esposta.

Gruppi di animali (n=2) 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:

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

C3.7 Sintesi di $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})]^+$



Ad un vial preventivamente deossigenato con N_2 e contenente 5mg di EDTA, 5 mg di Mannitolo ed 1 mg di SnCl_2 , sono aggiunti 0.6 ml di HCl 0.1 M ed 1ml di $\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$ (~150 MBq). Il vial è così mantenuto a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente, sono aggiunti 0.2 mg di HDTCZ disciolti in 0.2 ml di EtOH; la miscela è mantenuta a temperatura ambiente per ulteriori 45 min. È aggiunto 1 mg di PNP3 disciolto in 0.1 ml di EtOH. Il vial è così mantenuto a 100 °C per 30 min.

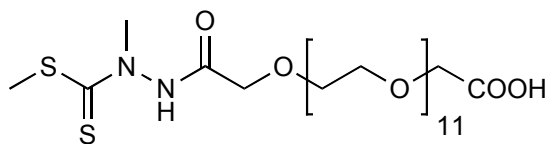
Alternativamente, ad un vial preventivamente deossigenato con N_2 e contenente 5mg di EDTA, 5 mg di Mannitolo ed 1 mg di SnCl_2 , sono aggiunti 0.6 ml di HCl 0.1 M ed 1ml di $\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$ (~150 MBq). Il vial è così mantenuto a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente, sono aggiunti 0.2 mg di HDTCZ disciolti in 0.2 ml di EtOH ed 1 mg di PNP3 disciolto in 0.1 ml di EtOH. Il vial è così mantenuto a 100 °C per 30 min.

Il prodotto è stato caratterizzato e purificato tramite HPLC analitico Knauer Eurospher 100, colonna C18 (5 μm , 250 \times 4.0 mm), flusso 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Eluente A: H_2O , 0.1% TFA; B: ACN, 0.1% TFA. Gradiente: 0 min, B=0%; 2 min, B=0%; 7 min, B=52%; 12 min, B=63%; 13.5, B=68%; 18.5 min, B=80%; 27 min, B=80%; 28 min, B=0%.

R_t =18-20 minuti.

La resa radiochimica (RCY), valutata tramite HPLC, è sempre risultata essere >98%.

C3.8 Sintesi di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ

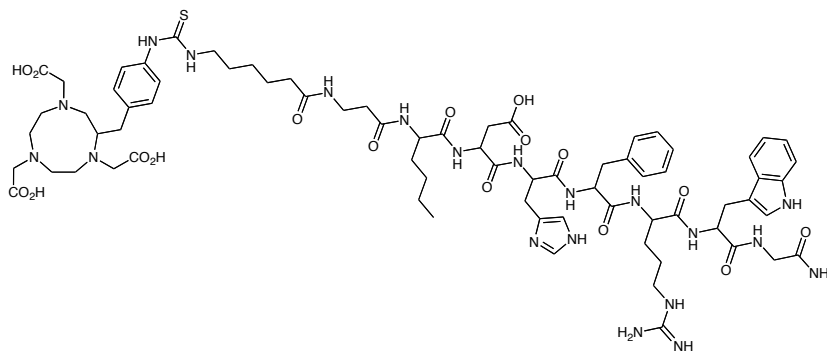


Ad una soluzione di HDTCZ (544 mg, 4.00 mmol) in CH₂Cl₂ (5ml), si aggiungono, sotto agitazione magnetica, polyethyleneglycol 600 diacido (1.2 g, 2.00 mmol), N,N-diciclohexylcarbodiimide (DCC, 413 mg, 2.00 mmol) e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 24 mg, 0.20 mmol). Le aggiunte devono essere eseguite nell'ordine riportato. Un precipitato bianco è osservabile dopo 5 min. Alla miscela è successivamente aggiunto CH₃CN anidro (5ml). La miscela è mantenuta in agitazione per 2 giorni, a temperatura ambiente. Infine si concentra. Il residuo è ripreso in CH₂Cl₂ (100ml) e lavato con H₂O (2×15 ml). La fase organica è anidrificata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata restituendo un grezzo da partizionare in Et₂O (100ml) e H₂O (100 ml). La fase acquosa è estratta con Et₂O (2×50ml), concentrata, ottenendo così l'addotto HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ. La purificazione sarà eseguita tramite HPLC preparativa.

Il grezzo HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ è stato *analizzato* tramite HPLC Analitico KNAUER Smartline HPLC system tower composto da: degasatore, sistema quaternario di pompe, UV detector PDA e RI detector, colonna C18 Eurospher-100 (250 mm × 4,5 mm), flusso 1 ml·min⁻¹, λ=216 nm, 254 nm (DA); *purificato* tramite HPLC Preparativo, la colonna è perfusa ad una velocità di flusso di 25 ml·min⁻¹. Per la purificazione HPLC, la fase mobile A è composta da H₂O 0.1% TFA, mentre la fase mobile B è costituita da CH₃CN 0.1% TFA. Un gradiente cromatografico della durata di 35 minuti garantisce la purificazione del prodotto: 0% B a 50% in 25 minuti and dal 50% B al 100% B in 10 min.

Rt=24.067 min. MALDI-TOF: (centro di una distribuzione Gaussiana), [M+Na]⁺= 759.977 m/z.

C3.9 Sintesi di NOTA-NAP-NS1nc



In una eppendorf da 1 ml, 2.25 mg di NAP-NS1nc sono disciolti in 310 µl di DMF anidra. Si aggiungono 1.28 mg di p-SCN-Bn-NOTA (1 eq) disciolti in 90 µl di DMF anidra, seguiti da 10 µl di trietilammina (TEA). La miscela è mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per una notte. Il quenching della reazione avviene per diluizione del volume organico con 500 µl H₂O. Il coniugato NAP-NS₁-NOTA è purificato per RP-C18 HPLC.

La caratterizzazione HPLC è stata eseguita tramite HPLC analitico, colonna Eurospher 100 (250mm×4,5 mm), flusso 1 ml·min⁻¹, λ=216 nm, 254 nm (DA). La purificazione HPLC preparativa è stata eseguita tramite HPLC Semi-preparativa, colonna Eurospher-100 (250×8,5 mm), flusso 2,1

ml·min⁻¹, λ=216 nm. Eluente A: H₂O, 0.05% TFA; B: CH₃CN, 10% H₂O, 0.05% TFA. Programma gradiente: 0 min, B=20%; 3 min, B=20%; 33 min, B=50%; 34 min, B=100%; 39 min, B=100%; 40 min, B= 20%; 42 min, B=20%.

Rt=21.5 minuti (analitico); 23-26 min (semi preparativo).

MALDI-TOF: [M+H]⁺=1563.75

Dopo la purificazione si sono ottenuti 720 µg, con una resa del 21.43%.

C3.10 NOTA-NAP-NS1nc, marcatura con Cu-64 e Ga-68

L'addotto NOTA-NAP-NS1nc è stato marcato con ⁶⁴Cu e ⁶⁸Ga.

In una eppendorf da 1 ml, 1 µg di NOTA-NAP-NS1nc disciolto in 1 µl di H₂O sono diluiti con 989 µl di tampone MES 0.1M, pH=6.5. Successivamente si aggiungono 50 µl di ⁶⁴Cu (~100 MBq, 5 h da EOB). La reazione si può considerare conclusa dopo 30 minuti, avendo cura che la temperatura non scenda al di sotto dei 30 °C.

La caratterizzazione HPLC è stata eseguita tramite HPLC analitico, colonna Eurospher 100 (250mm×4,5 mm), flusso 1 ml·min⁻¹, λ=216 nm, 254 nm (DA). Eluente A: H₂O, 0.05% TFA; B: CH₃CN, 10% H₂O, 0.05% TFA. Programma gradiente: 0 min, B=20%; 3 min, B=20%; 33 min, B=50%; 34 min, B=100%; 39 min, B=100%; 40 min, B= 20%; 42 min, B=20%.

Rt=15.4 minuti. RCY>97%.

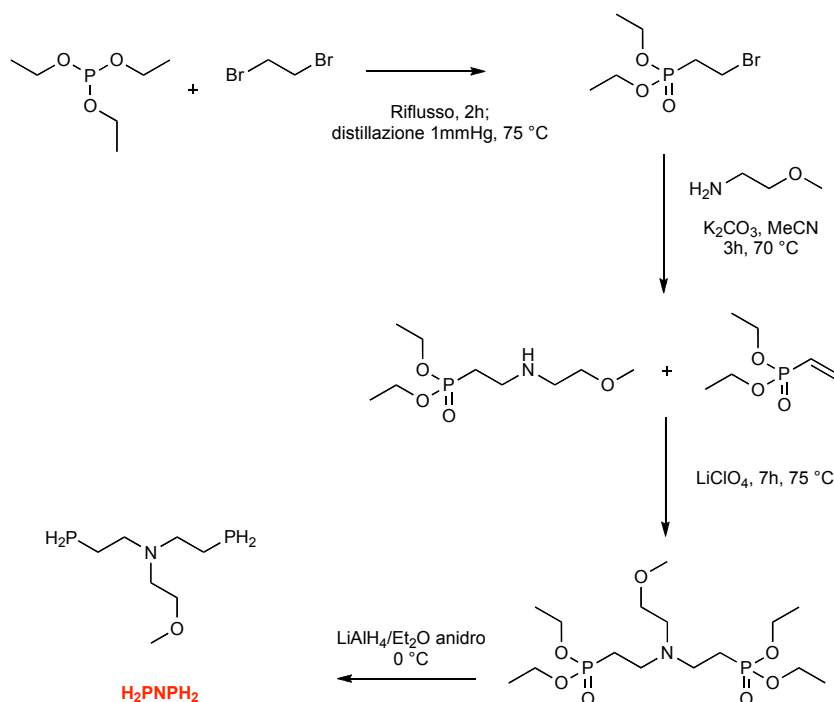
In una eppendorf da 1 ml, 1 µg di NOTA-NAP-NS1nc disciolto in 1 µl di H₂O sono diluiti con 100 µl di tampone MES 1M, pH=6.5. Successivamente si aggiungono 25 µl di ⁶⁸Ga (~115 MBq). Dopo 15 minuti, mantenendo l'eppendorf a temperatura ambiente, si aggiungono 20 µl Na₂EDTA 7.5 mM. La reazione si può considerare conclusa dopo 15 minuti, avendo cura che la temperatura non scenda al di sotto della temperatura ambiente.

La caratterizzazione HPLC è stata eseguita tramite HPLC analitico, colonna Eurospher 100 (250mm×4,5 mm), flusso 1 ml·min⁻¹, λ=216 nm, 254 nm (DA). Eluente A: H₂O, 0.05% TFA; B: CH₃CN, 10% H₂O, 0.05% TFA. Programma gradiente: 0 min, B=20%; 3 min, B=20%; 33 min, B=50%; 34 min, B=100%; 39 min, B=100%; 40 min, B= 20%; 42 min, B=20%.

Rt=20.2 minuti. RCY>99%.

C4 Risultati e discussione

La presente sezione si apre con la messa a punto di una via di sintesi per l'ottenimento di leganti di tipo PNP alternativa e più vantaggiosa rispetto alla procedura classica, che prevedeva l'utilizzo di reattivi di Grignard e condizioni di reazione di difficile gestione. Lo schema sottostante di sintesi rappresenta lo stato dell'arte relativamente all'ottimizzazione sintetica di leganti ammino alchilfosfinici.



E' interessante notare l'utilizzo di dietilfosfonilvinile (prodotto per eliminazione), nel penultimo passaggio sintetico per raggiungere la completa alchilazione dell'azoto. Il dietilfosfonil bromuro non è infatti in grado di portare a compimento la medesima reazione descritta, rendendo così indispensabile un secondo alchilante e determinando, collateralmente, l'aggravarsi dell'economia sintetica con l'aggiunta di un ulteriore passaggio.

Verificato sperimentalmente che il dietilfosfonilvinile è in grado di reagire con un'ammina primaria per formare il prodotto monosostituito si deduce che in opportune condizioni di reazione e in presenza di un catalizzatore la reazione tra ammina e dietilfosfonilvinile può portare alla formazione del prodotto bisostituito.

L'addizione di Michael¹, applicata agli esteri dell'acido acrilico e varie ammine primarie, anche alifatiche, in presenza dell'acido di Lewis $LiClO_4$ come catalizzatore congiunta alla analogia strutturale tra l'etilacrilato e il dietilfosfonilvinile costituiscono il fondamento teorico per la validazione di una procedura sintetica in cui in un solo passaggio sia possibile ottenere la completa alchilazione dell'azoto. La reazione prevede la totale assenza di solventi nell'ambiente di reazione e tempi ridottissimi.

¹ Najmedin Azizi and Mohammad R. Saidi. Tetrahedron 60, 383-387, (2004).

Le reazioni tra dietilfosfonilvinile e le metil-, etil-, metossietil-, etossietil-ammina in rapporto stechiometrico 2:1, in presenza di LiClO₄ (1 equivalente), condotte in vial chiuso, senza alcun solvente, alla temperatura di 75 °C per circa 24 ore hanno dato tutte il relativo prodotto bisostituito, in alta resa con un tasso di conversione del dietilfosfonilvinile oltre il 90%. Poiché quest'ultimo è basso bollente, la piccola quantità non reagita può essere facilmente allontanata per aspirazione in pompa da vuoto.

In base al lavoro svolto, la procedura sintetica porta all'ottenimento del legante in soli 4 passaggi, come descritto nella Parte Sperimentale C3, riducendo il numero delle purificazioni intermedie e snellendo l'economia e la pratica sintetica. Lo spettro di massa ESI-MS⁺ mette in risalto come la specie chimica corrispondente al legante difosfinamminico PNP43 si ottenga in alta resa e purezza significativa.

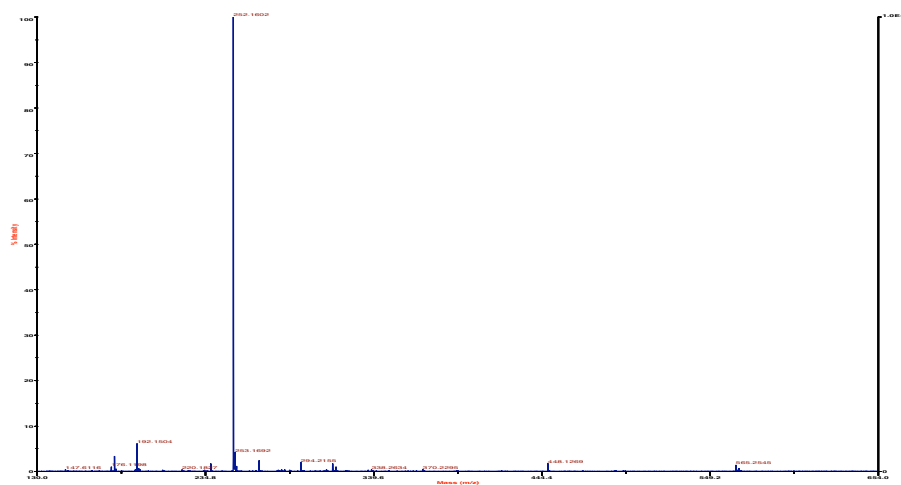
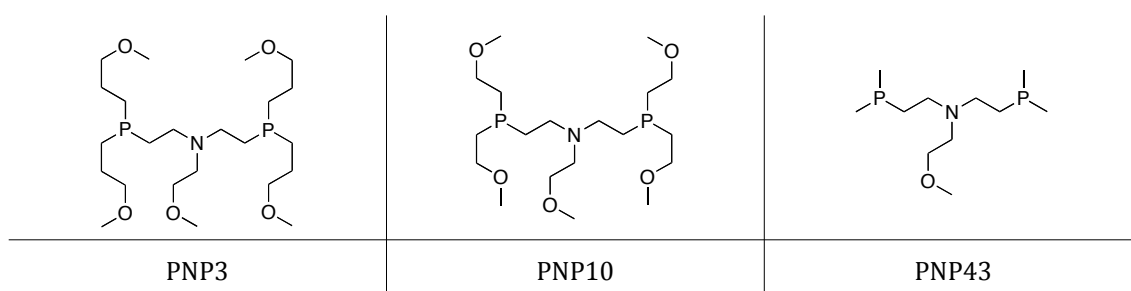


Figura C4.1. Spettro ESI-MS⁺, picco dello ione molecolare PNP43+H⁺

I leganti aminodifosfinici utilizzati sono stati PNP3, PNP10 e PNP43, quest'ultimo progettato e sintetizzato con lo scopo di aumentare l'idrofilia del complesso disimmetrico finale e modularne quindi il profilo farmacocinetico in vivo.



Il peptide lineare NAP-NS1 ed il peptide ciclico NAP-NS2 sono stati sintetizzati su fase solida, impiegando il protocollo Fmoc. Il protocollo Fmoc standard prevede l'impiego di AA protetti alla funzione -amminica con il residuo Fmoc ed alle funzioni in catena laterale con residui rimovibili in condizioni ortogonali rispetto allo Fmoc e di HBTU/HOBt come attivatori della funzione carbossilica. Il metodo è stato opportunamente modificato per assicurare l'acilazione quantitativa delle funzioni amminiche primarie delle lisine. La sintesi dei peptidi è stata realizzata impiegando la resina Fmoc-Cys-(Trt)-Rink Ammide MBHA.

Le due sequenze peptidiche, entrambe in possesso della sequenza minima per il riconoscimento e l'interazione recettoriale -His-(D)-Phe-Arg-Trp-, sono state selezionate per le note affinità e selettività per i recettori MC1 (NAP-NS2>NAP-NS1, *teorico*), con lo scopo di dimostrare l'applicabilità del metodo del frammento metallico alla marcatura di molecole biologicamente attive (quali peptidi), aventi un *target* recettoriale.

Dai dati in letteratura prodotti da comparazioni dell'affinità di analoghe sequenze peptidiche nella loro conformazione lineare oppure ciclica, emerge chiaramente come un peptide ciclico risulti più affine al recettore rispetto alla stessa sequenza nella variante lineare. Da questa osservazione nasce l'intuizione di sviluppare per questi studi una sequenza lineare, NAP-NS1, ed una sequenza ciclica, NAP-NS2, entrambe portanti la sequenza immancabile per il riconoscimento al recettore MC1: -His-(D)-Phe-Arg-Trp-.

Pertanto, entrambe le molecole sono state derivatizzate all'estremità amminica con la sequenza Cys-Ahx-βAla (Ahx: acido ε-ammino esanoico, βAla: β Alanina). I due amminoacidi appartenenti alla serie degli amminoacidi innaturali sono stati scelti quali spaziatori tra l'agente chelante bifunzionale, la Cisteina, ed il peptide, al fine di minimizzare possibili perturbazioni nel riconoscimento recettoriale. La Cisteina, avente i gruppi NH₂ 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].

I complessi del tipo *syn/anti* [^{99m}Tc(N)(PNP)(NAP-NS)]⁺ sono stati ottenuti 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 ottenuto il core nitrato, dopo 30 minuti a temperatura ambiente, per riduzione del pertecnetato sodico con cloruro di stagno (II), in presenza di succinil diidrazide, quale donatore di gruppi nitrato, si aggiungono contemporaneamente il legante amminodifosfinico sospeso in una soluzione acquosa di γ-ciclodestrina e l'analogo peptidico disciolto in una soluzione di HCl 10⁻² N (la soluzione acida e riducente per acido cloridrico previene l'ossidazione del gruppo -SH del peptide a gruppo disolfuro -S-S-). La miscela è mantenuta ad 80 °C per 30 minuti.

Una via di sintesi alternativa, indicata come Metodo 2 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 seguito, analisi cromatografiche HPLC hanno dimostrato che si ottiene sempre una specie dissimmetrica bisostituita del tipo [^{99m}Tc(N)(PNP)(NAP-NS)]⁺, caratterizzata dalla presenza dei due diversi leganti bidentati, l'uno peptidico, l'altro amminodifosfinico, coordinanti il core azoturo, mentre non si osservano tracce delle specie simmetriche bisostituite [^{99m}Tc(N)(NAP-NS)₂] e [^{99m}Tc^V(N)(PNP)₂]²⁺.

Con 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 anziché 3-metossipropilici su ambedue gli atomi di P(III), è stato possibile sintetizzare il complesso [^{99m}Tc(N)(PNP43)(NAP-NS1,2)]⁺, dotato di una maggiore idrofilia.

La tabella seguente riporta i cromatogrammi dei prodotti considerati in questo studio.

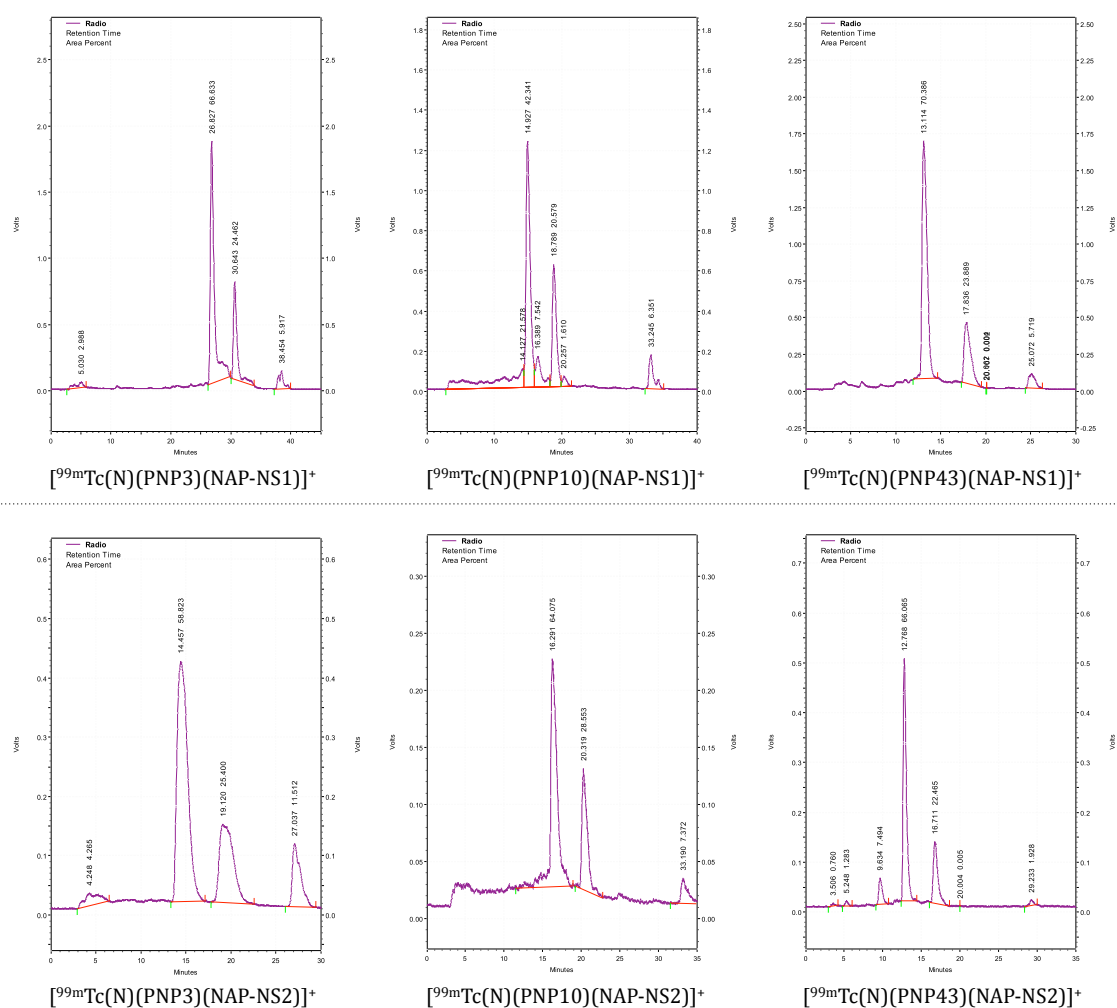


Figura C4.2. Traccianti Radio-HPLC dei complessi oggetto di questo studio.

Le tecniche HPLC hanno rivelato l'esistenza di due distinti composti radioattivi in rapporto stechiometrico approssimativamente 60:40, che si ipotizza corrispondano alle forme isomeriche *syn* ed *anti* degli eterocomplessi $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3/43})]^+$, generate dalla diversa orientazione del gruppo carbossilico della Cisteina rispetto al piano individuato dal gruppo nitrato.

La risoluzione dei due diastereoisomeri mediante HPLC permette sì l'isolamento di ciascun composto, ma ciascun isomero geometrico tende a temperatura ambiente ed in soluzione a generare l'isomero deficitario tendendo nel tempo a riequilibrarsi con esso. La separazione non è quindi stata effettuata, pertanto, la miscela contenente entrambi gli isomeri, dopo purificazione, è stata utilizzata per effettuare gli studi successivi.

Nella preparazione di radiofarmaci recettore-specifici, l'impiego di elevate quantità di peptide può portare, in vivo, ad una saturazione dei siti recettoriali e, di conseguenza, alla diminuzione della quantità di peptide marcato in grado di legarsi al sito bersaglio. Poiché peptidi dotati di attività biologica posseggono intrinseche proprietà farmacologiche, un'indesiderata somministrazione potrebbe essere causa di effetti collaterali: appare, dunque, evidente la necessità di calibrare la quantità di peptide da impiegare nella reazione di marcatura.

L'efficienza di marcatura dei due peptidi NAP-NS è stata valutata studiando l'influenza della concentrazione del peptide sulla resa radiochimica di ciascun eterocomplesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})]^+$, preparato seguendo il Metodo 1 (1 mg di PNP3, 80 °C, 30 e 60 min) utilizzando concentrazioni decrescenti di peptide da 0.1 mg a 0.005 mg (1.64×10^{-4} mmol - 4.08×10^{-6} mmol).

I risultati ottenuti, espressi come variazione della resa radiochimica del complesso finale in funzione della quantità di peptide espressa in mg sono riportati in Tabella C4.1.

Come evidenziato in Tabella C4.1, la resa radiochimica rimane molto elevata (>85%) in un intervallo di concentrazione dell'analogo peptidico 0.100 - 0.020 mg, permettendo quindi di concludere che la cisteina terminale mantiene una buona efficacia chelante per il frammento $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$.

Composto	Rt, min	RCY	mg NAP-NS	mg PNP	logP	Metodo
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})]^+$	26.8 30.4	91.00	0.100	1	-1.436	1
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS1})]^+$	14.9 18.7	90.05	0.075	0.250	-1.524	2
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$	13.1 17.8	94.28	0.100	0.250	-1.736	3
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$	13.70 18.17	60.30 25.54	0.075	1	-1.481	4
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS2})]^+$	11.00 13.23	46.22 26.25	0.020	0.450	-1.653	5
$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})]^+$	15.49 18.86	65.71 26.84	0.020	0.250	-1.592	6

Tabella C4.1. Valutazione dell'influenza della quantità iniziale di peptide sulla RCY della reazione

Studi di stabilità cinetica in vitro hanno dimostrato che i complessi realizzati con PNP3 e NAP-NS1 sono stabili in soluzione salina, in tampone fosfato 0.02 M, pH=7.4 ed esibiscono una notevole inerzia nei confronti della transchelazione in presenza di un eccesso di Cys (1 mM, 10 mM) e Glutazione ridotto (10 mM).

La medesima osservazione non può essere effettuata per l'analogo complesso con PNP3 e NAP-NS2. L'eterocomplesso esibisce una chiara instabilità in tampone fosfato (%RCP a 18 ore di circa 4%), dando oltre a ciò prova di subire la presenza in soluzione di tioli, quali Cisteina e Glutazione ridotto. Entrambi entrano nella sfera di coordinazione, portando ad una degradazione del prodotto. La ragione di una così notevole differenza non è di facile investigazione.

Il grafico a pagina seguente riporta l'andamento della purezza radiochimica di entrambi i complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})]^+$ e $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$ in funzione del tempo. I dati sono espressi come media corredata da deviazione standard.

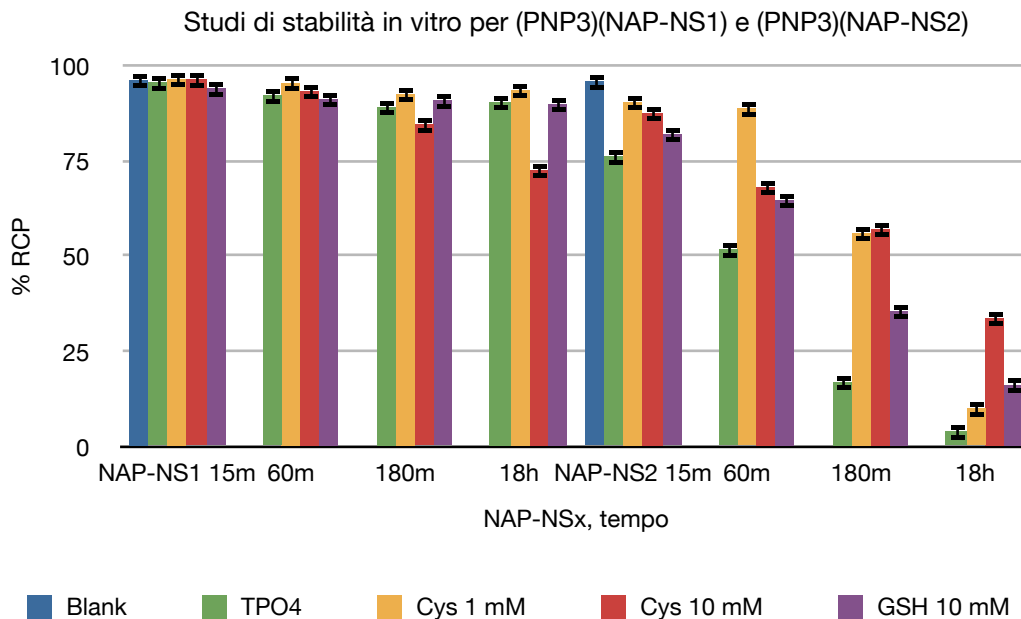


Grafico C4.1. Studi di stabilità in vitro per (PNP3)(NAP-NS1) e (PNP3)(NAP-NS2) a 37 °C.

Entrambi i complessi realizzati con PNP10 e NAP-NS1, NAP-NS2 sono stabili in soluzione ed inerti a transchelazione in presenza di Cisteina 10 mM o di Glutation 10 mM, mentre dopo 18 ore di incubazione a 37°C si nota in entrambi i casi una riduzione della purezza radiochimica dei campioni, come conseguenza di transchelazione. Questo aspetto, dopo somministrazione in vivo potrebbe comportare una riduzione dell'attività libera circolante. Tuttavia, studi condotti in soluzione acquosa di Cys 1 mM (concentrazione più vicina a quella fisiologica), evidenziano una riduzione della velocità di transchelazione del complesso, che risulta quindi più stabile.

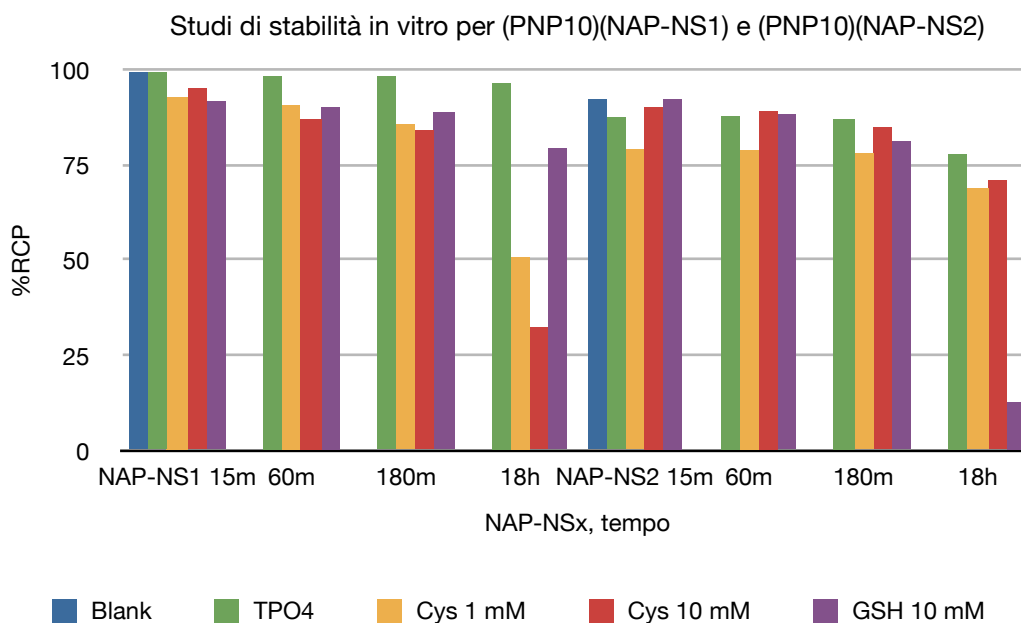


Grafico C4.2. Studi di stabilità in vitro per (PNP10)(NAP-NS1) e (PNP10)(NAP-NS2) a 37 °C.

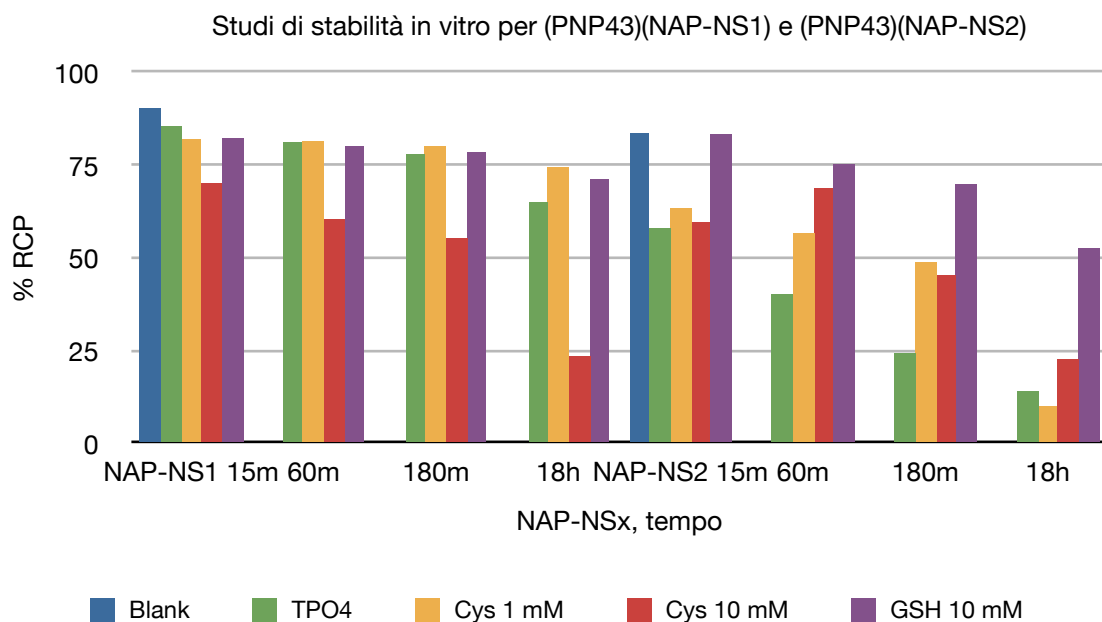


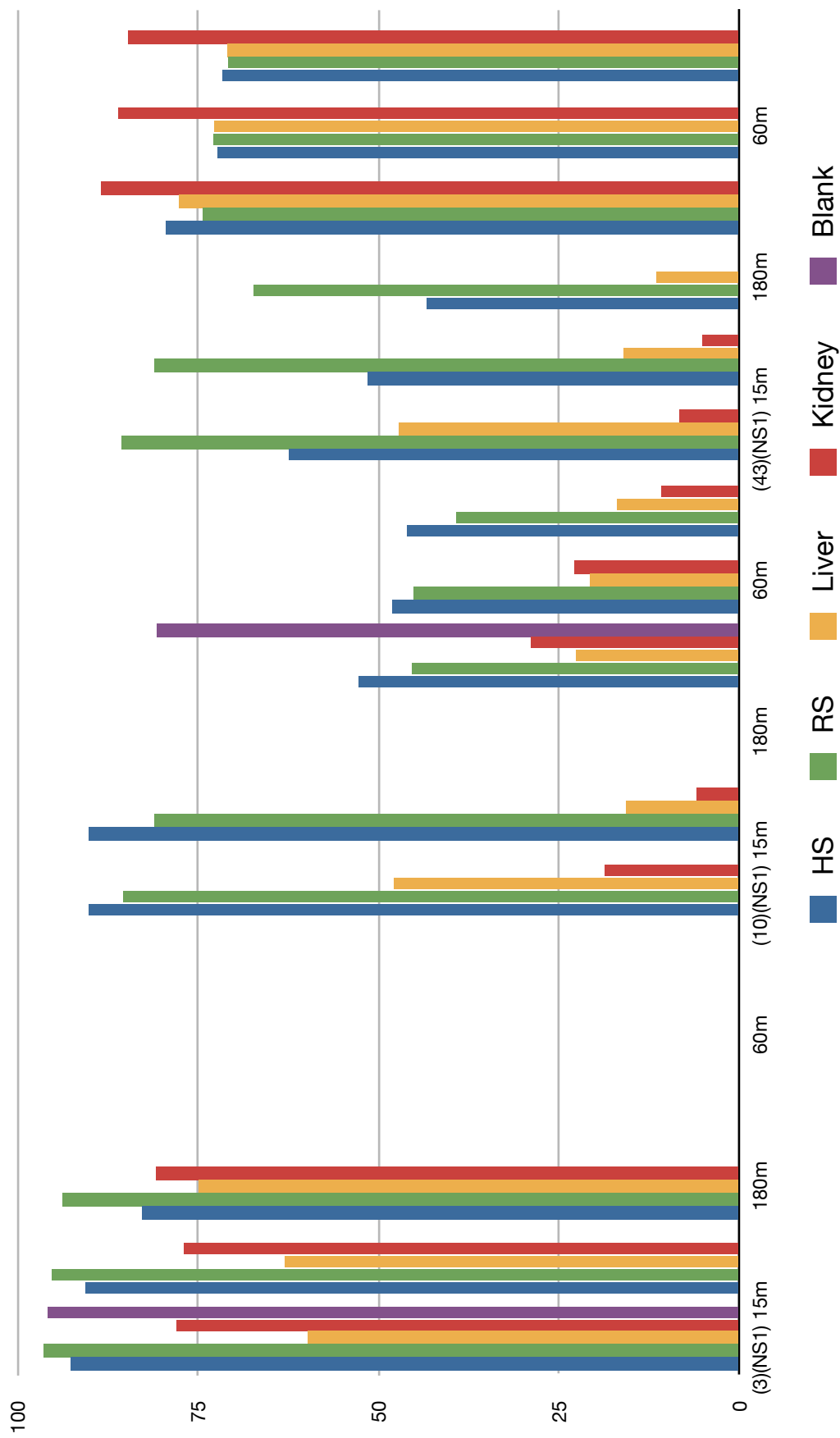
Grafico C4.3. Studi di stabilità in vitro per (PNP43)(NAP-NS1) e (PNP43)(NAP-NS2)

Per quanto riguarda la serie realizzata con la nuova fosfina PNP43, i risultati peggiori si sono ottenuti con il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})]^+$, instabile in soluzione acquosa per tampone fosfato e particolarmente sensibile alla transchelazione operata da Cisteina sia 1 sia 10 mM. $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$ presenta una buona stabilità idrolitica, ma anch'esso subisce una notevole transchelazione per Cisteina 10 mM.

Per quanto concerne la stabilità idrolitica, dalla comparazione dei risultati ottenuti si può osservare come il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$ risulti il meno stabile tra quelli presi in esame. La dimensione del legante amminodifosfinico rende quantitativa la degradazione del composto, già dopo un'ora dall'incubazione negli omogenati e praticamente completa nell'arco di tre ore. Al contrario, elevata stabilità si è riscontrata in composti del tipo $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})]^+$ in cui, evidentemente, la ramificazione dei gruppi sostituenti al fosforo limita nel tempo l'attacco da parte degli enzimi. Per il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS1})]^+$ si è osservata una stabilità intermedia: una sostanziale degradazione negli omogenati contro una effettiva resistenza agli enzimi serici. La degradazione dei complessi è comprovata dalla comparsa, nei tracciati HPLC, di picchi corrispondenti a composti maggiormente idrofili, le cui concentrazioni crescono in funzione del tempo di esposizione all'azione degli enzimi litici. La presenza di questi prodotti, responsabili dell'abbassamento della RCP del complesso esaminato, non è segno di instabilità dello stesso: le attività enzimatiche presenti negli omogenati operano sulla catena peptidica del legante, dando origine a peptidi comunque marcati, ma più corti, di dimensioni ridotte rispetto a NAP-NS1, sostanzialmente quindi più idrofili.

$[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$ non è stato testato, considerandone l'instabilità in soluzione. $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS2})]^+$ vede darsi anch'esso la purezza radiochimica, mentre $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})]^+$ rimane sostanzialmente inalterato, in completa contrapposizione a quanto osservato per $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$.

Stabilità dei complessi (PNP)(NAP-NS) in siero umano, siero di ratto, omogenato di rene e fegato di ratto



Le Tabelle ed i Grafici seguenti riportano l'esito degli studi biodistributivi ex vivo effettuati su ratti femmina sani del tipo Sprague Dawley.

(3)(NS1)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	0.61	± 0.04	0.37	± 0.06	0.29	± 0.01	0.13	± 0.00
heart	0.34	± 0.07	0.18	± 0.04	0.19	± 0.01	0.19	± 0.07
lungs	1.02	± 0.04	0.50	± 0.02	0.70	± 0.05	0.34	± 0.03
liver	0.90	± 0.02	0.87	± 0.49	0.83	± 0.09	0.92	± 0.14
spleen	0.65	± 0.01	0.37	± 0.15	0.52	± 0.10	0.60	± 0.14
kidney	2.12	± 0.61	2.19	± 1.54	2.96	± 1.48	2.36	± 1.52
intestine	1.99	± 2.55	2.26	± 0.85	3.86	± 1.03	6.09	± 1.11
stomac	0.38	± 0.04	0.19	± 0.00	0.32	± 0.07	0.53	± 0.36
pancreas	0.17	± 0.02	0.16	± 0.09	0.14	± 0.07	0.10	± 0.05
muscle	0.12	± 0.02	0.07	± 0.01	0.06	± 0.00	0.05	± 0.02
skin	0.42	± 0.02	0.27	± 0.06	0.17	± 0.01	0.17	± 0.06
urine	44.01	± 4.26	28.48	± 9.54	44.14	± 1.18	61.82	± 0.19
muscle/Blood	0.21		0.19		0.20		0.35	

Tabella C4.2. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})^+$.

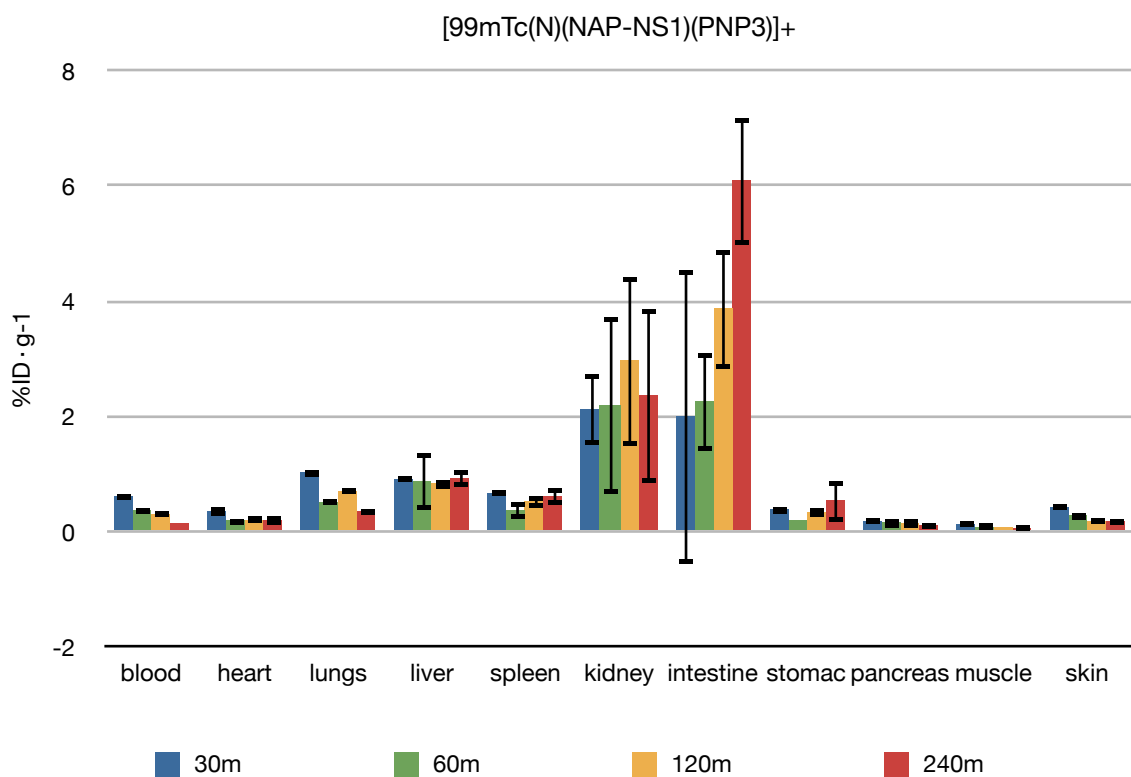


Grafico C4.5. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS1})^+$.

(3)(NS2)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	0.69	± 0.15	0.33	± 0.06	0.09	± 0.11	0.05	± 0.01
heart	0.31	± 0.08	0.20	± 0.05	0.12	± 0.02	0.06	± 0.01
lungs	1.35	± 0.39	0.47	± 0.00	0.38	± 0.04	0.24	± 0.12
liver	1.11	± 0.21	1.57	± 0.41	1.96	± 0.22	1.85	± 0.56
spleen	0.63	± 0.12	0.44	± 0.13	0.56	± 0.09	0.55	± 0.56
kidney	3.53	± 0.14	2.03	± 0.31	1.60	± 0.27	1.99	± 0.01
intestine	1.66	± 0.48	1.36	± 0.34	1.63	± 0.53	1.44	± 0.76
stomac	0.27	± 0.12	0.17	± 0.10	0.26	± 0.00	0.10	± 0.05
pancreas	0.19	± 0.05	0.12	± 0.02	0.06	± 0.01	0.07	± 0.02
muscle	0.24	± 0.08	0.09	± 0.03	0.04	± 0.00	0.04	± 0.00
skin	0.51	± 0.15	0.29	± 0.01	0.11	± 0.02	0.07	± 0.03
urine		±		±		±		±
muscle/Blood	0.35		0.27		0.47		0.78	

Tabella C4.3. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$.

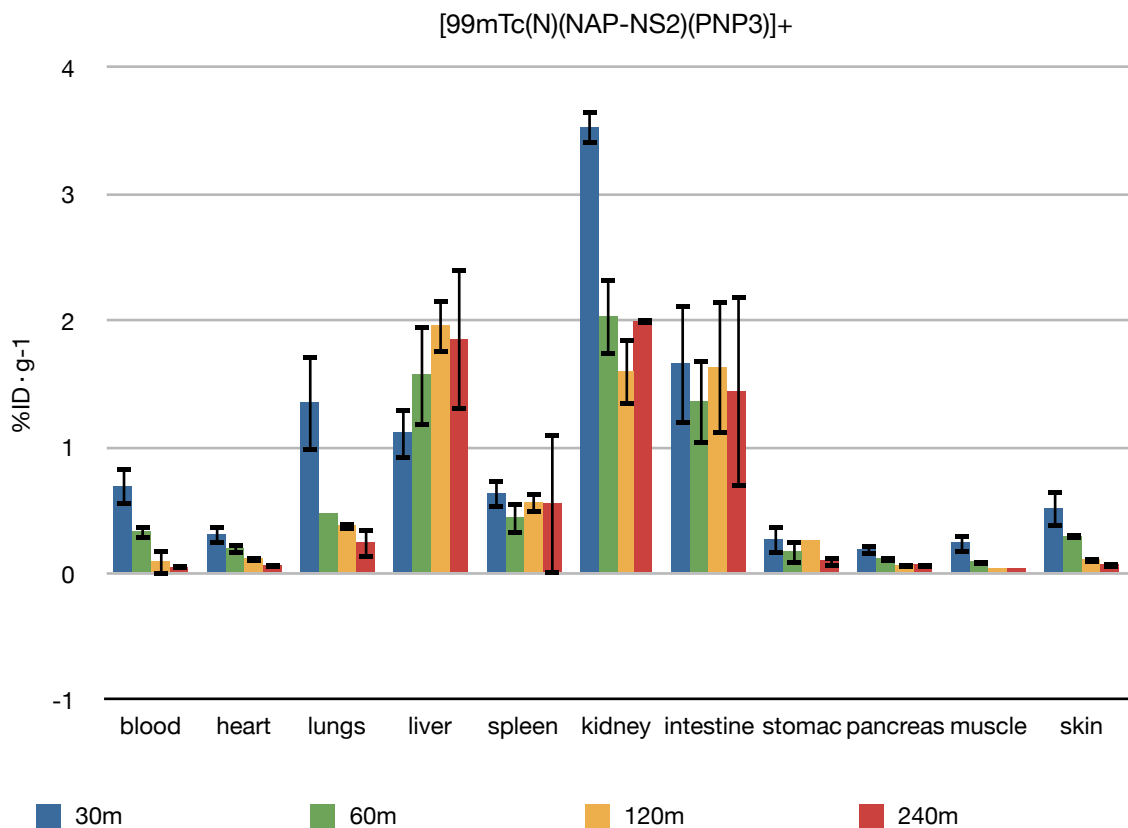


Grafico C4.6. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAP-NS2})]^+$.

(10)(NS1)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	0.61	± 0.00	0.34	± 0.03	0.28	± 0.07	0.17	± 0.03
heart	0.21	± 0.02	0.31	± 0.07	0.17	± 0.09	0.10	± 0.07
lungs	0.97	± 0.09	1.15	± 0.09	0.73	± 0.34	0.64	± 0.09
liver	1.31	± 0.35	1.30	± 0.20	0.86	± 0.11	0.85	± 0.20
spleen	0.28	± 0.06	0.26	± 0.01	0.16	± 0.08	0.14	± 0.01
kidney	11.44	± 1.19	8.32	± 1.60	10.93	± 0.76	12.01	± 1.60
intestine	12.57	± 1.05	9.41	± 0.81	8.74	± 5.71	9.5	± 0.81
stomac	0.57	± 0.31	1.31	± 0.10	0.30	± 0.02	0.25	± 0.10
pancreas	0.45	± 0.05	0.30	± 0.08	0.44	± 0.05	0.35	± 0.08
muscle	0.19	± 0.03	0.10	± 0.02	0.13	± 0.03	0.10	± 0.02
skin	0.49	± 0.01	0.26	± 0.06	0.21	± 0.04	0.21	± 0.06
urine	7.12	± 1.80	9.53	± 0.09	7.95	± 9.32	15.32	± 0.09
muscle/Blood	0.31		0.29		0.45			

Tabella C4.4. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS1})]^+$.

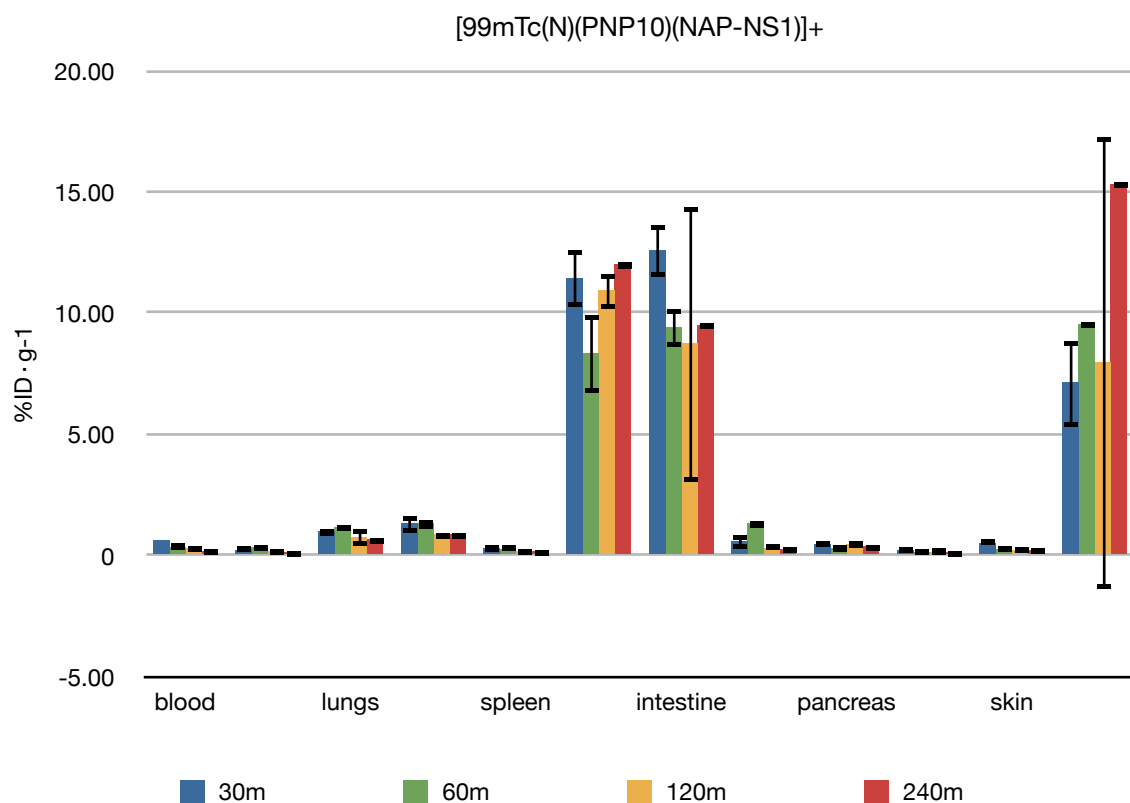


Grafico C4.7. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS1})]^+$.

(10)(NS2)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	0.38	± 0.01	0.30	± 0.00	0.23	± 0.00	0.21	± 0.02
heart	0.12	± 0.03	0.10	± 0.00	0.09	± 0.01	0.08	± 0.03
lungs	0.50	± 0.03	0.25	± 0.23	0.28	± 0.04	0.28	± 0.02
liver	0.47	± 0.01	0.57	± 0.09	0.60	± 0.32	0.42	± 0.09
spleen	0.18	± 0.02	0.15	± 0.00	0.12	± 0.03	0.13	± 0.09
kidney	3.05	± 0.55	6.71	± 1.13	7.22	± 2.87	4.59	± 2.94
intestine	2.86	± 1.52	2.75	± 0.69	5.33	± 0.74	9.38	± 6.71
stomac	0.24	± 0.03	0.33	± 0.00	0.25	± 0.05	0.31	± 0.13
pancreas	0.28	± 0.08	0.36	± 0.29	0.17	± 0.03	0.27	± 0.16
muscle	0.07	± 0.01	0.08	± 0.03	0.04	± 0.01	0.05	± 0.02
skin	0.24	± 0.01	0.26	± 0.04	0.14	± 0.00	0.09	± 0.03
urine	18.98	± 2.43	15.80	± 3.25	22.74	± 0.57	13.86	± 1.67
muscle/Blood	0.18		0.27		0.18		0.25	

Tabella C4.5. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS2})]^+$.

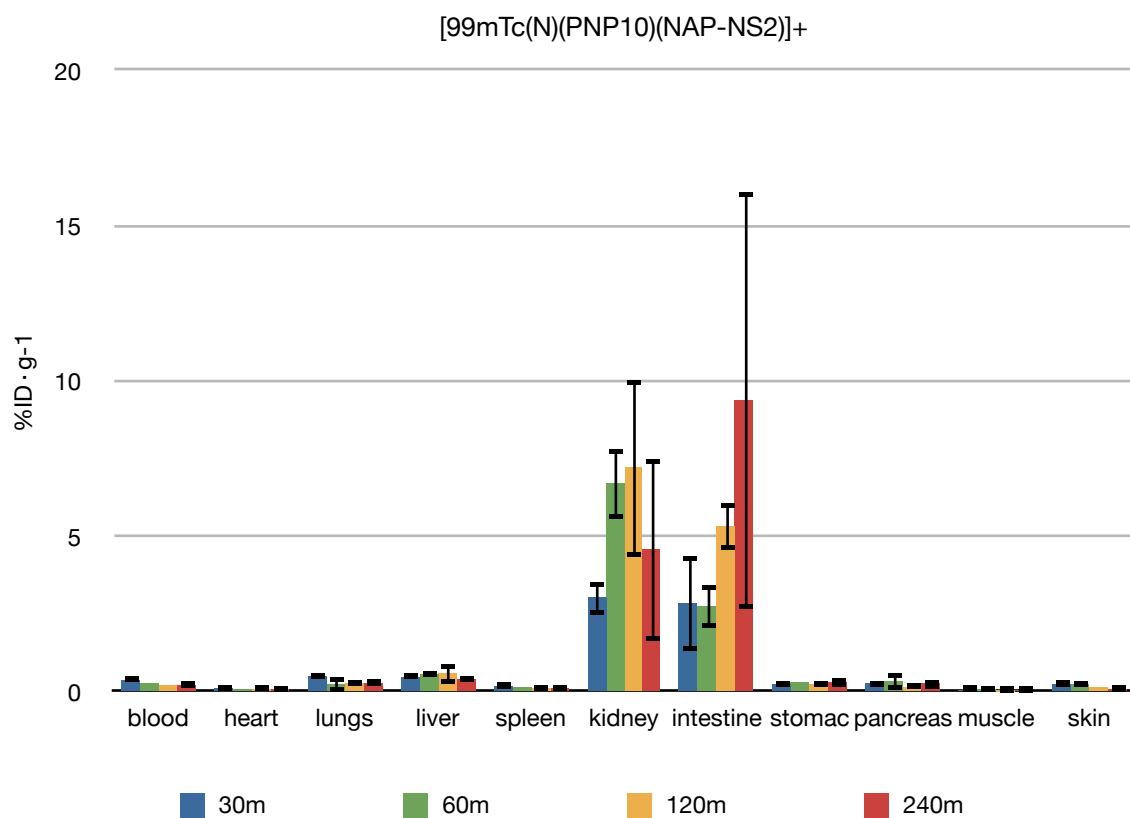


Grafico C4.8. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP10})(\text{NAP-NS2})]^+$.

(43)(NS1)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	1.06	± 0.64	1.11	± 0.05	0.40	± 0.04	0.37	± 0.13
heart	0.69	± 0.34	0.73	± 0.11	0.42	± 0.13	0.24	± 0.08
lungs	1.62	± 0.81	1.88	± 0.25	0.78	± 0.12	0.48	± 0.21
liver	0.89	± 0.55	1.67	± 0.38	0.80	± 0.08	0.52	± 0.09
spleen	0.50	± 0.27	0.50	± 0.03	0.29	± 0.03	0.21	± 0.09
kidney	15.70	± 7.50	19.43	± 5.79	10.79	± 0.32	13.37	± 13.24
intestine	2.73	± 0.19	5.14	± 1.70	5.56	± 0.50	3.57	± 2.01
stomac	0.75	± 0.37	0.80	± 0.15	0.43	± 0.06	0.28	± 0.03
pancreas	0.45	± 0.30	0.41	± 0.05	0.48	± 0.14	0.28	± 0.06
muscle	0.34	± 0.13	0.37	± 0.07	0.15	± 0.01	0.17	± 0.15
skin	1.05	± 0.63	1.05	± 0.21	0.41	± 0.02	0.47	± 0.52
urine	0.71	± 0.33	2.85	± 2.71	22.31	± 10.41	17.78	± 13.41
muscle/Blood	0.32		0.33		0.39		0.47	

Tabella C4.6. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$.

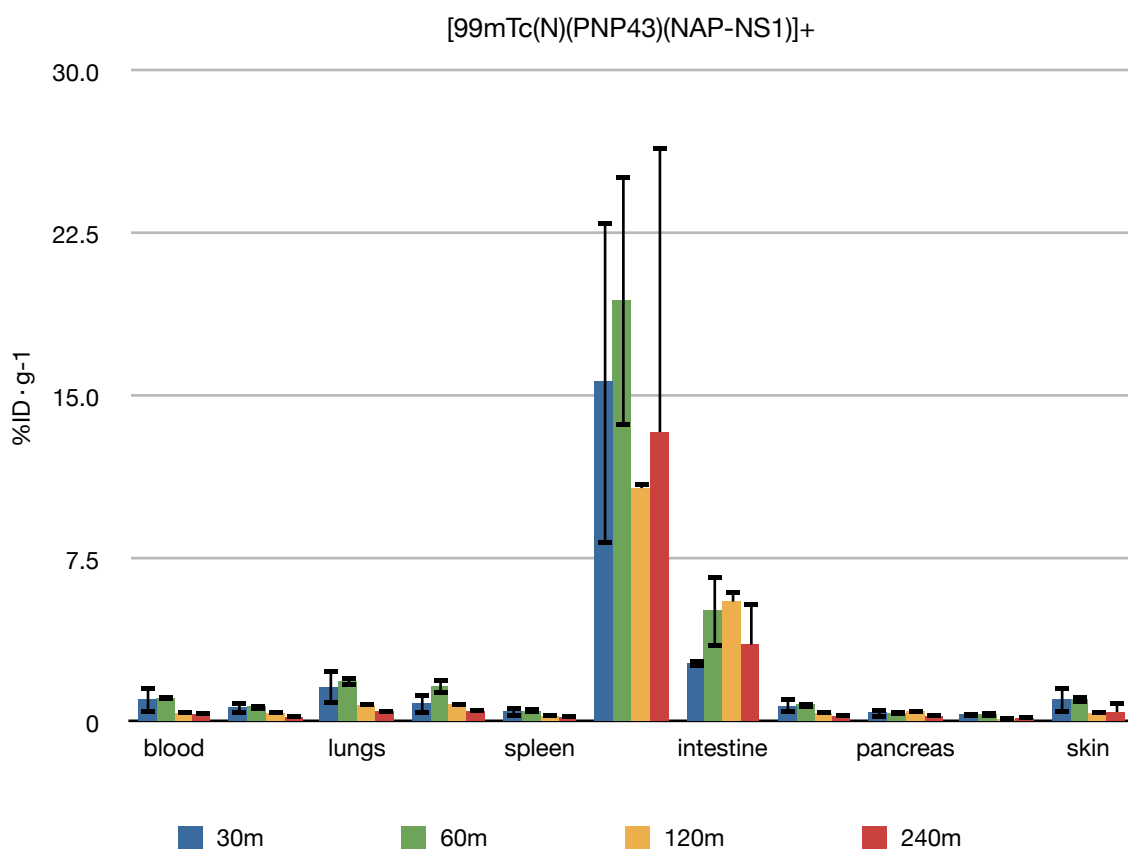


Grafico C4.9. Biositribuzione di *syn/anti*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1})]^+$.

(43)(NS2)	30 min		60 min		120 min		240 min	
blood	1,06 ±	0,07	0,82 ±	0,13	0,58 ±	0,03	0,59 ±	0,26
heart	0,43 ±	0,04	0,31 ±	0,02	0,28 ±	0,03	0,28 ±	0,04
lungs	1,14 ±	0,23	1,06 ±	0,98	1,12 ±	0,43	1,01 ±	0,23
liver	2,14 ±	0,68	2,40 ±	0,57	2,36 ±	0,08	2,38 ±	0,23
spleen	1,32 ±	0,19	0,91 ±	0,20	1,29 ±	0,03	1,49 ±	0,23
kidney	4,33 ±	0,97	4,80 ±	0,57	7,80 ±	3,12	10,47 ±	8,71
intestine	2,26 ±	0,55	2,84 ±	0,58	8,36 ±	2,84	8,86 ±	3,77
stomac	0,61 ±	0,13	0,48 ±	0,03	0,49 ±	0,13	0,61 ±	0,34
pancreas	0,42 ±	0,02	0,34 ±	0,03	0,36 ±	0,12	0,37 ±	0,27
muscle	0,22 ±	0,01	0,19 ±	0,04	0,10 ±	0,01	0,19 ±	0,04
skin	0,52 ±	0,01	0,49 ±	0,00	0,35 ±	0,06	0,44 ±	0,01
urine	9,03 ±	1,38	8,26 ±	1,77	14,73 ±	0,60	14,98 ±	0,23
muscle/Blood	0.21		0.23		0.18		0.33	

Tabella C4.7. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})^+$.

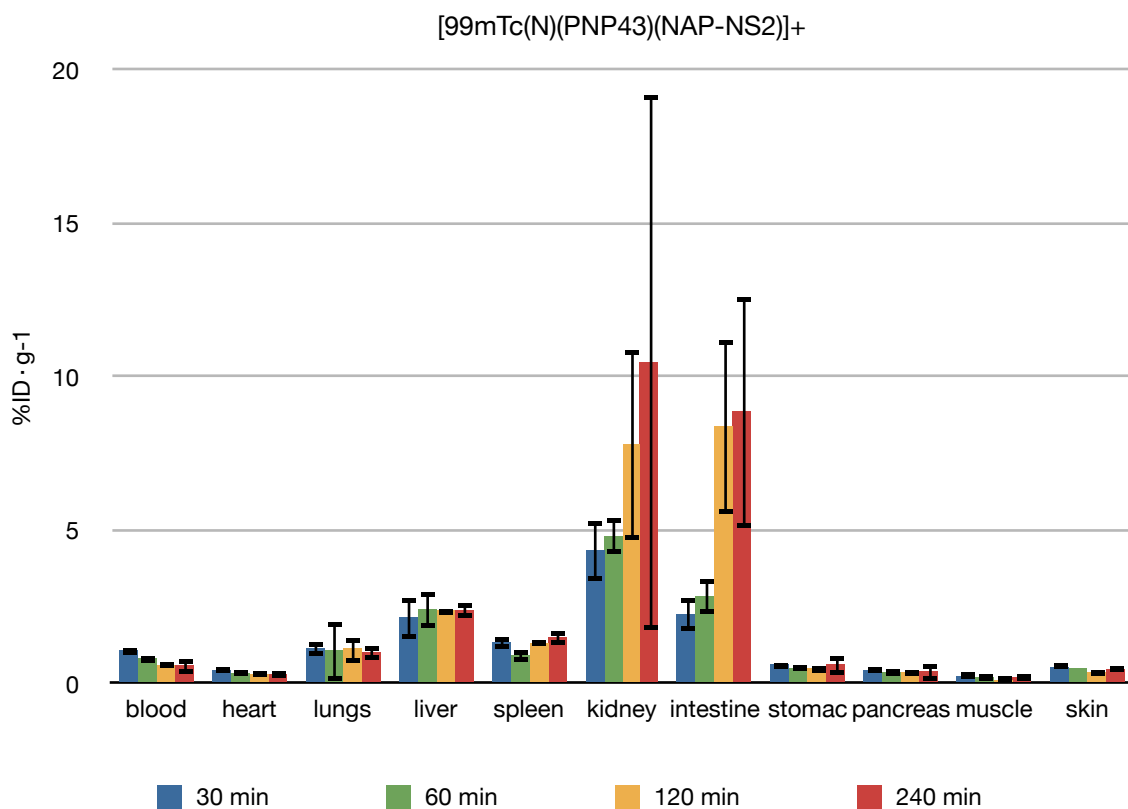


Grafico C4.10. Biositribuzione di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS2})^+$.

I risultati di biodistribuzione dopo l'iniezione dei complessi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})]^+$, condotti in ratti femmine sani Sprague Dawley indicano che gli eterocomplessi seguono un profilo di assorbimento, distribuzione ed eliminazione tipico dei peptidi. Tutti presentano una rapida clearance ematica e dai tessuti non bersaglio. L'attività associata al polmone ed al fegato va riducendosi nel corso del perdurare dello studio biodistributivo. Si ha un elevato accumulo a livello renale, espressione di un'attiva eliminazione del prodotto attraverso le urine, che si ritrovano infatti arricchite in attività già a tempi brevi.

L'attività nel fegato ed in corrispondenza del tratto gastro-intestinale è alta ed è da ricondurre ad una eliminazione epato-biliare del complesso. L'assenza di significative captazioni da parte dei tessuti associati allo stomaco indica che la sfera di coordinazione per tutti i complessi si mantiene stabile per la durata della seduta biodistributiva: un eventuale ricostituzione di pertecnetato sarebbe infatti stata rivelata attraverso un aumento dei conteggi dello stomaco.

L'attività associata al pancreas e alla cute è modesta, anche se per il pancreas quasi sempre superiore allo sfondo (rapporto sangue/carcassa).

Le ulteriori differenze nei profili biodistributivi sono da ricondurre alle diverse caratteristiche chimico fisiche di ciascun complesso, responsabili, in vivo, di caratteristici andamenti farmacodinamici e farmacocinetici.

Trasferimento della chimica di coordinazione da ^{99m}Tc a ^{188}Re

Da un punto di vista teorico, lo sviluppo della combinazione terapeutica di questi $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})]^+$ eterocomplessi richiede il trasferimento della tecnologia di marcatura al congenere chimico ^{188}Re . Purtroppo, nonostante gli sforzi profusi, non si è stati in grado di raggiungere l'obiettivo desiderato. Non solo la riduzione dell'anione perrenato richiede condizioni assai più drastiche rispetto al ^{99m}Tc (concentrazione dieci volte maggiore dell'agente riducente SnCl_2 , pH compreso tra 3.2 e 3.6, necessità di impiego di un opportuno agente in grado di stabilizzare il metallo a stati di ossidazione più bassi), ma anche il ruolo essenziale del DTCZ come unico donatore di gruppi nitrato, spiazzabile dalla sfera di coordinazione solo tramite alte concentrazioni di legante bidentato...alte concentrazioni incompatibili con una molecola bioattiva.

Impiegando 1 mg di peptide NAP-NS1, non si è osservata la formazione, seppure in bassissime rese, del prodotto $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS1})]^+$.

Ad esempio, a livello di Tc-99m, i complessi $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3}(\text{Cys}\sim))]^{+/0}$ con $\text{Cys}\sim = \text{CysOR}$, 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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})]^+$ in alta resa. Questo rappresenta la specie cineticamente favorita, termodinamicamente stabile ed inerte a transchelazione con $\text{Cys}\sim$ non formando il complesso misto $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{Cys}\sim)(\text{PNP3})]^{+/0}$.

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 $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$, 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.

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 $[^{186/188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$.

Utilizzando SDH come donatore, infatti, i complessi $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{Cys}\sim)]^{+/0}$ sono ottenuti con rese bassissime (RCY~40%), se confrontati con gli analoghi ottenuti con Tc-99m, e questo conferma la bassa efficacia della succinil-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 $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})]^+$. Come dimostrato dal fatto che può essere ottenuto, in resa quantitativa, attraverso una reazione che avviene in un unico passaggio. $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})]^+$ 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^- .

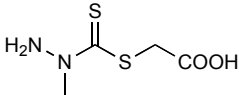
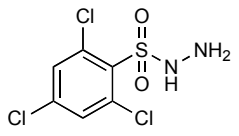
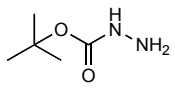
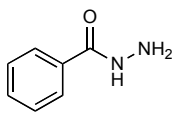
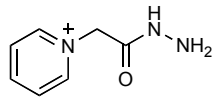
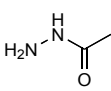
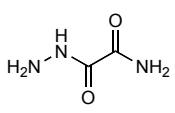
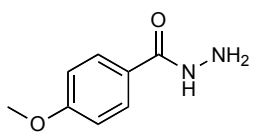
Le quantità di Sn, agente riducente, e le condizioni di riduzione sono, per il Re-188, più drastiche di quelle utilizzate per il suo congenere Tc-99m, come atteso in ragione delle differenze nei potenziali standard di riduzione dei due metalli. In particolare, per Re-188, l'ambiente riducente è ottenuto 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 $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ a $[\text{Re}^{\text{VII}}\text{O}_4]^-$. Sperimentalmente si è osservato che per valori di pH finale inferiori a 3,2 si osserva principalmente la formazione del complesso misto $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})]^+$, mentre per $\text{pH} > 3,6$ 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.

Questo studio ha permesso di mettere a punto una efficiente via di sintesi che prevede la preliminare formazione del core $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$, dopo soli 15 minuti a temperatura ambiente e la successiva aggiunta dei leganti: PNP3, Cys~ e tampone fosfato 0.125 M, a $\text{pH}=7.7$. La amminodifosfina stabilizza lo stato di ossidazione del Re(V) nel core $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$ e, originando il frammento metallico $[^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP3})]^{2+}$ ne promuove la reattività nei confronti dei leganti bidentati Cys~.

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 $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{DTCZ})]^+$, e, alle basse concentrazioni usate, non promuove l'ossidazione a Re(VII).

Il core $[188\text{Re}^{(V)}(\text{N})]^{2+}_{\text{int.}}$, nuovi sviluppi

La riduzione del perrenato ReO_4^- richiede un forte ambiente acido. Svatiati e potenziali donatori di nitruro N^{3-} sono stati studiati, ma solo N-metil-S-metil ditiocarbazato (HDT CZ) permette l'ottenimento del core $[\text{Re}^{(V)}(\text{N})]^{2+}_{\text{int.}}$ in rese accettabili. A titolo esplicativo, nella seguente tabella² sono riportate alcune formule di struttura corrispondenti a donatori sicuramente validi per $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ma estremamente insoddisfacenti per $^{186/188}\text{Re}$. La spiccata differenza affonda le radici nell'energetica dei potenziali standard dei due congeneri.

N^{3-} donator	$^{186/188}\text{Re}$	$^{99\text{m}}\text{Tc}$
NaN_3	< 5%	98%
	38%	92%
	15%	96%
	18%	96%
	< 5%	94%
	< 5%	98%
	8%	98%
	< 5%	95%
	< 5%	90%

² Tabella: rese radiochimiche di complessi $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{186/188}\text{Re}$ con diversi donatori di N^{3-} . Source: E. Bellande, M. Charmoille, R. Pasqualini, Synthesis of ^{186}Re Nitrido Complexes, Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine. Marino Nicolini, Ulderico Mazzi, 1999, SGE Editoriali - Italy

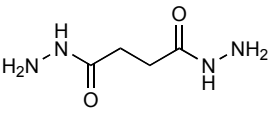
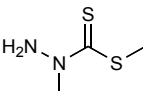
	<10%	98%
	92%	98%

Tabella C4.8. Donatori di nitruro per ^{188}Re .

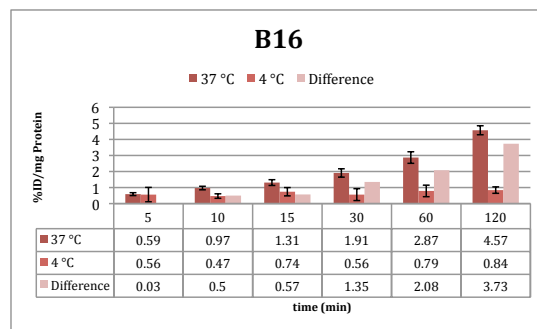
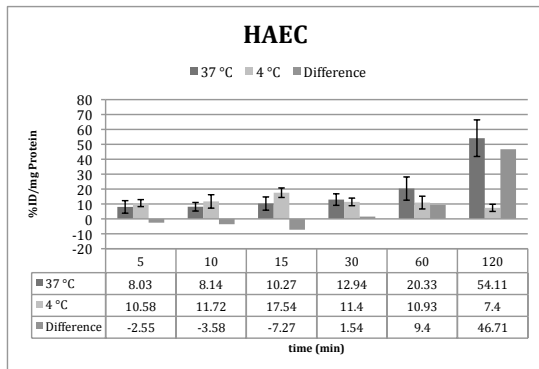
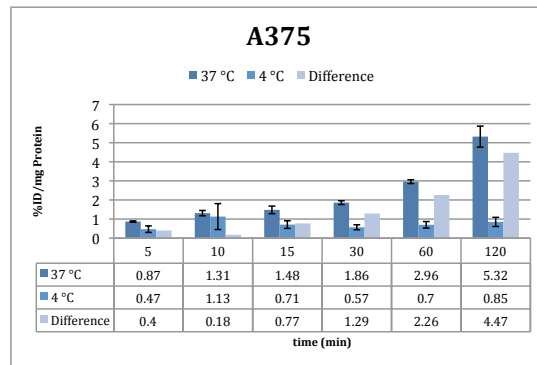
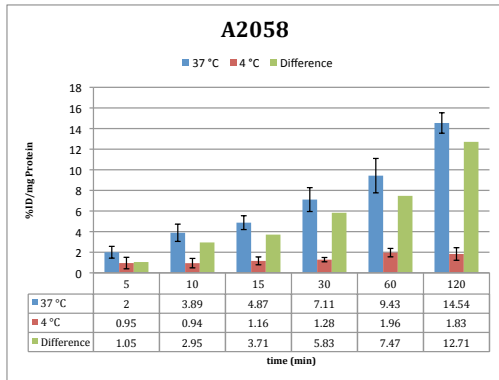
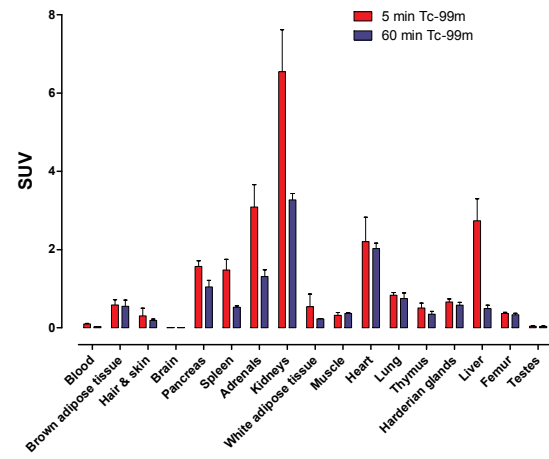
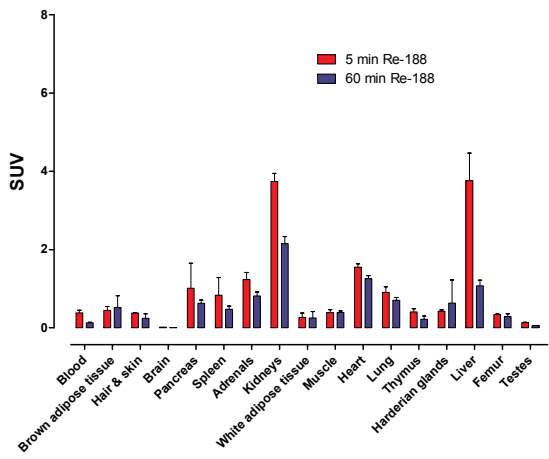
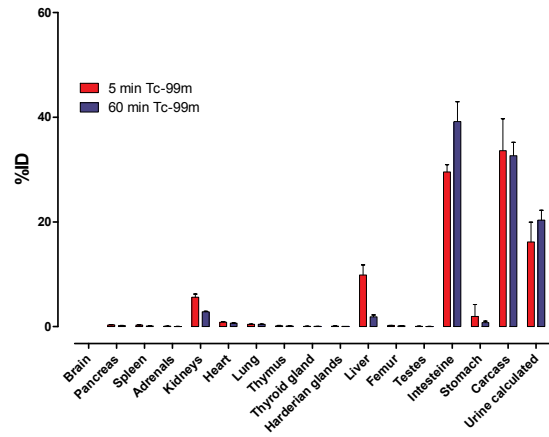
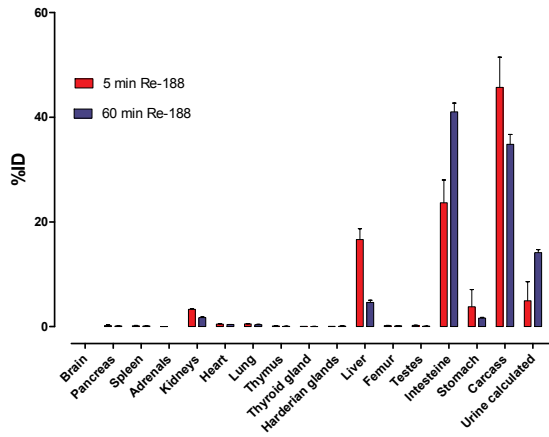
Sfortunatamente, la straordinaria capacità di HDTCZ nel donare nitruri è controbilanciata dal marcato potere coordinativo nei confronti dell'intermedio $[\text{Re}^{(\text{V})}(\text{N})]^{2+}_{\text{int}}$ e, ancor di più, del frammento metallico, vero e proprio gruppo funzionale, $[\text{Re}^{(\text{V})}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$. La notevole affinità chelante ostacola le reazioni di scambio che sono richieste per l'ottenimento del prodotto desiderato. Solitamente, l'aumento della concentrazione del ligando di interesse garantisce lo spiazzamento quantitativo di DTCZ dalla sfera di coordinazione, ma limita il campo di applicazione della tecnologia allorché alte attività specifiche siano richieste, come nel caso di molecole dotate di attività biologica.

Il trasferimento della chimica di coordinazione da Tc a Re con lo scopo di formulare analoghi terapeutici è al momento limitato con severità dall'impiego di HDTCZ: ottima e unica fonte di N^{3-} , ma al contempo incredibilmente affine al sistema $[\text{Re}^{(\text{V})}(\text{N})(\text{PNP}_n)]^{2+}$ e difficilmente spiazzabile. La presenza di HDTCZ in un sistema di marcatura porta alla formazione parassitaria della specie $[\text{Me}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP}_n)]^{0/+}$, le cui proprietà biologiche sono state investigate ai fini di chiarirne l'applicabilità in campo medico nucleare. Di seguito sono riportati la sintesi ed i risultati biologici per la specie $[\text{Re}^{188}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})]^+$.

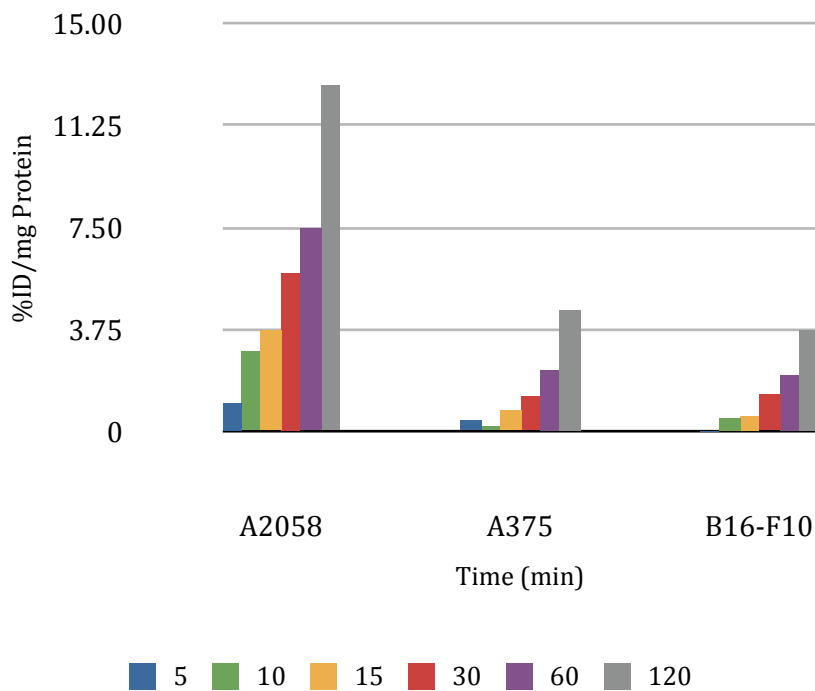
L'attività biologica del complesso $[\text{Re}^{188}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})]^+$ è stata valutata in-vivo in ratti maschi (Wistar) e tramite studi di uptake in cellule tumorali. Le linee cellulari selezionate sono:

ATCC Number	Designation	Organism	Morphology	Source	Tumorigenic	Pubmed
CRL-11147	A2058	Human	Epithelial	Skin, Melanoma Lymph node	Yes	375235, 6254071, 265522
CRL-1619	A375	Human	Epithelial	Skin, Malignant melanoma	Yes	4357758, 857033, 8943000
CRL-6475	B16-F10	Mouse	Melanocyte	Skin, C57BL/6J, melanoma	Yes	1109790, 953987, 908034,
Promocell C-12271	HAEC	Human	Endothelial	Normal Human Adult Tissue	No	promocell.com

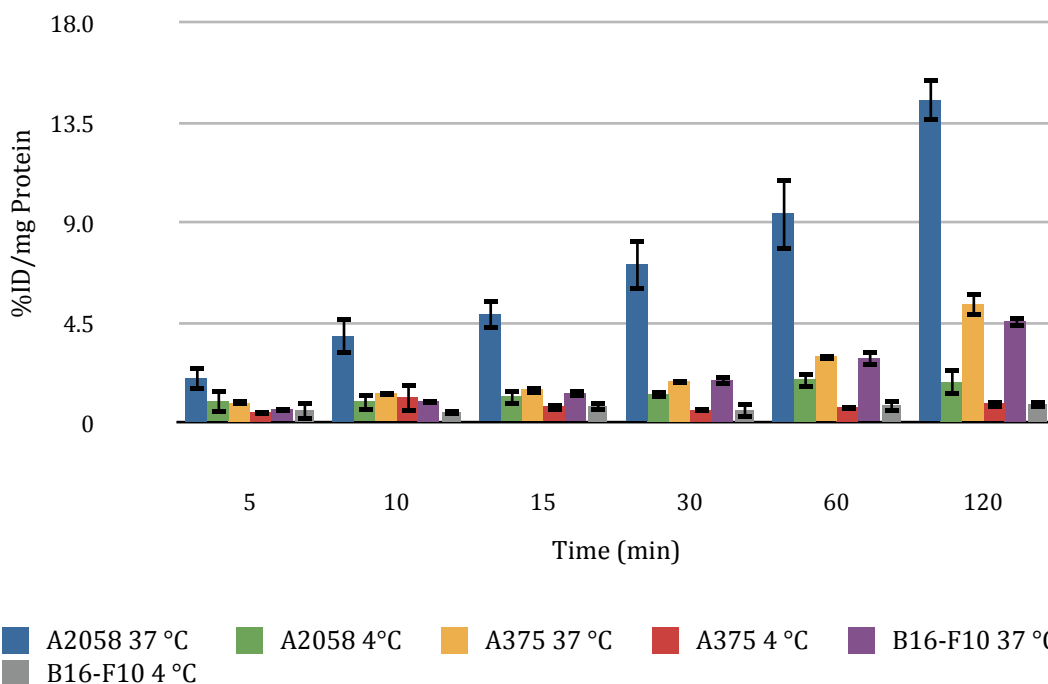
I risultati biodistributivi in ratti maschi Wistar sono espressi sia come %ID/mg di organo, sia come SUVs (*standardized uptake values*).



A2058, A375, B16-F10 Differenze 37-4 °C

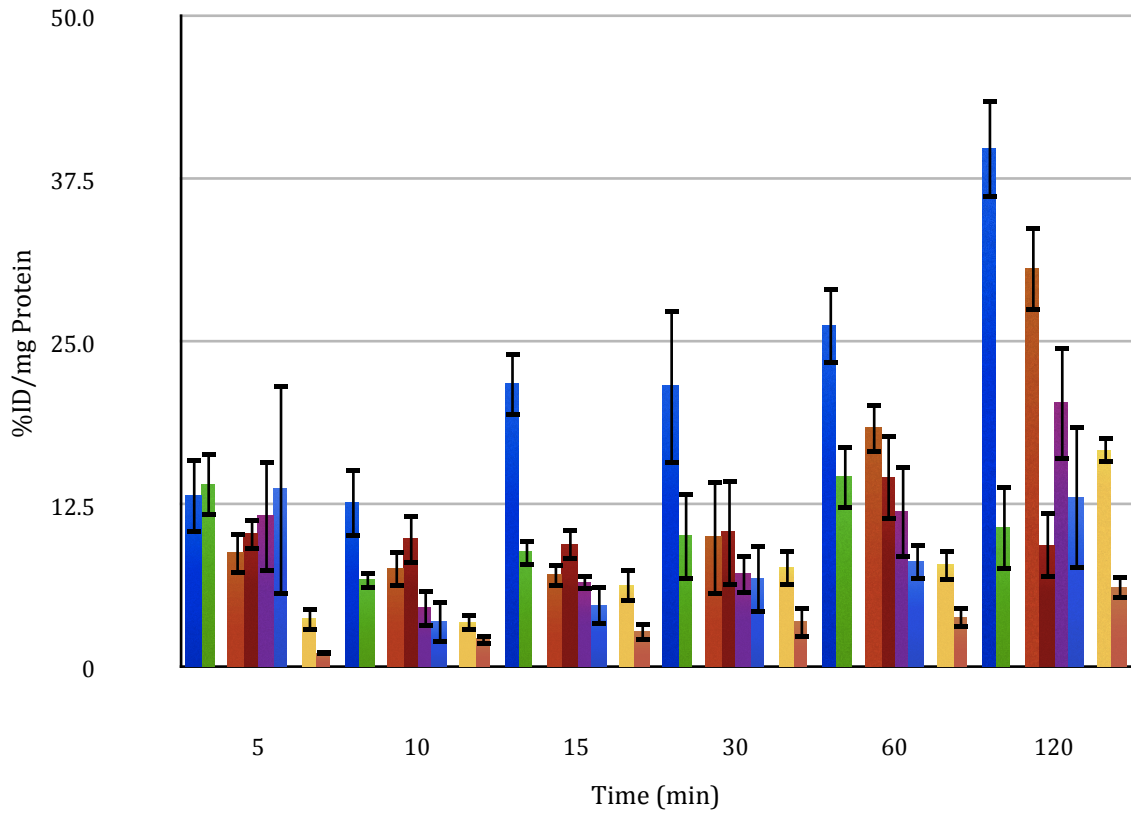


A2058, A375, B16-F10, sommario degli sudti di Uptake



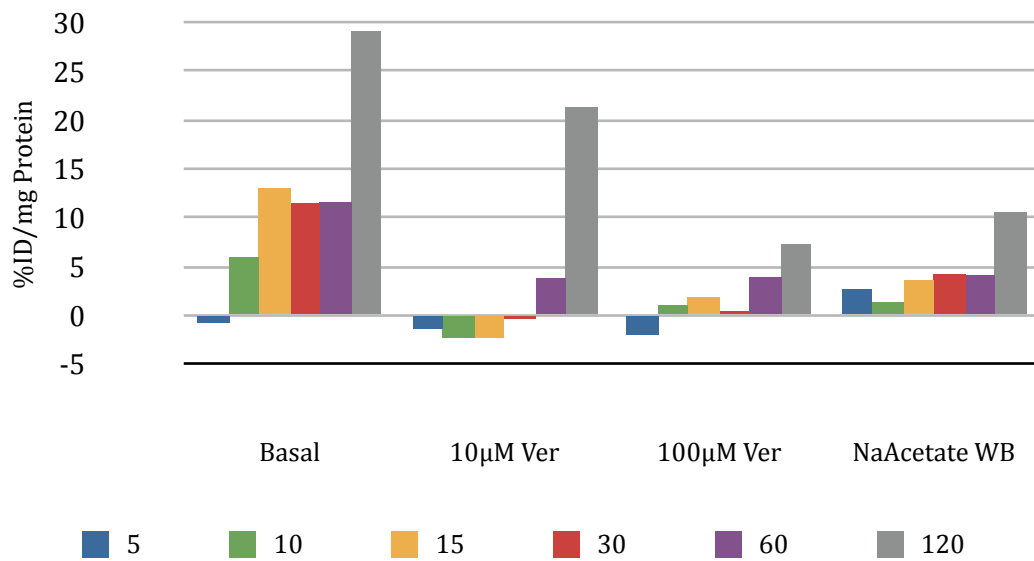
I grafici riportano un sommario dei dati di captazione cellulare del tracciante nelle varie linee presentate. La differenza tra il dato a 37 °C ed il dato a 4 °C quantifica la capacità del prodotto di permeare il compartimento cellulare.

A2058 +10 μ M Verapamil, +100 μ M Verapamil, NaAcetate Tampone



- A2058 37 °C
- +10 μ M Ver 37 °C
- +100 μ M Ver 4 °C
- A2058 4 °C + NaAcetato
- A2058 4 °C
- +10 μ M Ver 4 °C
- +100 μ M Ver 37 °C
- A2058 37 °C + NaAcetato

A2058 +10 μ M Verapamil, +100 μ M Verapamil, +NaAcetate Sommario



Dagli studi biodistributivi ottenuti per inoculazione in animali sani, il complesso $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})]^+$ presenta un prevedibile uptake cardiaco persistente ed una rapida clearance ematica. Il prodotto è eliminato per via renale ed epatica, con prevalenza di quest'ultima. Il complesso è risultato attivo nei confronti delle linee cellulari impiegate, con uptake massimali in A2058, linea cellulare su cui si sono concentrati gli studi successivi. I lavaggi con tampone Acetato/Acetico hanno permesso di chiarire la natura specifica dell'interazione con la cellula. Il trattamento della popolazione cellulare con Verapamil porta ad una diminuzione dell'uptake rispetto ai valori basali con un effetto dose dipendente. Sebbene le linee cellulari studiate non risultino dotate di trasportatori ABC capaci di mediare farmacoresistenza (MDR) via Pg-P o MRPn, l'effetto indotto da Verapamil è di difficile interpretazione e rimane tutt'ora incognito.

Validazione di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ come donatore di N^{3-}

In un recentissimo lavoro (Nuclear Medicine and Biology 37 (2010) 927-934, doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.05.008), Duatti ed il gruppo dei radiochimici di Ferrara riportano la sintesi di un derivato HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ. L'addotto è presentato come risolutivo delle problematiche correlate all'uso di HDTCZ nell'ottenimento di nitruro complessi di Renio. La modifica strutturale ridurrebbe la capacità legante di DTCZ, senza impedire la donazione di gruppi N^{3-} . L'articolo non menziona le motivazioni che hanno portato alla derivatizzazione con PEG₆₀₀. Dai dati riportati il nuovo substrato assicura l'ottenimento in tempi rapidi ed in alta resa del frammento molecolare $[^{188}\text{Re}(\text{N})(\text{PNP3})]^{2+}$, in condizioni tali da portare all'ottenimento di complessi asimmetrici con piccole molecole come NAC-Cys, Cys-OEt, utilizzandone quantitativi compresi tra 0.2-2 mg

Parte del lavoro è stata quindi dedicata alla sintesi e alla validazione di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ come nuovo possibile donatore di N^{3-} .

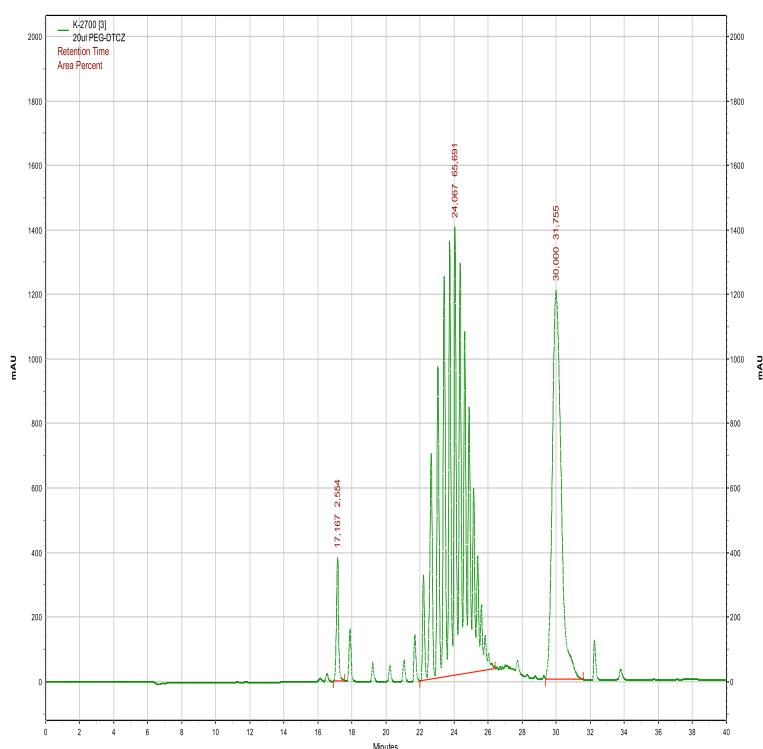


Figura C4.3. Profilo HPLC Analitico di PEG-DTCZ, $\lambda=254$ nm, Work-up mixture

In una prima applicazione al ^{99m}Tc , la capacità dell'addotto HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ di donare gruppi N³⁻ è stata valutata tramite confronto con i substrati classici HDTCZ e SDH. Sono stati allestiti 3 diversi kit di marcatura: il "kit SDH", il "kit PEG-DTCZ" e il "kit HDTCZ". La derivazione della RCY tramite HPLC³ per il complesso [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})$], ottenuto dalle tre formulazioni precedenti, e l'andamento della RCY stessa in seguito a variazioni delle concentrazioni delle specie reagenti costituiscono i parametri attraverso cui è possibile apprezzare e giudicare il potere di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ come nuova sorgente di gruppi nitruro.

kit SDH	kit PEG-DTCZ	kit HDTCZ
5mg SDH 0.9ml t. fosfato 0.1M, pH=7.4 0.1mg SnCl ₂ /0.1ml fisiol. 0.1ml Na[$^{99m}\text{TcO}_4$] <i>30min, RT</i>	3-5mg PEG-DTCZ 5mg EDTA 0.9ml t. fosfato 0.1M, pH=7.4 0.1mg SnCl ₂ /0.1ml fisiol. 0.1ml Na[$^{99m}\text{TcO}_4$] <i>30min, RT</i>	0.1mg HDTCZ 5mg EDTA 0.8ml t. fosfato 0.1M, pH=7.4 0.1mg SnCl ₂ /0.1ml fisiol. 0.1mg HDTCZ/0.1ml EtOH 0.1ml Na[$^{99m}\text{TcO}_4$] <i>30min, RT</i>
1mgPNP3/0.5ml (γ-ciclodex) 0.2-2mg NAc-Cys/0.150ml fisiol. <i>30min, 100 °C</i>	1mgPNP3/0.5ml (γ-ciclodex) 0.2-2mg NAc-Cys/0.150ml fisiol. <i>30min, 100 °C</i>	1mgPNP3/0.5ml (γ-ciclodex) 0.2-2mg NAc-Cys/0.150ml fisiol. <i>30min, 100 °C</i>

Come è possibile notare dal raffronto dei tre profili cromatografici ottenuti per iniezione dell'intermedio [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})\text{]}^{2+}_{int.}$ dopo i primi 30 min di reazione, l'attività è eluita a diversi tempi di ritenzione, ad indicare che il centro metallico coordina diverse specie leganti in soluzione capaci di reagire con il legante aminodifosfinico ed il legante bidentato NAc-Cys per generare il complesso asimmetrico [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})$]. La presenza di una elevata concentrazione di HDTCZ nel "kit HDTCZ" rende ragione dell'intensità del picco a 19.78 min, corrispondente al prodotto [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{DTCZ})(\text{PNP3})$]⁺ generato collateralmente e prova della straordinaria affinità del frammento metallico [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})$]²⁺ nei confronti di questo legante.

Il prodotto [$^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})$] è ottenuta nella stessa natura da ciascun kit, informazione chiaramente deducibile dalla conservazione del tempo di ritenzione al variare dell'approccio di marcatura. Appare inoltre evidente come, ad un primo esame, HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ sia in grado di donare gruppi nitruro e di permettere l'ottenimento del prodotto desiderato.

³ HPLC: Vydac C18, 218TP54, 250mm×4.6mm. Eluenti: A=Et₃N 0.01M, pH=3 per H₃PO₄ 85%, B=CH₃CN. Gradiente: 0min, %B=0%; 0-15min, %B=45%; 15-30min, %B=45%; 30-32min, %B=0%.

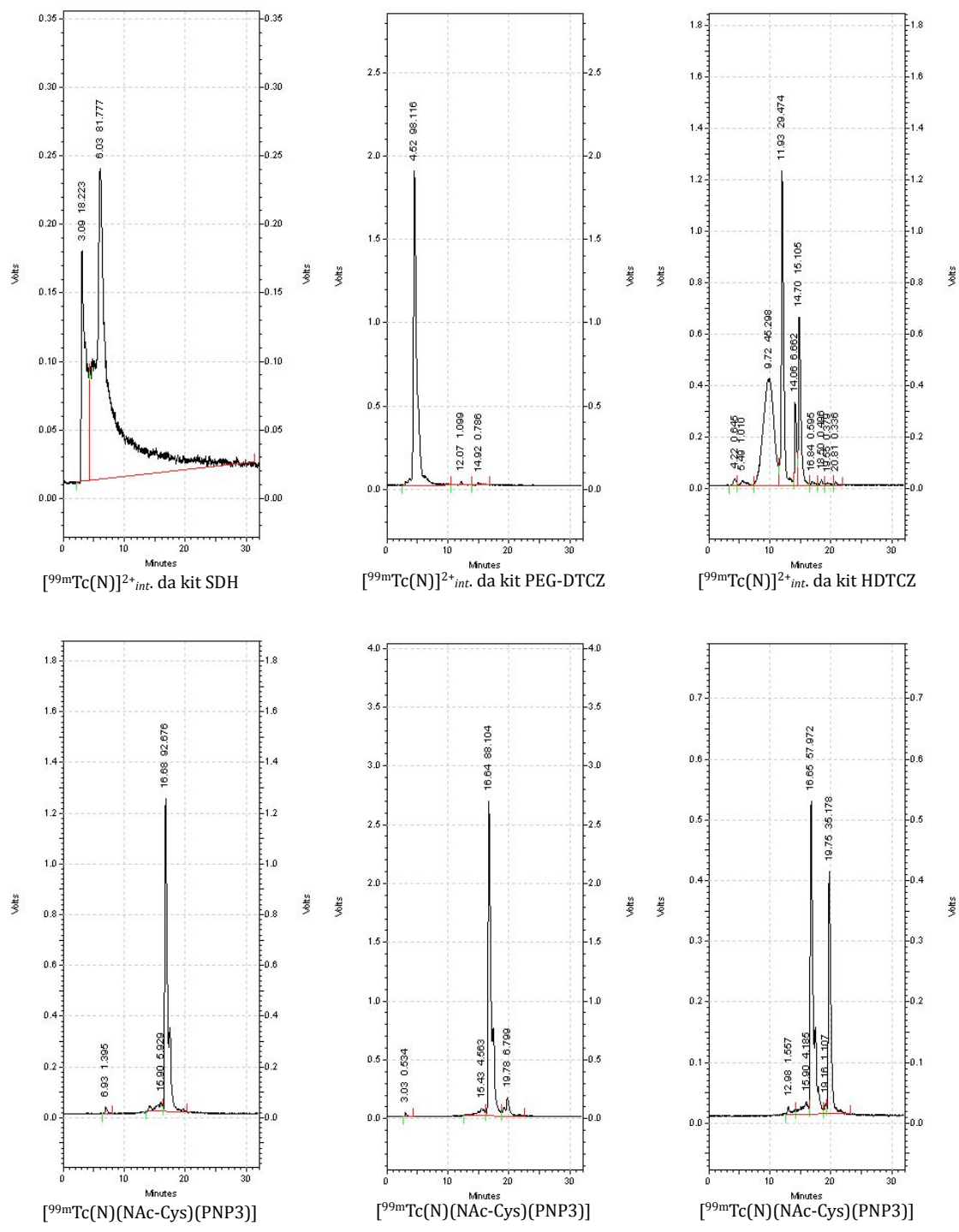


Tabella C4.8. Tracciati cromatografici corrispondenti alla specie $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAC-Cys})(\text{PNP3})]$.

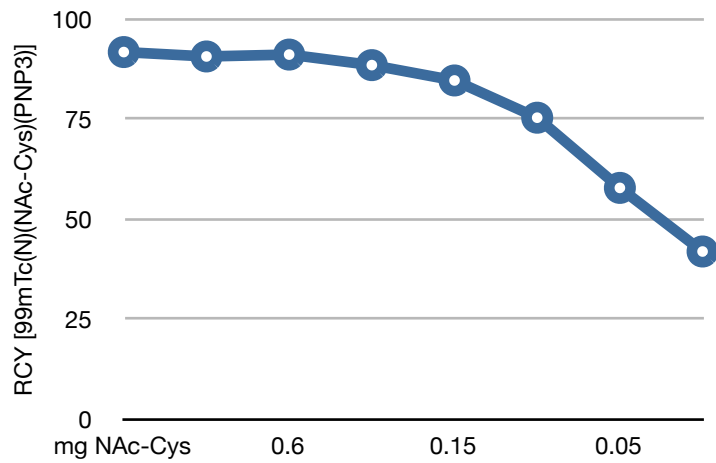
Nella tabella seguente sono riportati i tempi di ritenzione corrispondenti alle specie oggetto di studio in questo lavoro.

Prodotto	HPLC, C18		
	tR, UV, 254 nm	tR, Radio	RCY
HDTCZ	11.12		
HOOC-PEG ₆₀₀ -DTCZ	15.35 (Gaussian)		
Na[^{99m} TcO ₄]		6.30	100
[^{99m} Tc(N)] ²⁺ _{int.} da kit SDH		3.09	18.223
		6.03	81.777
[^{99m} Tc(N)] ²⁺ _{int.} da kit PEG-DTCZ		4.52	98.116
		12.07	1.099
		14.92	0.786
[^{99m} Tc(N)] ²⁺ _{int.} da kit HDTCZ		9.72	45.298
		11.93	29.474
		14.06	6.662
		14.70	15.105
[^{99m} Tc(N)(PNP3)] ²⁺ da PEG-DTCZ		13.09	5.457
		15.50	32.590
		16.90	5.263
		18.17	36.193
		19.10	4.498
[^{99m} Tc(N)(NAP-NS1)(PNP3)] ⁺		16.03	
		16.42	
[^{99m} Tc(N)(NAC-Cys)(PNP3)]		16.65	92.676 (SDH)
		17.38	88.276 (PEG-DTCZ)
			57.976 (HDTCZ)
[^{99m} Tc(N)(DTCZ)(PNP3)] ⁺		19.78	95

Lo studio di marcatura è stato realizzato attraverso:

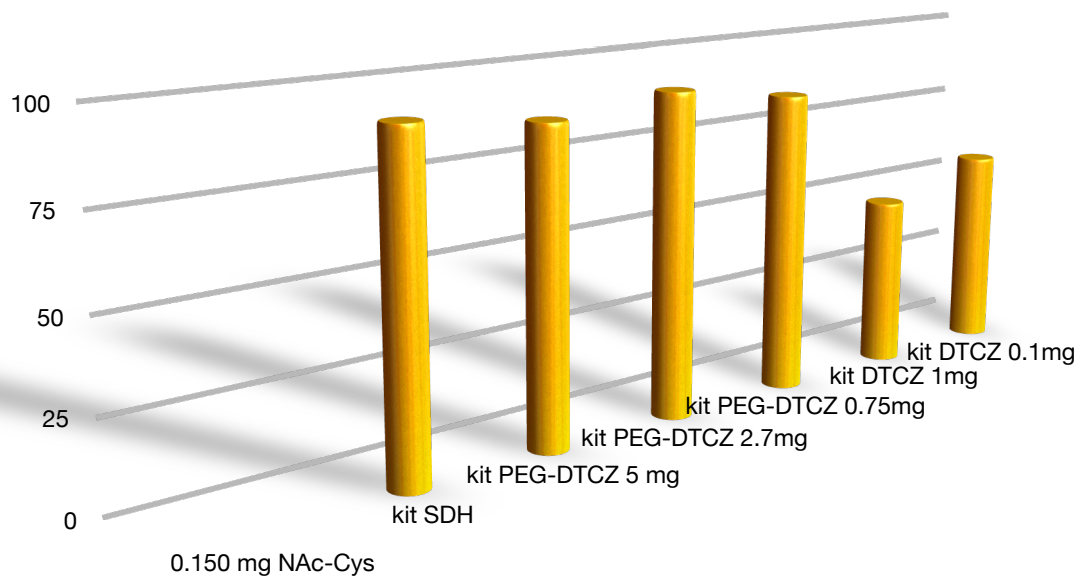
- Valutazione della RCY del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ nel kit PEG-DTCZ (5mg PEG-DTCZ), al variare del quantitativo di NAc-Cys.

RCY $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ per mg NAc-Cys (5mg PEG-DTCZ)

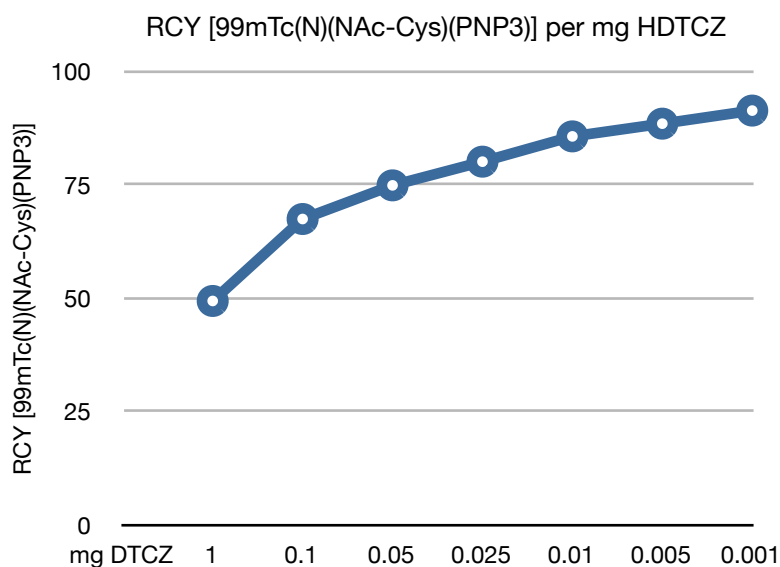


- Valutazione della RCY del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ nei diversi kit di marcatura allestiti.

RCY $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ nei diversi kit di marcatura

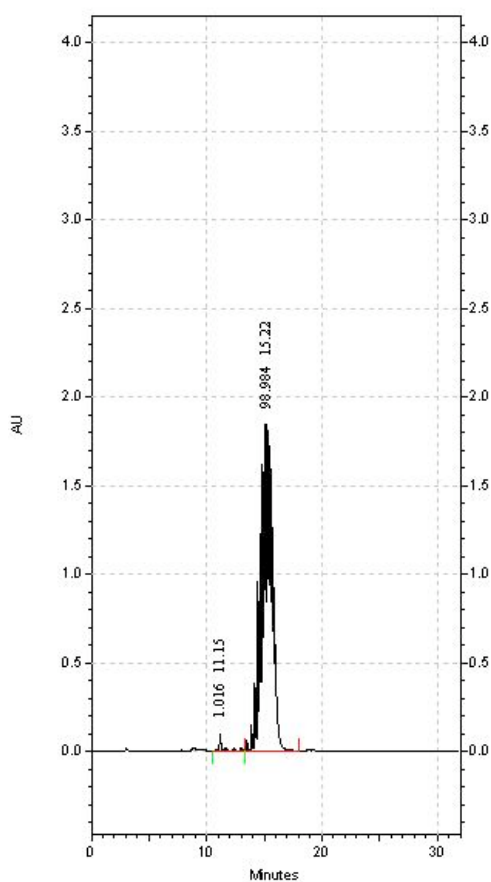


- Valutazione della RCY del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ al decrescere della quantitativo di HDTCZ nel kit HDTCZ.

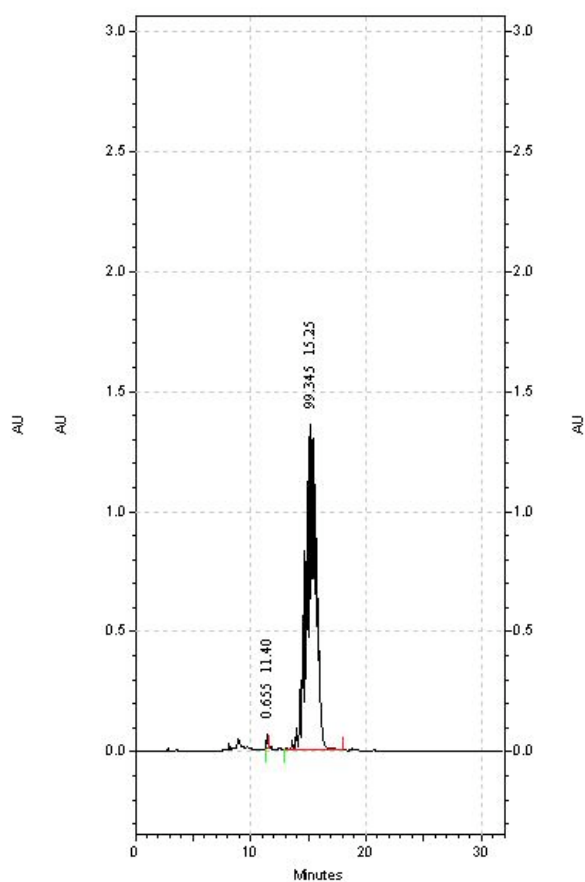


Dagli studi effettuati, è risultato che la minima quantità di NAc-Cys impiegabile per ottenere il complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ in alte rese risulta essere 0.150 mg. Questo quantitativo è quindi mantenuto costante per i successivi studi. La valutazione della RCY del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAc-Cys})(\text{PNP3})]$ nei diversi sistemi di marcatura allestiti permette di apprezzare come il kit SDH garantisca alte rese, in accordo ai dati di letteratura e nel rispetto dei fondamenti teorici del metodo sintetico. Il kit PEG-DTCZ, da questo punto di vista, pare non aggiungere niente di nuovo: da 3 a 5 mg sono sufficienti per ottenere il teorico trasferimento del nitrato e, per aggiunta dei leganti bidentati, il complesso desiderato. Il kit HDTCZ, ad 1 e 0.1 mg, produce risultati insoddisfacenti, ma un'attenta analisi condotta decrescendo il titolo di HDTCZ nella preparazione permette di apprezzare come 1 solo μg di HDTCZ restituisca il valore più alto in termini di resa radiochimica del composto asimmetrico finale.

Questa straordinaria affinità esibita da HDTCZ ha portato a dubitare dell'effettivo ruolo di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ come sorgente di gruppi nitrato. Un'attenta osservazione dello spettro HPLC registrato a 254 nm di due campioni di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ ottenuti per dissoluzione di 5 e 3 mg in 1.9 ml di tampone fosfato 0.1M, pH=7.4 (mimando la concentrazione dell'addotto in soluzione nel vial di marcatura), permette di identificare a 11.20 un picco HPLC corrispondente alla specie HDTCZ libero. La stessa analisi condotta a 216 nm restituisce un'intensità dei picchi corrispondenti alla specie HDTCZ molto meno intensa, rendendo di fatto non possibile effettuare questo tipo di osservazione. 50 μl di entrambe le soluzioni sono state iniettate in HPLC.

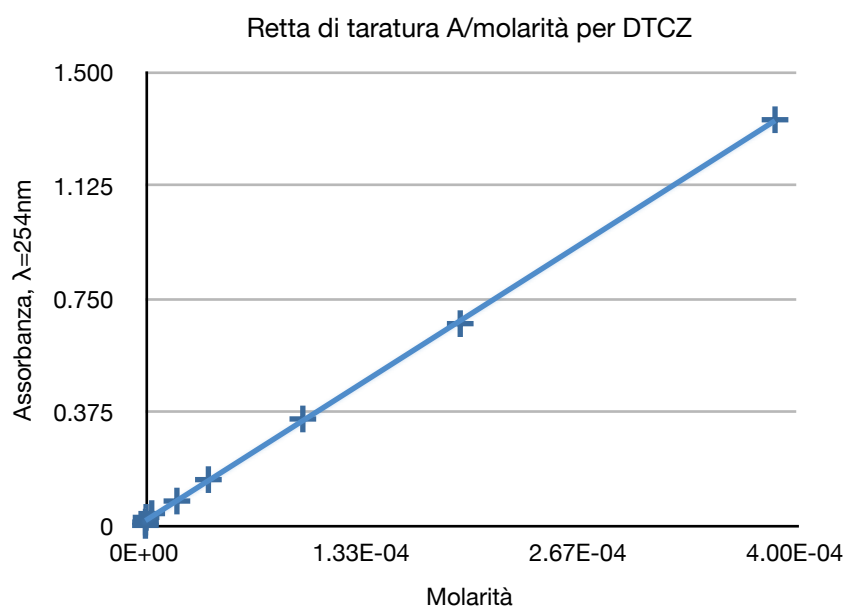


5.0 mg HOOC-PEG600-DTCZ in 1.9ml di tampone



3.0 mg HOOC-PEG600-DTCZ in 1.9ml di tampone

Sfruttando il sistema HPLC, è stata derivata una retta di taratura per la molecola HDTCZ, a 254 nm, registrando l'assorbanza di soluzioni a titolo noto di HDTCZ.



mg DTCZ	mmol DTCZ	M	AU
0.100	0.00073524005588	0.00038696845046	1.34184
0.050	0.00036762002794	0.00019348422523	0.667337
0.025	0.00018381001397	0.00009674211262	0.352049
0.010	0.00007352400559	0.00003869684505	0.151379
0.005	0.00003676200279	0.00001934842252	0.080551
0.001	0.00000735240056	0.0000038696845	0.039051
0.0001	0.00000073524006	0.00000038696845	0.02652
0.000010	0.00000007352401	0.00000003869685	0.010815
0	0	0	0

Con un valore di correlazione $R^2=0.9996$, l'equazione della retta è $y=3477.38x$.

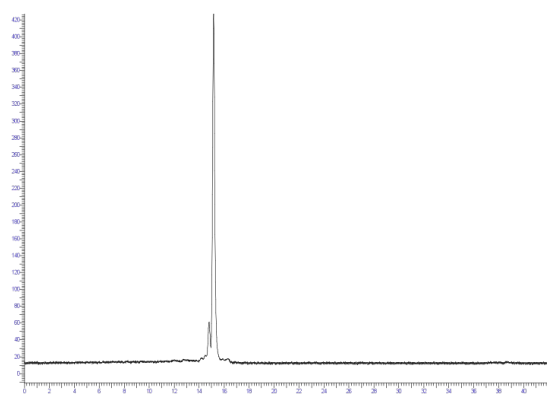
L'assorbanza di HDTCZ nella soluzione ottenuta disciogliendo 5.0 mg HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ in 1.9ml di tampone è 0.096, mentre l'assorbanza di HDTCZ nella soluzione ottenuta disciogliendo 3.0 mg HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ in 1.9ml di tampone è 0.076, a cui corrispondono quantitativi di HDTCZ di 7.11 µg e 5.63 µg rispettivamente, ben superiori alla quota di 1 µg.

La sintesi di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ, ripetuta da partner internazionali, ha portato agli stessi risultati, suggerendo che la purificazione via HPLC preparativo non permetta una completa pulizia dell'addotto HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ da residui di HDTCZ. Quest'ultimo è d'altra parte non apprezzabile alla spettroscopia UV a 216 nm così efficientemente di quanto lo sia a 254nm. La natura chimica di HDTCZ lo rende non rilevabile dai comuni strumenti ESI-MS+ con *cut-off* a circa 100 Dalton. HDTCZ è presente in concentrazioni così basse da non essere attivo alla spettroscopia NMR. Queste osservazioni implicano che la presenza, anche se in bassissime concentrazioni, di HDTCZ lo renda comunque attivo e potenzialmente in grado di agire come donatore di nitruri e facilmente spiazzabile per effetto di massa.

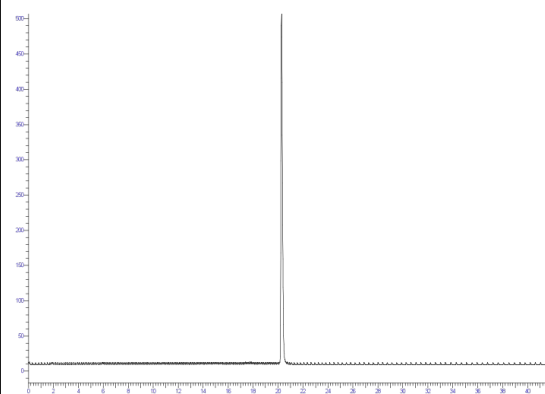
NOTA-NAP-NS1 marcato con teragnostici PET

La difficile traduzione del paradigma di sintesi dal ^{99m}Tc al ¹⁸⁸Re ha permesso di identificare nel chelante azamacrociclico NOTA un sistema di marcatura di radionuclidi positrone-emettitori coniugabile alla sequenza peptidica NAP-NS1nc, sintetizzata appositamente senza l'amminoacido cisteinico terminale. La rapida procedura di coniugazione, versatile per la disponibilità del prodotto commerciale p-SCN-Bn-NOTA, permette di ottenere in tempi brevi l'addotto pronto per essere sottoposto agli studi di macatura, con ⁶⁴Cu e ⁶⁸Ga, coppia di teragnostici PET.

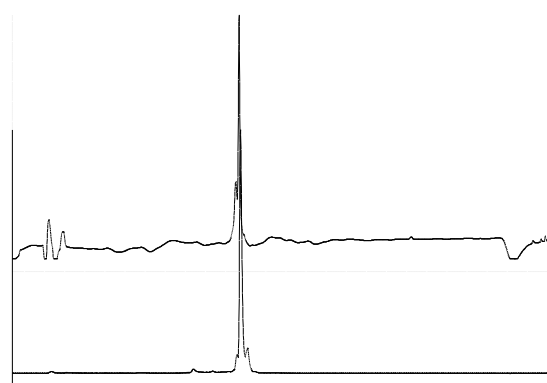
Cu-64	Ga-68
989 µl MES buffer 0.1 M, pH=6.5	100 µl MES Buffer 1M, pH=6.5
1 µl NAP-NS1-NOTA dissolved in 1 µl H ₂ O	1 µg NOTA-NAP-NS1 dissolved in 1 µl H ₂ O
50 µl Cu-64 (~100 MBq, 5 h after EOB)	25 µl Ga-68 (~115 MBq)
30 min, 30 °C	15 min, RT
	20 µl Na ₂ EDTA 7.5 mM
	15 min, RT
RCY> 97%, R _T =15.4 min	RCY> 99%, R _T =20.2 min



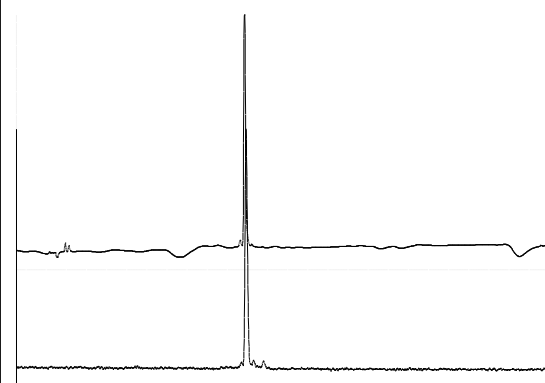
^{64}Cu -NOTA-NAP-NS1nc



^{68}Ga -NOTA-NAP-NS1nc



Coiniezione ^{64}Cu /Cu-NOTA-NAP-NS1nc



Coiniezione ^{68}Ga /Ga-NOTA-NAP-NS1nc

Tabella C4.9. Profili Radio-HPLC di NAP-NS1nc marcato con ^{64}Cu e ^{68}Ga .

C5 Conclusioni

Nella terza Sezione di questo lavoro di tesi si sono valutate le caratteristiche radiochimiche e le proprietà biologiche in vitro ed ex vivo di *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})^+$ e del più idrofilico *syn/anti*- $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP43})(\text{NAP-NS1,2})^+$, quali possibili agenti target-specifici per la visualizzazione di cellule tumorali esprimenti il recettore della melanocortina di tipo 1 (MC1).

I radiocomplessi sono stati sintetizzati in alta resa, impiegando basse concentrazioni di peptide NAP-NS1,2 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.

syn/anti- $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})^+$ sono risultati mediamente inerti nei confronti di reazioni di transchelazione e studi condotti in liquidi biologici hanno rivelato una buona stabilità verso reazioni di idrolisi enzimatica.

syn/anti- $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{NAP-NS})^+$ sono stati valutati dal punto di vista biodistributivo in ratti sani al fine di valutarne il profilo farmacocinetico.

Lo studio raccolto in questa Sezione ha inoltre valutato il trasferimento della tecnologia del frammento metallico $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$ alla sintesi di analoghi azoturo complessi dissimetrici di Re-188, del tipo $^{188}\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})(\text{PNP})(\text{Cys}\sim)]^{+0}$. Questi composti presentano un core azoturo $\text{Re}^{\text{V}}(\text{N})$ 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 NAP-NS1,2), 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 non hanno permesso di ottenere i complessi in studio in alta resa: condizioni di reazione che richiedono bassi valori di pH (3.4-3.6) ed alta temperatura (100 °C) non sono immediatamente applicabili alla marcatura di molecole biologicamente attive, come peptidi.

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 eventuali composti nei liquidi biologici in vitro, nonché il profilo farmacocinetico e farmacodinamico in vivo.

La valutazione di un nuovo potenziale donatore di gruppi nitrato, HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ, ha permesso di comprendere ancor più come la diidrazide succinica rappresenta il donatore di nitrati di prima scelta per l'ottenimento dell'intermedio $^{99m}\text{Tc}(\text{N})]^{2+}_{\text{int.}}$, in accordo ai dati di letteratura e nel rispetto dei fondamenti teorici del metodo sintetico. Il "kit SDH" permette l'ottenimento del complesso $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP3})(\text{NAC-Cys})$ con una RCY del 92.676%.

HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ presenta un'impurità di HDTCZ in concentrazioni sufficienti a garantirne un ruolo attivo nella riduzione di $[^{99m}\text{Tc}(\text{VII})\text{O}_4]^-$ a $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})]^{2+}_{\text{int.}}$. Conclusioni medesime sono emerse dalla sintesi di una seconda preparazione di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ operata da partner internazionali. E' impossibile stabilire se HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ possa essere una sorgente di gruppi azoturo.

Non essendo rilevabile a 216 nm, esiste la possibilità che le osservazioni di Duatti si basino su HDTCZ e non sull'addotto HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ. Da un punto di vista chimico, HDTCZ espone un azoto idrazinico analogamente a SDH, mentre nel coniugato con un PEG₆₀₀, lo stesso azoto idrazinico è impiegato in un legame carboamidico, la cui lisi è difficilmente ipotizzabile.

1 solo μg di HDTCZ diluito in 1.9 ml di tampone fosfato permette l'ottenimento del complesso $[^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NAC-Cys})(\text{PNP3})]$ ad una RCY del 91.259%. Il dato didatticamente ne esprime il potere nei confronti di un centro metallico.

Dai dati ottenuti, non è pensabile che un impiego di HOOC-PEG₆₀₀-DTCZ per l'ottenimento dell'intermedio $[^{188}\text{Re}(\text{N})]^{2+}_{\text{int.}}$ possa essere vincente assicurando risultati di successo.

Al momento attuale, non è quindi possibile un trasferimento della chimica di coordinazione dal ^{99m}Tc al ^{188}Re per l'ottenimento di analoghi terapeutici o teragnostici.

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 ¹¹¹indium-capromab pentetide immunoscintigraphy in the prediction of lymph 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. Gohlke, H. Palmedo, H. J. Biersack, *Appl. Radiat. Isot.*, **1998**, 49, 309.
- [5] S. Liu, "The role of coordination chemistry in the development of target-specific 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 \equiv N multiple bond from ammonium pertechnetate with S-methyldithiocarbamate 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

Cys	L-Cisteina
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-L _n	generico legante bidentato con atomi coordianti ditiocarbammici
DTCZ	S-metil-2-metilditiocarbazato
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
Gly	glicina
GSH	glutazione
HEPES	acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico
H ₂ PNPH 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
PNP10	N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]metossietilammina
PNP43	N,N-bis-[di(metil)fosfinoetil]metossietilammina
RCP	purezza radiochimica
RCY	resa radiochimica
SDH	succinil di-idrazide
NaCl 0.9%	soluzione fisiologica, [NaCl]=0.9%
NAP-NS1	H-Cys-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH ₂
NAP-NS1nc	H-Ahx-βAla-Nle-Asp-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Gly-NH ₂
NAP-NS2	H-Cys-Ahx-βAla-c[Lys-Glu-His-(D)-Phe-Arg-Trp-Glu]-Arg-Pro-Val-NH ₂
NMP	N-metil pirrolidone

