UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

CHELANTI PER RADIO UTILIZZABILI IN RADIOFARMACIA: RICERCA BIBLIOGRAFICA

Relatore: Prof. Valerio Di Marco

Laureando: Edoardo Bigolin
1217910

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1 INTRODUZIONE 3

1.1 Radioattività e radiofarmacia 3
1.1.1 Particelle β^- 3
1.1.2 Particelle α 4

1.2 Radiofarmaci *metal-based* 5

1.3 Il radio 5
1.3.1 La chimica del radio 6

1.4 Scopo della tesi 7

2 CHELANTI PER IL RADIO 9

2.1 Acidi carbossilici 9

2.2 Eteri corona 13
2.2.1 Macropa 13
2.2.2 Macropa-β-alanina 15
2.2.3 Macropa-DUPA 17

2.3 Calixareni 19

2.4 Nanozeoliti 23
2.4.1 NaA nanozeolite 23
2.4.2 Nanozeolite-PEG 23
2.4.3 Nanozeolite-SP(5-11) 25
2.4.4 Nanozeolite-D2B 25

3 CONCLUSIONI 27

1 Introduzione

1.1 Radioattività e radiofarmacia

Alcuni nuclei sono detti "radioattivi" in quanto, essendo instabili, si trasformano in nuclei differenti attraverso un processo detto "decadimento". Durante il loro decadimento, i nuclei radioattivi possono emettere una notevole varietà di particelle o di radiazioni; le più comuni sono le particelle α (nucleo di elio), le β^- (elettrone), le β^+ (positrone) e la radiazione γ (gamma). Le prime due, scoperte da Rutherford nel 1898, sono di interesse in ambito terapeutico, soprattutto nelle malattie oncologiche, poiché rappresentano un agente terapeutico estremamente efficace contro le cellule cancerogene. L'approccio che prevede l'utilizzo di vettori radioattivi a scopo terapeutico ha portato allo sviluppo di un'importante branca della medicina: la radiofarmacia. I radiofarmaci sono quindi dei composti contenenti nuclei radioattivi che, se utilizzati a scopo terapeutico, devono essere degli emettitori di particelle α oppure β^-.
Queste particelle hanno una forma corpuscolare, posseggono un elevato potenziale di ionizzazione (in quanto presentano un elevato trasferimento di energia lineare - *linear energy transfer*, LET) e una bassa capacità penetrante. Di conseguenza esse hanno una grande capacità di danneggiare i tessuti biologici che si trovano prossimi alla fonte di emissione [1].
Da un punto di vista biologico, l'irradiazione delle cellule attraverso particelle α o β^- provoca degli effetti diretti e indiretti. Tra i primi vi sono l'effetto *crossfire* e danni al DNA, mentre tra i secondi vi sono gli effetti tossici delle specie altamente reattive di ossigeno (ROS) generate dalla radiolisi dell'acqua, e il cosiddetto effetto spettatore (dove le cellule non irradiate vicinali a quelle irradiate mostrano gli stessi fenomeni di queste ultime, *radiation induced bystander effect*, RIBE). Questi possibili danni biologici sono quantificati dall'efficacia biologica relativa (*relative biological effectiveness*, RBE), che è un parametro di importanza fondamentale per calcolare la dosimetria poiché stima l'effetto radiobiologico. L'RBE è definito come il rapporto delle dosi richieste di due radiazioni per ottenere la stessa risposta biologica [2].

1.1.1 Particelle β^-

Le particelle β^- presentano una LET moderata (0.2 keV μm^{-1}). L'interazione delle particelle β^- con le cellule causa quindi nella maggior parte dei casi una singola rottura del DNA, e vi è un'elevata probabilità da parte della cellula di riparare questo danno. Di conseguenza è necessario un numero elevato di particelle β^- per raggiungere la saturazione del sistema di riparazione della cellula o per causare molteplici rotture singole al DNA che hanno lo stesso effetto della rottura doppia, ovvero quello di indurre la morte cellulare. Oltre che mediante la ionizzazione diretta, le particelle β^- possono indurre la morte cellulare anche aumentando la concentrazione intracellulare dei ROS (stress ossidativo) che a loro volta hanno un impatto su biomolecole come lipidi, proteine e in particolare DNA. Inoltre, le particelle β^- possono percorrere una distanza relativamente lunga a livello tissutale (1-10 mm), e ciò permette di irradiare da remoto le cellule maligne non legate direttamente all'emettitore, proprietà che le rende utili in masse tumorali ampie. Questo approccio può però portare al danneggiamento dei tessuti

sani prossimali a quelli tumorali soprattutto se i *cluster* tumorali sono sparpagliati oppure sono microscopici [2].

1.1.2 Particelle α

Le particelle α presentano una LET molto più elevata di quella delle particelle β^- (100 keV μm^{-1}), poiché la massa e la carica (2+) del nucleo di ^4He che viene emesso impatta direttamente con il DNA. Si ha un'elevata probabilità di doppia rottura di quest'ultimo, maggiore che non nel caso di irraggiamento con particelle β^-; di conseguenza le particelle α risultano maggiormente citotossiche delle β^-. Di converso, le particelle α possono percorrere una distanza molto più breve delle β^- a livello tissutale (50-100 μm); ciò può essere visto come un vantaggio dal momento che viene ridotto l'irraggiamento dei tessuti sani vicinali limitando quindi gli effetti collaterali. Inoltre, queste caratteristiche rendono gli emettitori α particolarmente efficaci per il trattamento di piccoli tumori, metastasi disseminate e cellule cancerogene isolate. È stato stimato che è sufficiente una sola particella α per uccidere una cellula, mentre sono necessarie centinaia di particelle β^- per ottenere lo stesso effetto [3]. Si parla quindi di *targeted alfa therapy* (TAT) per indicare l'utilizzo di emettitori α aventi lo scopo di colpire dei *target* (bersagli) cellulari molto specifici.

Sia tra i nuclidi naturali, sia soprattutto tra quelli producibili artificialmente, sono numerosissimi gli emettitori α che potrebbero essere utilizzati in radiofarmacia per la TAT; tuttavia, la loro effettiva applicabilità è subordinata a svariati requisiti che i nuclidi stessi devono necessariamente presentare.
Innanzitutto, l'emivita del nuclide deve essere sufficientemente lunga per permettere la radiosintesi, il trasporto ed essere compatibile con la farmacocinetica in funzione della localizzazione del tumore, ma non troppo lunga per non causare un irraggiamento eccessivamente prolungato al paziente. I tempi di decadimento ottimali devono essere compresi tra (molti) minuti e (poche) settimane. Anche la sequenza di decadimento di un emettitore α deve essere valutata attentamente, perché un nuclide figlio prodotto dal decadimento può slegarsi dal radiofarmaco, data l'elevata energia posseduta dal nuclide stesso dopo l'emissione della particella, e dispendersi in maniera incontrollata nell'organismo; ciò comporta che l'emissione di radioattività non avvenga nel sito di interesse, e quindi che siano danneggiati dei tessuti non bersaglio. Un'altra caratteristica importante è che un singolo decadimento produca più particelle α, perché in tal modo gli effetti tossici sulle cellule cancerogene sono più significativi. E ancora, la co-emissione di un fotone gamma (γ) durante il decadimento α può essere di estremo interesse, poiché la radiazione γ, se di energia adatta, può essere utilizzata per eseguire un *imaging in vivo* (mediante SPECT), cioè per poter valutare più facilmente la farmacocinetica e la dosimetria [3].
Altri fondamentali aspetti che devono essere valutati affinché un emettitore α possa essere usato per la TAT sono la sua facilità di sintesi, i costi della sintesi e la purezza del prodotto ottenuto.

1.2 Radiofarmaci *metal-based*

Di norma, i radionuclidi non possono essere utilizzati come tali in radiofarmacia (ad esempio come sali inorganici), in quanto essi finirebbero per localizzarsi su siti quasi invariabilmente *non-target*. Per rendere i radiometalli utili nella terapia (o nella diagnosi) è necessario incorporarli in una molecola che sia costituita da tre componenti legati tra di loro. Il primo componente è l'agente targetizzante, cioè un peptide, una proteina, un anticorpo, o anche un piccolo composto organico, che abbia un'elevata affinità per qualche recettore sovra-espresso dalle cellule tumorali *target*, e che quindi tenda a localizzarsi su di esse. Un altro componente fondamentale del radiofarmaco è l'agente chelante, che svolge il ruolo di legare lo ione metallico attraverso la formazione di un complesso, costringendo così il radiometallo a seguire l'intera molecola fino al sito *target*. Infine, il radiofarmaco contiene di solito un terzo componente, il *linker*, che separa il chelante dall'agente targetizzante e impedisce ad ognuno di influenzare negativamente le proprietà dell'altro.
I chelanti devono presentare a loro volta alcune caratteristiche poiché, come detto, svolgono il ruolo molto delicato di impedire al radiometallo di distribuirsi in maniera non voluta. La prima è la capacità di complessare il metallo velocemente e in condizioni blande (pH fisiologico e temperatura ambiente); se, infatti, la formazione del complesso fosse lenta, si perderebbe inutilmente una parte della radioattività, mentre se richiedesse condizioni drastiche si potrebbe avere la degradazione dell'agente targetizzante. La seconda caratteristica necessaria è che il complesso formato sia cineticamente e/o termodinamicamente stabile nel sangue, per evitare il rilascio del radiometallo *in vivo* [4].

1.3 Il radio

Il radio è un metallo alcalino-terroso originato dal decadimento di ^{235}U, ^{238}U e ^{232}Th. Sono conosciuti 33 isotopi, ma solamente 4 sono presenti naturalmente: ^{223}Ra ($t_{1/2}$ = 11.4 giorni), ^{224}Ra ($t_{1/2}$ = 3.63 giorni), ^{226}Ra ($t_{1/2}$ = 1600 anni) e ^{228}Ra ($t_{1/2}$ = 5.75 anni), che si ottengono rispettivamente dal decadimento di ^{235}U, ^{232}Th, ^{238}U e ^{232}Th. I tempi di decadimento di ^{226}Ra e ^{228}Ra sono troppo lunghi, per cui questi due isotopi non sono di interesse in radiofarmacia. Per quanto riguarda gli altri due, si deve considerare che nella catena di decadimento di ^{224}Ra viene prodotto ^{220}Rn ($t_{1/2}$ = 56 s) sotto forma di gas che può ridistribuirsi nell'organismo e danneggiare i tessuti sani. ^{223}Ra rappresenta quindi l'unico isotopo di interesse per la TAT.
Sebbene come detto ^{223}Ra sia prodotto dal decadimento di ^{235}U, maggiori quantità si possono ottenere dal decadimento di ^{227}Th ($t_{1/2}$ = 18.7 giorni), che a sua volta è prodotto da ^{227}Ac ($t_{1/2}$ = 21.77 anni). Dal momento che ^{227}Ac è presente solo in tracce in minerali di uranio e torio, tale nuclide precursore viene sintetizzato principalmente da irraggiamento di ^{226}Ra in un reattore nucleare.
La catena di decadimento che vede coinvolto ^{223}Ra è mostrata in Figura 1. Durante il suo decadimento, che termina con ^{207}Pb, vengono emesse quattro particelle α, due particelle β^- e un fotone γ per un totale di 28 MeV. Si può notare che viene prodotto anche il gas ^{219}Rn, il quale in linea di principio può ridistribuirsi come il ^{220}Rn prima citato. Tuttavia, ^{219}Rn ha un'emivita 14 volte minore di ^{220}Rn ($t_{1/2}$ = 3.96 s *vs.* 56 s), per cui la sua redistribuzione nell'organismo è molto più limitata. Data la breve emivita dei primi tre stadi di decadimento che portano alla produzione di tre particelle α, si può

assumere che queste siano emesse quasi istantaneamente; la dose di radiazioni sarà dunque in prossimità del sito di interesse anche se i nuclidi figli dovessero separarsi dal radiofarmaco [2].

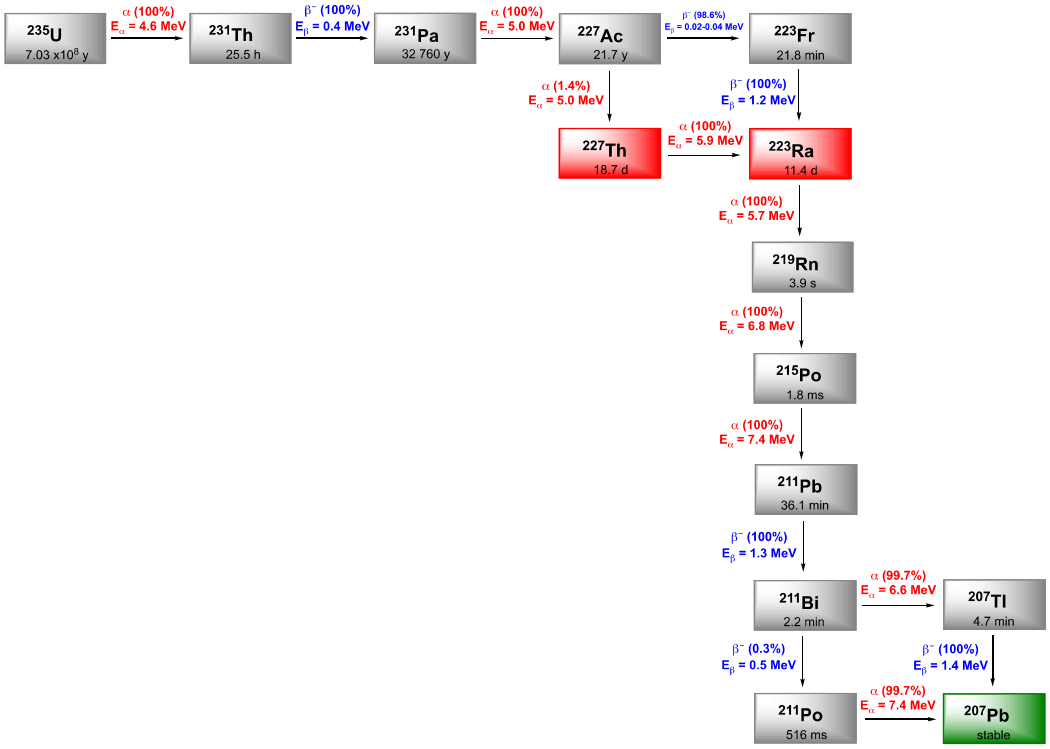


Figura 1 Schema di decadimento e produzione di ^{223}Ra (tratta da [2]).

Recentemente la FDA (*food and drug administration*) ha approvato l'utilizzo di $^{223}RaCl_2$ (Xofigo®) per il trattamento palliativo di metastasi ossea da tumore prostatico. L'utilizzo di un semplice sale inorganico è stato reso possibile dal fatto che il radio, come tutti i metalli alcalino-terrosi, tende naturalmente a localizzarsi nel comparto osseo una volta che è stato assunto.

1.3.1 La chimica del radio

La chimica del radio è analoga a quella del bario; quest'ultimo non è radioattivo e quindi viene spesso utilizzato come surrogato del primo in studi di tipo chimico.
Il radio metallico è morbido e lucente, ma è altamente reattivo. In soluzioni acquose, in particolare, il metallo reagisce con acqua producendo idrogeno e $Ra(OH)_2$; nonostante la seconda entalpia di ionizzazione sia circa il doppio della prima, il metallo in ambiente acquoso si trova solamente nello stato di ossidazione 2+. Lo ione Ra^{2+} presenta dimensioni notevoli e quindi una densità di carica molto bassa; pertanto, è relativamente difficile da complessare in quanto i chelanti normalmente utilizzati dai chimici sono tali da preferire cationi di piccole dimensioni e di densità di carica maggiore [5].
Gli unici composti del radio commercialmente disponibili sono il cloruro di radio e il bromuro di radio (rispettivamente $RaCl_2$ e $RaBr_2$). Entrambi sono molto solubili in soluzione acquosa e tendono a precipitare quando aumenta la concentrazione dei loro acidi minerali. Anche il nitrato di radio ($Ra(NO_3)_2$) è solubile in acqua, però è meno solubile rispetto agli alogenuri, e soprattutto risulta estremamente insolubile in presenza di acido concentrato (80% HNO_3): tale proprietà può essere sfruttata per separare Ra(II)

da altri cationi. Il radio può essere isolato anche mediante precipitazione di un suo sale insolubile (es. solfato e carbonato). Il solfato di radio ($RaSO_4$) è insolubile in acqua e può essere usato per precipitare selettivamente il radio aggiungendo acido solforico a una soluzione contenente un sale solubile. La maggior parte dei metalli rimane solubile in presenza di acido solforico mentre il solfato di radio precipita quando l'acido viene diluito [5].

1.4 Scopo della tesi

Le favorevoli proprietà radioisotopiche di ^{223}Ra, unite all'efficacia di $^{223}RaCl_2$ nel trattamento anticancerogeno in cui è impiegato, hanno suscitato un notevole interesse in ambito radiofarmaceutico. L'obiettivo è quello di utilizzare tale radionuclide per trattare svariate tipologie di tumore mediante TAT. A tale scopo, però, il radio deve essere legato ad un radiofarmaco, ed è quindi necessario disporre di chelanti adatti per tale radionuclide.

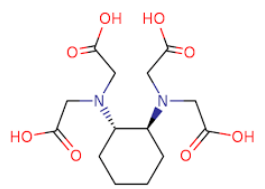
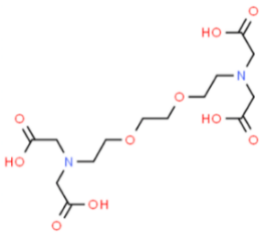
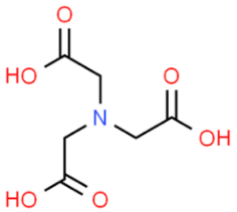
Lo scopo di questa tesi è condurre una ricerca bibliografica per evidenziare quali chelanti sono stati proposti per il radio in ambito radiofarmaceutico.

2 Chelanti per il radio

2.1 Acidi carbossilici

Matyskin [6] ha recentemente studiato la stabilità dei complessi di bario e radio con EDTA a due diversi pH ed in funzione della forza ionica (0.2-2.5 mol/L).
La costante di stabilità del complesso [$RaEDTA^{2-}$] è risultata essere $\log_{10} K^0 = 9.13$. Altri dati precedenti disponibili in letteratura, corretti a forza ionica nulla, sono in accordo con questo valore e sono i seguenti: $\log_{10} K^0 = 9.22\,; 9{,}2\,; 8.9\,; 9.09$; il valore medio risulta $\log_{10} K^0 = 9.11 \pm 0.25$. Sebbene alcuni dei dati mediati siano stati ottenuti a 20 °C anziché (come di norma) a 25 °C, si può osservare che l'effetto della temperatura sia sostanzialmente trascurabile rispetto all'incertezza della misura, e si può anche concludere che valori simili di stabilità possano essere prevedibili anche alla temperatura fisiologica di 37 °C. Sono state determinate inoltre le costanti di stabilità con numerosi altri chelanti dello stesso tipo, mostrati in Tabella 1. Questi includono acido cicloesil-1,2-diammino N,N,N',N' tetraacetico (CyDTA), acido dietilentriammino-N,N,N',N",N"-pentaacetico (DTPA), acido nitrotriacetico (NTA), acido etilenglicole triacetico (EGTA), il 1,4,7,11-tetraazaciclododecano – 1,4,7,11-tetraacetico (DOTA), e un derivato carbossilico calixarenico. Sono anche stati studiati i complessi formati dagli acidi tartarico (Tar), malico (Mal), citrico (Cit), succinico (Suc), aspartico (Asp), piruvico (Pyr), gliossilico (OxAc), fumarico (Fum) e salicilsolfonico ($SalSO_4$) [7]. La Tabella 2 riassume i risultati ottenuti per alcuni di questi composti.

Tabella 1 Nome e struttura degli acidi carbossilici proposti come chelanti per il radio(II).

Nome	Struttura
CyDTA	
EGTA	
NTA	

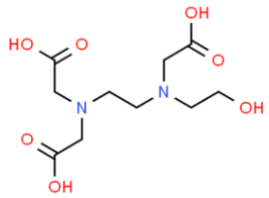
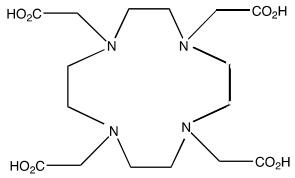
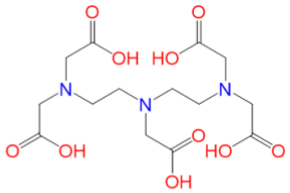
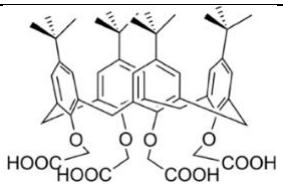
EDTA	
DOTA	
DTPA	
Acido calix[4]arene tetraacetico	

Tabella 2 Confronto delle costanti di solubilità e stabilità del radio, bario e stronzio con vari chelanti a 25°C e forza ionica nulla (tratta da [7]); ([a])nonostante i valori siano inferiori delle rispettive costanti del Ba, la stabilità della serie dei metalli alcalini terrosi suggerisce come le costanti riferite al Ba dovrebbero essere maggiori rispetto a quelle del Ra (vedi testo); ([b]) Stimate in modo incerto in questo studio; ([c]) Costante di stabilità o solubilità stimate

Species	$\log_{10} K^{\circ}$				References for Ba	References for Sr
	Ra	Ba (Ba > Ra)	Ba (Ba < Ra)	Sr		
MOH^+	0.57 ± 0.23	0.67 ± 0.07		0.84 ± 0.05	[15]	[15]
$MSO_4(aq)$	2.61 ± 0.33		2.40 ± 0.10[b]	2.21 ± 0.11	[19, 40]	[40, 56]
$MCO_3(aq)$	2.53 ± 0.14	2.56 ± 0.10[b]		2.81 ± 0.10[b]	[16]	[57]
$MEDTA^{2-}$	9.11 ± 0.25	9.86 ± 0.11		10.31 ± 0.37	[39]	[58–60]
$MCyDTA^{2-}$	10.09 ± 0.10[b]	9.79 ± 0.10[a,b]		10.71 ± 0.10[b]	[35]	[58]
$MEGTA^{2-}$	9.49 ± 0.10[b]	10.19 ± 0.10[b]			[35]	
$MDTPA^{3-}$	10.74 ± 0.10[b]	11.04 ± 0.10[b]		11.94 ± 0.10[b]	[35]	[61]
$MHEDTA^-$	6.95 ± 0.10[b]	7.55 ± 0.10[b]		8.15 ± 0.10[b]	[35]	[62]
$MNTA^-$	6.45 ± 0.10[b]	6.41 ± 0.10[a,b]		6.73 ± 0.10[b]	[41] (20 °C)	[41] (20 °C)
$MCit^-$	3.73 ± 0.18	4.09 ± 0.05		4.41 ± 0.03	[32, 42, 43]	[33, 63]
MTar(aq)	2.25 ± 0.05	2.64 ± 0.12		2.85 ± 0.29	[33, 44]	[63, 64]
MSuc(aq)	2.03 ± 0.10[b]	2.25 ± 0.11		2.29 ± 0.10[b]	[33, 45]	[45]
$MAsp^+$	1.38 ± 0.10[b]	1.59 ± 0.10[b]		1.93 ± 0.10[b]	[46]	[46]
$MPyr^+$	1.41 ± 0.10[b]					
MFum(aq)	2.63 ± 0.10[b]	2.49 ± 0.10[a,b]			[47]	
MOxAc(aq)	2.83 ± 0.10[b]					
MMal(aq)	1.98 ± 0.10[b]	2.31 ± 0.11		2.45 ± 0.28	[33, 44, 48]	[33, 48]
$MSalSO_4(aq)$	2.93 ± 0.10[b]					
MCl^+	−0.32 ± 0.23	−0.01 ± 0.05		0.21 ± 0.10[b]	[49–51]	[51]
$MSO_4(s)$	−10.24 ± 0.05	−9.96 ± 0.05		−6.62 ± 0.02	[23]	[23]
$MHPO_4(s)$	−7.55 ± 0.05[b]	−7.46 ± 0.05[b]		−6.97 ± 0.11	[27, 28]	[27, 28]
$M(OH)_2(s)$	31.2 ± 0.5[b,c]	30.2 ± 0.2[b]		27.5 ± 0.2[b]	[11]	[11]
$MCO_3(s)$	−7.49 ± 0.10		−8.56 ± 0.02	−9.27 ± 0.02	[23]	[23]
$MCl_2(s)$	0.32 ± 0.10[b]	1.11 ± 0.10[b]			[22]	
$M(NO_3)_2(s)$	−0.60 ± 0.10[b]		−0.84 ± 0.10[b]		[22]	
$M(IO_3)_2(s)$	−8.85 ± 0.10[b]	−8.75 ± 0.10[b]		−6.49 ± 0.08	[22]	[52, 65, 66]
$MBr_2(s)$	1.39 ± 0.20[b]	2.23 ± 0.20[b]			[22]	
$MF_2(s)$	−4.66 ± 0.20[b]		−5.87 ± 0.05	−8.54 ± 0.15	[53–55]	[29, 59, 67]

La Tabella 2 mostra che i chelanti considerati formano tutti dei complessi più stabili con Ba^{2+} che non con Ra^{2+}; inoltre, gli stessi chelanti formano complessi più stabili con Sr^{2+} che non con Ba^{2+}. Ci sono solamente quattro complessi inorganici in cui le costanti di stabilità del bario sono leggermente inferiori rispetto a quelle del radio, ma è probabile che questo risultato sia dovuto all'incertezza della misura.

All'interno di un altro studio sono stati condotti degli esperimenti di confronto tra il complessante lipofilico acido calix[4]arene tetraacetico con DTPA, DOTA (Tabella 1) e Krypto 2.2.2 (Figura 2. Questo chelante è comunemente usato nella sintesi di tracciatori al [^{18}F] in medicina diagnostica, in particolare il suo ruolo consiste nel trasportare lo ione fluoruro per facilitare la reazione [8]). Inizialmente è stato evidenziato che tra la fase acquosa e la fase organica (cloroformio) a pH = 7.4 in assenza di leganti, meno del 2% del Ra^{2+} viene estratto nella fase organica. Successivamente sono stati condotti esperimenti per determinare le costanti di estrazione dei complessanti. Il modello utilizzato prevede di trascurare la solubilità del catione Ra^{2+} in fase organica, che l'unica sostanza estratta con il cloroformio sia il complesso ^{223}Ra-acido calix[4]arene tetraacetico, e che la sua solubilità in acqua sia irrisoria [6] [9].

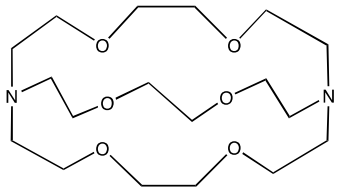


Figura 2 Struttura Kryptofix 2.2.2

I risultati sono mostrati nelle Figure 3 e 4. La pendenza della retta in Figura 3 è prossima a 1, indicando quindi la formazione di un complesso in rapporto 1:1 tra ^{223}Ra e l'acido calix[4]arene tetracetico.

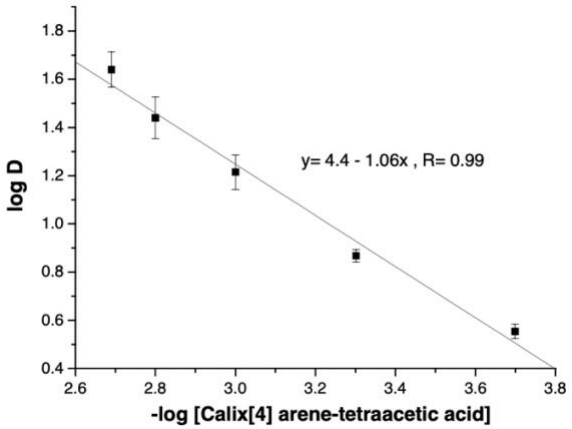


Figura 3 Interpolazione di log(D) in funzione di -log[acido calix[4]arene tetraacetico] (tratta da [9])

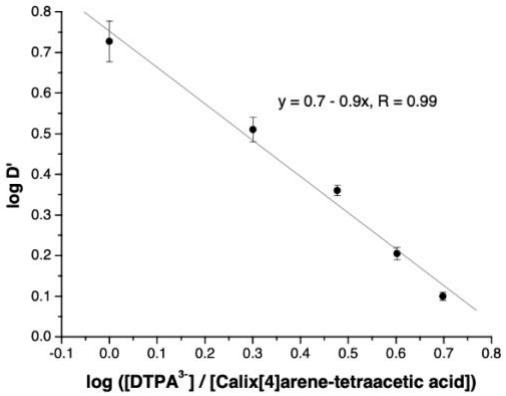


Figura 4 Interpolazione di log(D) in funzione di log([DTPA]/[acido 4-terz butil calix[4]arene tetraacetico), pH 7.4 (tratta da [9])

La linearità delle interpolazioni dei dati mostrati in Figura 4 indica che le approssimazioni sono ragionevoli. La costante di estrazione è stata ottenuta dall'intercetta dell'interpolazione di logD', ovvero dove le concentrazioni di DTPA e acido calix[4]arene tetraacetico sono uguali. Con questa procedura è stata ottenuta una costante di estrazione 5.7 volte maggiore per l'acido calix[4]arene tetraacetico che non per il DTPA. La costante di estrazione per l'acido calix[4]arene tetraacetico è stata determinata allo stesso modo rispetto al DOTA e al Krypto 2.2.2 ottenendo dei valori rispettivamente 2.2 e 3.5 volte maggiori. Questi ultimi due leganti possiedono quindi una capacità complessante per il radio maggiore rispetto al DTPA. Questo dimostra come i macrocicli offrano una maggiore stabilità rispetto ai chelanti a catena aperta. Inoltre, il Krypto 2.2.2 ha dimostrato di possedere una stabilità maggiore rispetto al DOTA probabilmente per presenza di una struttura a ponte e di una cavità adatta ad accogliere il catione Ra^{2+}. In ogni caso l'acido calix[4]arene tetraacetico mostra una capacità complessante molto superiore agli altri leganti con cui è stato confrontato.

È stata valutata anche la stabilità del complesso ^{223}Ra-acido calix[4]arene tetraacetico in presenza di altri cationi, in modo da poter confrontare la loro stabilità relativa e valutare l'inerzia cinetica del complesso del radionuclide di interesse in soluzioni che simulano quelle fisiologiche. La soluzione conteneva 150 mM di sodio e 2.5 mM di potassio, calcio, magnesio e zinco (gli autori [9] non riportano la concentrazione utilizzata di radio; presumibilmente essa è dell'ordine di μM o nM). Dopo 10 minuti, il 35% del radio è stato rinvenuto nella forma libera. Questo dato indica un'inerzia piuttosto modesta del complesso ^{223}Ra-acido calix[4]arene tetraacetico nel dare dissociazione. L'acido calix[4]arene tetraacetico quindi è il migliore complessante per Ra(II) tra quelli testati, ma comunque non è adatto all'utilizzo *in vivo* [9].

2.2 Eteri corona

2.2.1 Macropa

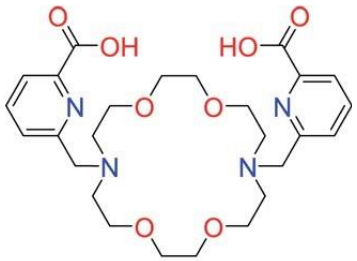


Figura 5 Struttura di macropa (tratta da [10])

Gli eteri corona sono spesso considerati come complessanti di ioni metallici. Nel caso del radio(II) è stato in particolare considerato il macropa, costituito da un *core* 4,13 diaza-18 corona-6 a cui sono legati due sostituenti picolinati. Macropa è un candidato molto promettente come chelante per il radio in quanto possiede ottime capacità di complessare cationi di grandi dimensioni come $^{123/135}La$, ^{225}Ac e Ba^{2+} [10].
In soluzione acquosa, a pH 7.4, il logaritmo della costante di stabilità condizionale del complesso [Ba(macropa)] è 10.74, il che dimostra come tale chelante formi col bario un complesso molto stabile a pH fisiologico. La stessa elevata affinità si riscontra anche con il radio: la formazione del complesso [Ra(macropa)] in condizioni di radiomarcatura (cioè mescolando metallo e chelante come si farebbe prima di somministrare un radiofarmaco) risulta molto rapida anche operando a temperatura ambiente (cioè in condizioni blande), e la percentuale di radio legato al chelante (*radiolabeling efficiency*, RL) è pari al (95 $\pm$1%) (Figura 6a) [10]. Mantenendo la concentrazione di legante maggiore o uguale a 18 μM si osserva una RL superiore all'80% senza variazioni dopo 1 h di tempo (Figura 6a); riducendo invece la concentrazione a valori minori di 18 μM, la RL cala al di sotto del 20%. Ad esempio, per una concentrazione di legante pari a 13 μM la RL è pari al 50% (Figura 6b).
Una volta radiomarcato, il complesso [Ra(macropa)] risultante ha dimostrato di essere piuttosto stabile anche *in vivo* (siero, 37°C). Dopo due ore di incubazione il cromatogramma (Figura 7b) mostra solo un picco, appartenente al complesso (t = 20 min), mentre risulta assente il picco del radio libero che avrebbe dovuto osservarsi a 30 min (Figura 7a). Dopo 12 giorni di incubazione (equivalente all'emivita di ^{223}Ra) [Ra(macropa)] rimane intatto al 90% (Figura 7c).

La stabilità *in vivo* è stata valutata confrontando la biodistribuzione del complesso [Ra(macropa)] con quella dell'unico radiofarmaco attualmente approvato dalla FDA/EMA $[^{223}Ra]RaCl_2$. In accordo con la sua affinità per il tessuto osseo, una quantità significativa di $[^{223}Ra]Ra^{2+}$ proveniente dal cloruro di radio è stata ritrovata nelle ossa (22 $\pm$ 1% IA per g, Figura 8a). L'utilizzo del complesso ha invece portato alla diminuzione di un ordine di grandezza della quantità di $[^{223}Ra]Ra^{2+}$ trovata nelle ossa (1.6 $\pm$ 0.2% IA per g, Figura 8b). Inoltre, la maggior parte di $[^{223}Ra]$[Ra(macropa)] viene rapidamente eliminata dal sangue attraverso secrezioni renali. Dopo 24 h tutti gli organi presentano una quantità di$[^{223}Ra]Ra^{2+}$ trascurabile (Figura 8b). Il basso

assorbimento osseo e la veloce espulsione dall'organismo dimostrano come il complesso sia stabile *in vivo* (Figura 8c).

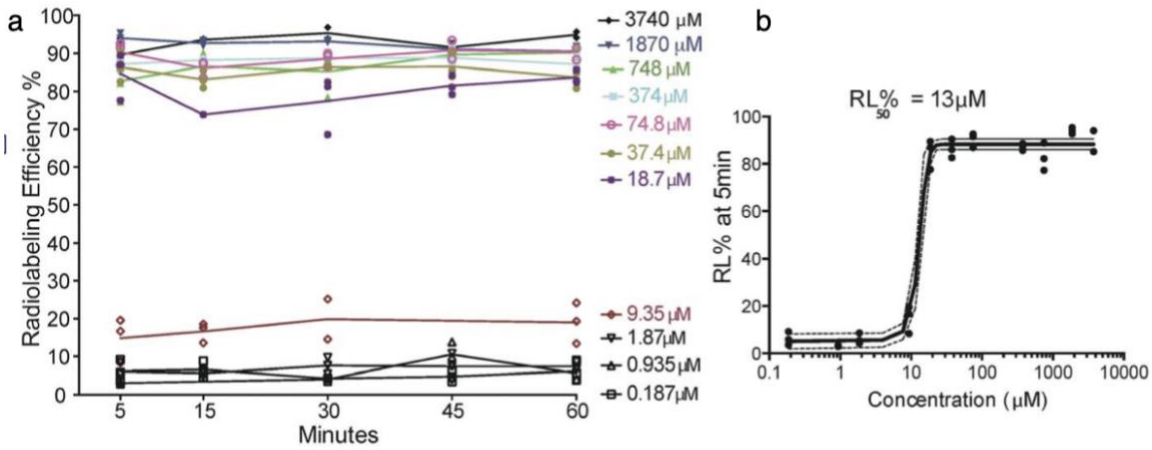


Figura 6 Formazione di [^{223}Ra][Ra(macropa)] in condizioni differenti (a) RL% misurata in funzione del tempo a temperatura ambiente, pH 6, variando la concentrazione di macropa. (b) RL% misurata in funzione della concentrazione di macropa 5 minuti dopo il mescolamento (tratta da [10]).

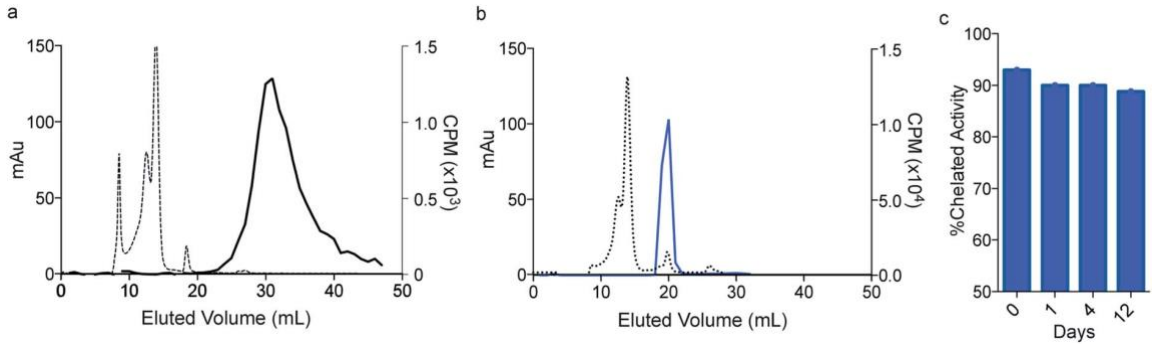


Figura 7 Stabilità in vitro di [^{223}Ra][Ra(macropa). Cromatografia ad esclusione ionica (SEC) di: (a) [^{223}Ra]RaCl$_2$ in siero rilevato a 280 nm (linea tratteggiata) e da contatore gamma (linea continua);(b) [^{223}Ra][Ra(macropa) dopo 2 ore in siero umano;(c) Percentuale di complesso intatto in siero umano durante 12 giorni; (tratta da [10]).

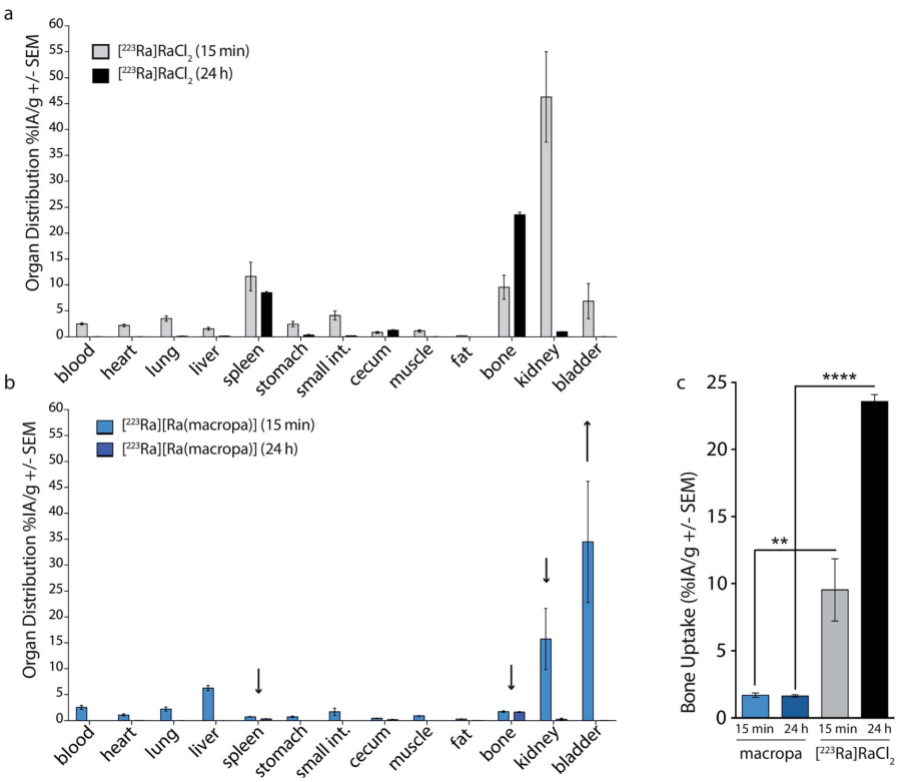


Figura 8 Valutazione della stabilità in vivo di [223Ra][Ra(macropa). Distribuzione nei tessuti (% di radioattività iniettata normalizzata sul peso) dopo 15 minuti e 24 h di (a) [^{223}Ra]RaCl$_2$ e (b) [^{223}Ra][Ra(macropa). (c) Assorbimento osseo di [^{223}Ra] proveniente da [^{223}Ra][Ra(macropa) e da [^{223}Ra]RaCl$_2$, misurato dopo 15 min e 24 h dalla somministrazione (tratta da [10]).

2.2.2 Macropa-β-alanina

Data l'elevata stabilità del complesso [^{223}Ra][Ra(macropa)] *in vivo*, il passaggio successivo consiste nella funzionalizzazione di questo con un agente targetizzante (es. un peptide, una proteina o un anticorpo) per poterlo dirigere verso un sito specifico presente nelle cellule tumorali. Per studiare il comportamento del chelante funzionalizzato, inizialmente è stato preparato un coniugato attraverso la semplice aggiunta di un amminoacido, la β-alanina (Figura 9).

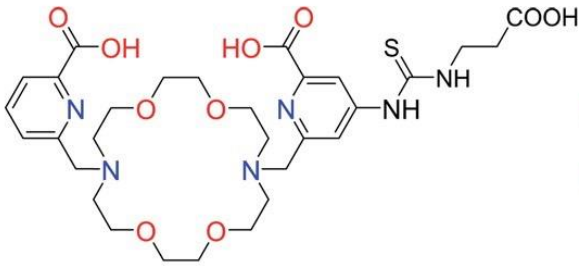


Figura 9 Struttura di macropa-β-alanina (tratta da [10])

Le pK_a del chelante macropa-β-alanina sono molto simili a quelle del chelante non funzionalizzato, ad indicare che la modifica non ha causato effetti significativi nelle

proprietà acido-base del macropa. Anche la costante di stabilità di [Ba(macropa-β-alanina)] (11.06) rimane pressoché invariata rispetto a quella di [Ba(macropa)] (11.11). Il diagramma di distribuzione dei complessi, che mostra la speciazione, conferma la somiglianza dei due sistemi (Figura 10); l'unica differenza è data dal diverso grado di protonazione dei complessi, poiché il derivato sostituito con l'analina possiede un protone acido in più. [Ba(macropa-β-alanina)] è anche cineticamente inerte in quanto rimane intatto in soluzione in presenza di idrossiapatite (*hydroxyapatite, HAP*), il principale componente del tessuto osseo umano. Infatti, quando la concentrazione di complesso è pari a 2.5 μM e vi è una quantità sospesa di HAP 20000 volte superiore, il bario rimane quasi completamente complessato anche dopo molte ore (Figura 11).

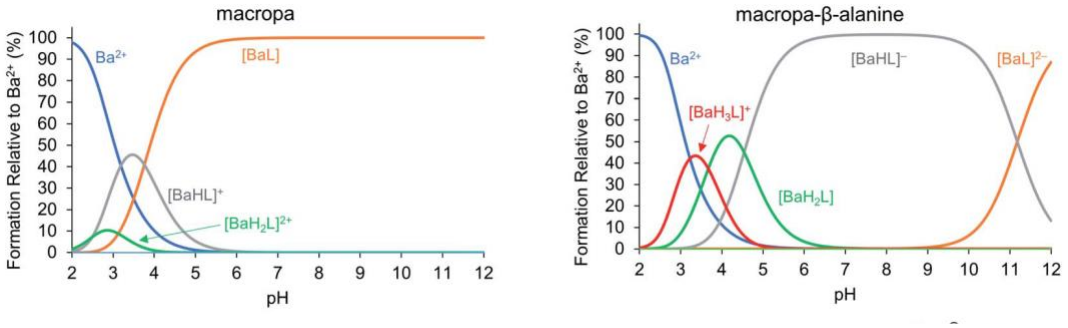


Figura 10 Diagramma di distribuzione di macropa (sinistra) e macropa-β-alanina (destra) in presenza di [Ba^{2+}] = 10 mM (T = 25°) (tratta da [10])

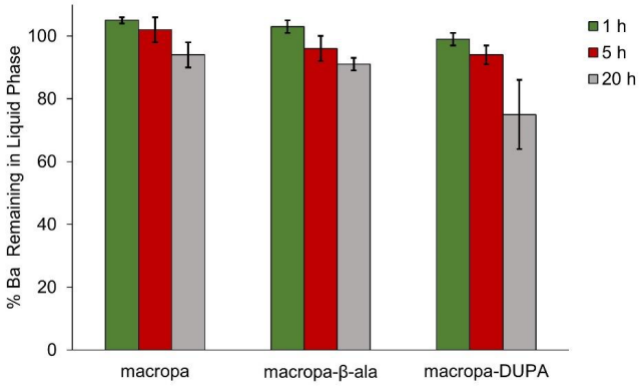


Figura 11 Percentuale di complesso del bario con macropa, macropa-β-alanina e macropa-DUPA rimasta intatta dopo 1 h, 5 h e 20 h in presenza di HAP. In assenza di legante e con le stesse condizioni di HAP il bario non chelato ($Ba(NO_3)_2$) viene completamente assorbito in idrossiapatite in meno di 10 minuti (tratta da materiale elettronico supplementare di [10]).

Macropa-β-alanina, nelle stesse condizioni di macropa, è in grado di complessare [^{223}Ra]Ra^{2+} con una RL superiore al 90%. Anche *in vitro* manifesta la sua stabilità dopo 12 giorni di incubazione con una percentuale di complesso intatto maggiore del 70%.

Similmente a [^{223}Ra][Ra(macropa)], anche [^{223}Ra][Ra(macropa-β-alanina)] mostra una notevole differenza di biodistribuzione se confrontato con [^{223}Ra]$RaCl_2$. Ad esempio,

usando il chelante funzionalizzato, il radio è presente per il 2.69±0.24 % IA per g nelle ossa, mentre usando il sale inorganico tale percentuale aumenta al 9.7±1.7% (Figura 12). Oltre a questo, si assiste ad una riduzione di 5 volte nell'assorbimento splenico e di 7 volte nell'assorbimento renale rispetto al sale.

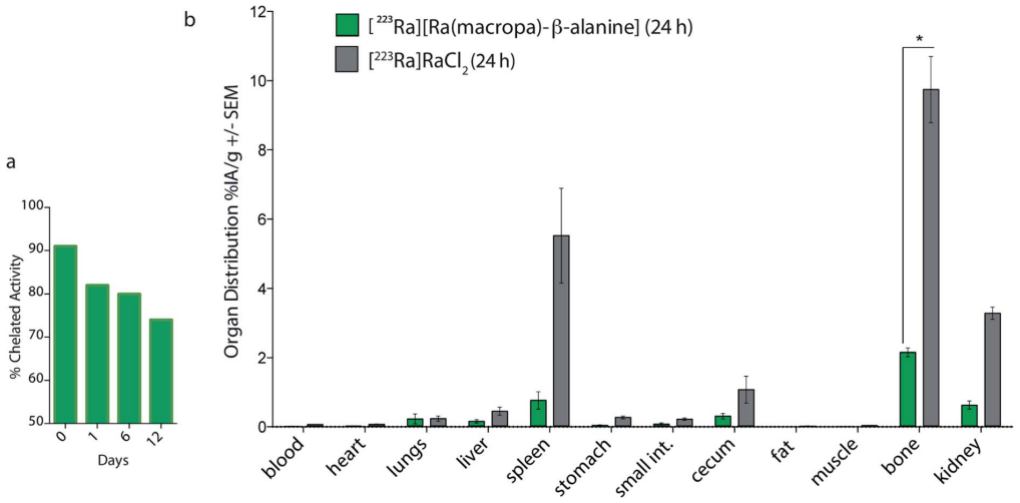


Figura 12 Stabilità in vitro e in vivo di[^{223}Ra][Ra(macropa-β-alanina)]. (a) Stabilità di [^{223}Ra][Ra(macropa-β-alanina)] nel corso di 12 giorni in siero umano a 37°C. (b) Distribuzione negli organi di [^{223}Ra][Ra(macropa-β-alanina)] confrontata con quella di controllo di [^{223}Ra]RaCl$_2$ (tratta da [10]).

2.2.3 Macropa-DUPA

Il completamento dei lavori precedenti è stato rappresentato dalla molecola Macropa-β-DUPA (Figura 13), dove DUPA è un agente targetizzante che si lega con elevata affinità al PSMA (*prostate specific membrane antigen*), ovvero un antigene che viene sovraespresso nelle cellule di adenocarcinoma prostatico.

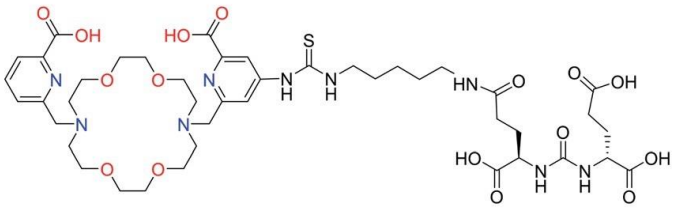


Figura 13 Struttura di macropa-DUPA (tratta da [10])

Macropa-β-DUPA è quindi atteso essere in grado di chelare Ra^{2+}, prevenendo il suo assorbimento in idrossiapatite, e portare il radiometallo al sito *target*.

La RL del complesso [^{223}Ra][Ra(macropa-β-DUPA)] è superiore al 95%, e la stabilità dopo 12 giorni di incubazione in siero a 37 °C è superiore al 90%. Anche la stabilità dimostrata in competizione con HAP è molto vicina a quella del complesso macropa e macropa-β-alanina (Figura 11).
Inaspettatamente, tuttavia, [^{223}Ra][Ra(macropa-β-DUPA)] non ha mostrato differenze nella biodistribuzione rispetto a [^{223}Ra]$RaCl_2$ (Figura 14), indicando che molto probabilmente il complesso degrada *in vivo* [10]. Gli autori non riportano ipotesi che spieghino questo comportamento, ma si limitano ad osservare che la presenza dell'agente targetizzante può talvolta causare questo tipo di problematiche.

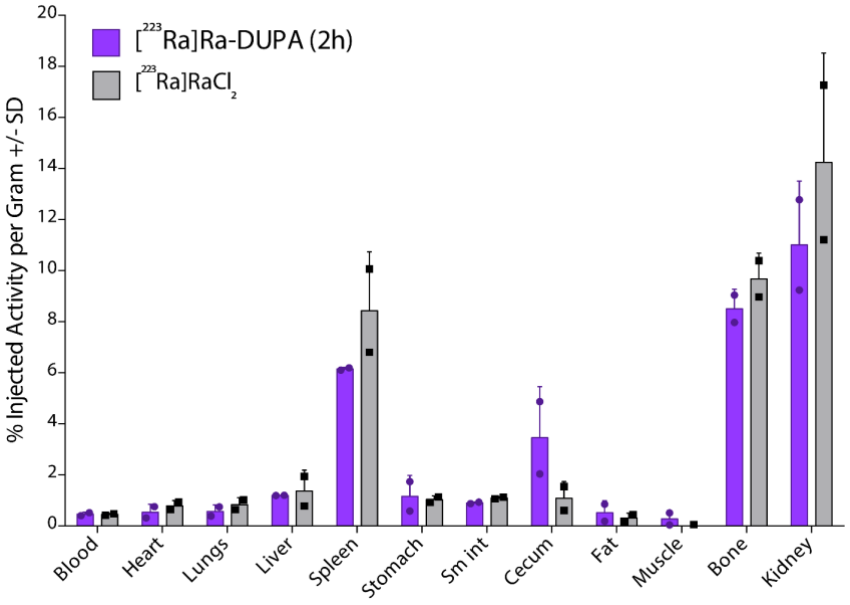
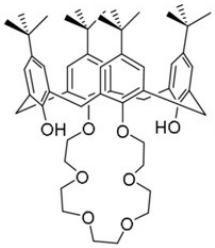
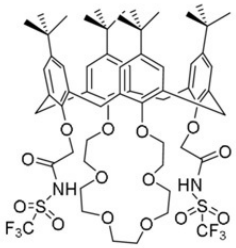
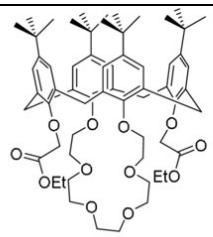
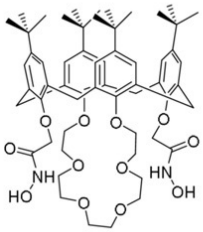
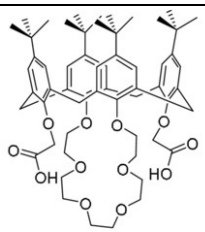
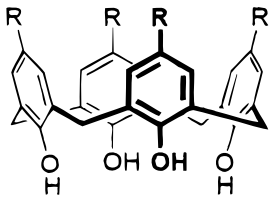
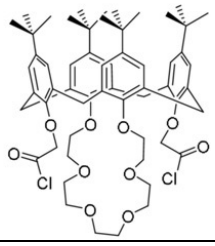
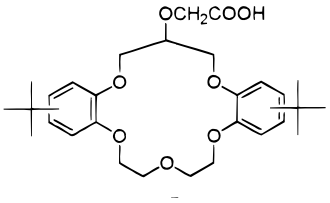


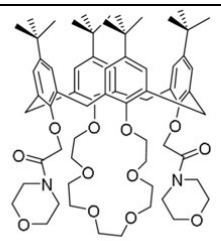
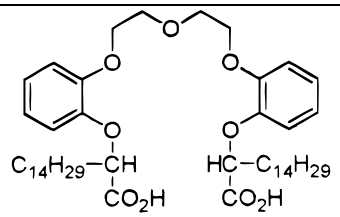
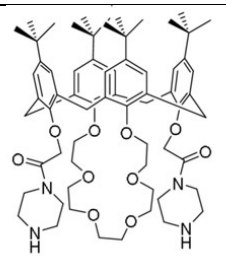
Figura 14 Stabilità di [^{223}Ra][Ra(macropa-β-DUPA)] in vivo valutata confrontando la distruzione negli organi di [^{223}Ra][Ra(macropa-β-DUPA)] con il controllo di [^{223}Ra]$RaCl_2$ (tratta da materiale elettronico supplementare di [10]).

2.3 Calixareni

I calixareni (Tabella 3) sono una classe di composti largamente utilizzati per l'incapsulamento di piccole molecole, ioni, farmaci e biomolecole come amminoacidi o proteine. La combinazione di eteri corona con calixareni comporta nella maggior parte dei casi dei benefici in quanto i primi sono conosciuti per essere ottimi chelanti per ioni metallici mentre i secondi permettono di avere costanti di stabilità e selettività maggiori [11]. Essi sono quindi ottimi candidati come leganti per il radio nella TAT perché mostrano un'elevata capacità complessante nei confronti del bario. In particolare, il *core* di calix[4]arene-corona-6 (comune ai composti numerati da 1 a 8 in Tabella 3) possiede una cavità le cui dimensioni bene si adattano a quelle del radio. Se poi ad essa si aggiungono dei sostituenti deprotonabili, si può prevedere che la loro carica negativa neutralizzi la carica positiva dello ione metallico, e inoltre è stato ipotizzato che essi fungano da "lacci" prevenendo l'uscita dello ione dal complesso.

Tabella 3 Struttura dei chelanti appartenenti ai calixareni (tratta da [11], (') tratta da [12]) (*) Intermedio di sintesi, non studiato perché troppo reattivo.

Riferimento	Struttura	Riferimento	Struttura
1		7	
2*		8	
3		9'*	
4*		10'	

5		11’	
6			

Partendo dal composto 1 (Tabella 3), i due fenoli dei calixareni sono stati sostituiti con gruppi funzionali differenti per modulare le proprietà complessanti del chelante. I risultati ottenuti per quanto riguarda la costante di stabilità col bario(II) (log*K*) sono mostrati in Tabella 4.

Tabella 4 Costanti di stabilità dei complessi con Ba^{2+} per i calixareni da 1 a 8 mostrati in Tabella 3 (tratta da [11]). [a] Dato proveniente da [13]]

Complex	R	log*K*
[Ba-1][a]	H	4.6 ± 0.1
[Ba-1]	H	4.1 ± 0.4
[Ba-3]	CH_2COOH	4.3 ± 0.2
[Ba-5]	$CH_2CON(C_2H_4)_2O$	4.2 ± 0.2
[Ba-6]	$CH_2CON(C_2H_4)_2NH$	4.2 ± 0.1
[Ba-7]	$CH_2CONHSO_2CF_3$	> 5
[Ba-8]	$CH_2CONHOH$	> 5

L’aggiunta di sostituenti con ingombro sterico elevato non sembra avere un’influenza significativa rispetto alla stabilità del legante 1. Un impatto significativo sulla costante si riscontra invece dopo l’aggiunta di gruppi deprotonabili, come dimostrato dai chelanti 7 e 8 (Tabella 4).
Alcuni dei composti in Tabella 3 sono stati poi testati con il radio. La Figura 15 mostra le percentuali di estrazione di ^{223}Ra con diversi complessanti in funzione del pH. Intorno a pH 8 la percentuale di estrazione per i leganti 3 e 8 è pressoché pari al 100%, per poi diminuire sopra a pH 9.5. A valori di pH maggiori il radio si trova sotto forma di $Ra(OH)^+$, cioè vi è una competizione tra chelante e ione idrossido che vede quest'ultimo gradualmente prevalere sul primo all'aumentare del pH. Anche il complesso 11’, che è un polietere aciclico con due acidi carbossilici, ha mostrato un’elevata percentuale di estrazione per il Ra^{2+} nell'intervallo di pH studiato. Il legante 10’, che invece è un etere ciclico mono carbossilico, ha mostrato una scarsa capacità estraente.

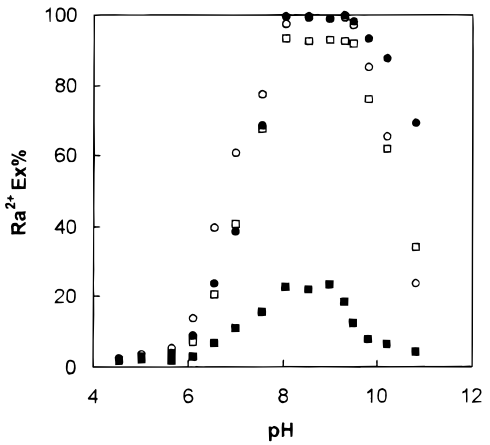


Figura 15 Estrazione con solvente a due fasi del Ra^{2+} in funzione del pH con diversi leganti. (○)3, (●)8, (■)10', (□)11' (tratta da [12]).

I chelanti 3 e 8 mostrano anche un'elevata capacità complessante verso gli ioni alcalini terrosi di grandi dimensioni. Questi due composti sono in grado di estrarre in cloroformio il 99.9% di Ra^{2+} da una soluzione acquosa che contiene Ra^{2+} ad una concentrazione pari a 66.54 nM e gli altri cationi alcalino-terrosi (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} e Ba^{2+}) ad una concentrazione pari a 0.2 mM. Il legante 8 con due acidi idrossammici come sostituenti ha mostrato un leggero aumento nella selettività verso Ra^{2+} rispetto al legante 3 che invece presenta degli acidi carbossilici. I leganti 10' e 11' non hanno invece mostrato alcuna selettività specifica verso il radio nel confronto con gli altri metalli. I coefficienti di ripartizione *D* ottenuti per il composto 8 sono mostrati in Tabella 5.

Tabella 5 Coefficiente di distribuzione D (concentrazione del metallo in fase organica/concentrazione del metallo in fase acquosa) per il chelante 8 (dati tratti da [12]).

Metallo	Coefficiente *D*
Mg^{2+}	1000
Ca^{2+}	120
Sr^{2+}	3.4
Ba^{2+}	0.3
Ra^{2+}	0.001

È stata eseguita un'estrazione competitiva dei chelanti 3 e 8 nei confronti dell'EDTA per ottenere le corrispondenti costanti di estrazione relative; queste risultano rispettivamente pari a $K_2 = 0.51K_1$ e $K_2 = 12.6K_1$ dove K_1 è la costante di estrazione del $[^{223}Ra]Ra^{2+}$ con EDTA a pH 8.5 [12]. Il legante 8 mostra quindi una costante di estrazione circa un ordine di grandezza maggiore rispetto al legante 3. Questo può essere spiegato dalla maggiore forza dell'acido idrossammico rispetto all'acido carbossilico e dal fatto che attraverso l'analisi con NMR il chelante 8 ha mostrato variazioni conformazionali minori rispetto al 3 dopo la formazione del complesso, limitando quindi i cambiamenti sfavorevoli di entropia ed entalpia.

I complessi 3 e 8 possiedono anche un'elevata inerzia cinetica, in quanto, una volta inseriti in siero umano arricchito con K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, dopo 24 h solamente il 5% del radio è risultato essere presente in forma libera.
In conclusione, i calixareni investigati dagli autori offrono una struttura rigida che, rispetto ad altri chelanti, può rallentare la decomposizione *in vivo* dei complessi. Inoltre, l'aggiunta di due catene deprotonabili per neutralizzare la carica positiva del metallo migliora ulteriormente le proprietà termodinamiche e cinetiche dei complessi, impedendo allo ione di decomplessare. Quindi, i composti esaminati sono degli ottimi candidati per la TAT.

2.4 Nanozeoliti

Le nanozeoliti sono materiali aventi una struttura con pori di dimensioni nanometriche. Si tratta di materiali particolarmente adatti per veicolare emettitori α e β^- da utilizzare nella TAT, in quanto essi sono in grado di trasportare più nuclidi in un singolo carrier. Questo risulta estremamente utile quando le cellule possiedono pochi recettori che altrimenti verrebbero saturati velocemente limitando la dose di particelle assorbita.

2.4.1 NaA nanozeolite

Le NaA nanozeoliti ("Na" indica il catione presente mentre la lettera "A" è il riferimento alla struttura tridimensionale della zeolite di sintesi) possono essere caricate con Ra^{2+} attraverso un semplice scambio ionico in cui due ioni sodio contenuti normalmente all'interno della struttura vengono sostituiti con uno ione radio. La percentuale di assorbimento con questa tecnica è del 99.9% con entrambi gli isotopi usati [14] (gli autori hanno condotto gli studi utilizzando ^{224}Ra e ^{225}Ra; quest'ultimo solitamente non viene impiegato né è stato mai proposto, tuttavia gli autori non hanno motivato questa scelta insolita).
La stabilità delle nanozeoliti radiomarcate è molto elevata in diverse condizioni. In soluzione fisiologica, in EDTA, in tampone fosfato salito (PBS), in presenza di L-cisteina e in siero umano, la perdita di $^{224/225}Ra$ è sempre inferiore allo 0.5% (Tabella 6) dopo 24 h. In soluzione fisiologica e in PBS la stabilità delle nanozeoliti radiomarcate è maggiore rispetto a quella osservata in soluzioni contenenti EDTA o L-cisteina, e in siero umano si conferma anche dopo quattro giorni di incubazione.

Tabella 6 Studio sulla stabilità delle NaA nanozeoliti contenenti $^{224/225}Ra$ (tratta da [14]).

Solution	% of liberated radioactivity		
	^{224}Ra (1 day of incubation)	^{225}Ra (2 h of incubation)	^{225}Ra (4 days of incuba
0.9 % NaCl	0.1 ± 0.1 (^{212}Pb)	–	1.1 ± 0.5 (^{221}Fr)
	0.7 ± 0.5 (^{208}Tl)		3.0 ± 1.2 (^{213}Bi)
	1.0 ± 0.3 (^{212}Bi)		
0.02 M PBS	0.4 ± 0.1 (^{212}Pb)	–	0.9 ± 0.7 (^{221}Fr)
	0.6 ± 0.2 (^{208}Tl)		1.8 ± 0.8 (^{213}Bi)
	0.6 ± 0.9 (^{212}Bi)		
10^{-3} M EDTA	4.8 ± 2.3 (^{212}Pb)	0.5 ± 0.02 (^{221}Fr, ^{213}Bi)	5.5 ± 2.5 (^{225}Ac)
	7.8 ± 0.8 (^{208}Tl)		5.2 ± 1.4 (^{221}Fr)
	9.4 ± 0.6 (^{212}Bi)		10 ± 0.8 (^{213}Bi)
10^{-3} M cysteine	5.3 ± 3.7 (^{212}Pb)	0.4 ± 0.1 (^{221}Fr, ^{213}Bi)	1.2 ± 0.5 (^{225}Ac)
	7.9 ± 5.5 (^{208}Tl)		0.8 ± 0.4 (^{221}Fr)
	7.5 ± 5.5 (^{212}Bi)		13 ± 2.3 (^{213}Bi)
Human blood serum	2.6 ± 1.5 (^{212}Pb)	–	2.3 ± 1.9 (^{225}Ac)
	7.2 ± 0.9 (^{208}Tl)		2.7 ± 0.2 (^{221}Fr)
	6.2 ± 0.5 (^{212}Bi)		7.4 ± 0.8 (^{213}Bi)

2.4.2 Nanozeolite-PEG

Per rendere la superficie delle nanozeoliti più idrofila e biocompatibile è possibile funzionalizzarla con, ad esempio, delle molecole di PEG (polietilen glicole, Figura 16).

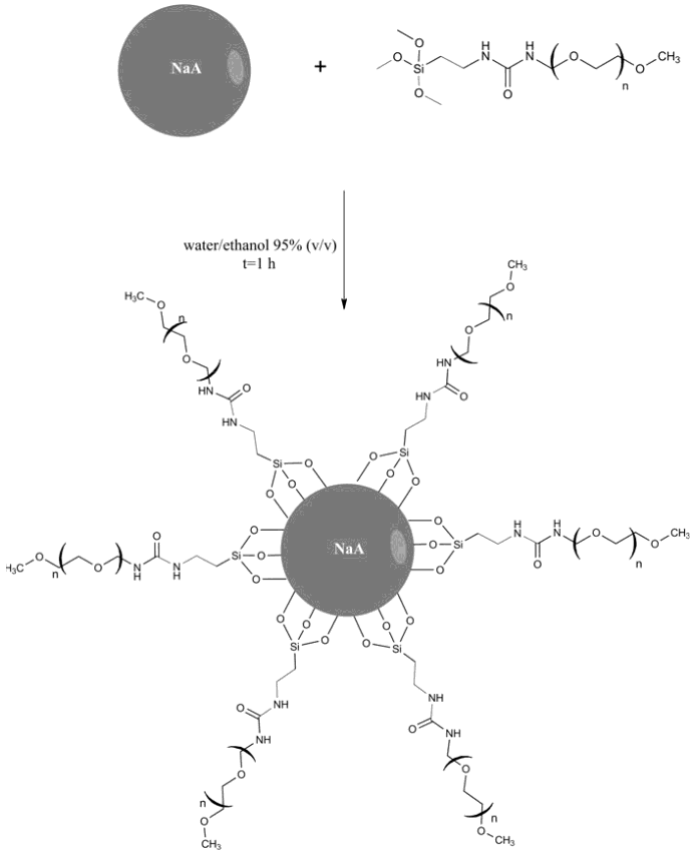


Figura 16 Funzionalizzazione della superficie di NaA nanozeoliti mediante catene silano-PEG (tratta da [14]).

I risultati sulla stabilità di queste nuove strutture sono mostrati in Tabella 7. Se si confrontano questi risultati con quelli della Tabella 6, si osserva che la funzionalizzazione delle nanozeoliti non ha comportato alcuna modifica significativa nella stabilità delle strutture.

Tabella 7 Studio sulla stabilità delle NaA nanozeoliti (silano-PEG) contenenti $^{224/225}$Ra (tratta da [14]).

Solution	% of liberated radioactivity		
	^{224}Ra (1 day of incubation)	^{225}Ra (2 h of incubation)	^{225}Ra (4 days of incubation)
0.9 % NaCl	0.3 ± 0.2 (^{212}Pb)	–	1.0 ± 0.4 (^{221}Fr)
	1.1 ± 0.8 (^{208}Tl)		6.1 ± 3.0 (^{213}Bi)
	0.2 ± 0.2 (^{212}Bi)		
0.02 M PBS	1.3 ± 0.2 (^{212}Pb)	0.1 ± 0.03 (^{225}Ac)	0.8 ± 0.6 (^{221}Fr)
	1.5 ± 0.6 (^{208}Tl)	0.2 ± 0.09 (^{221}Fr)	8.2 ± 1.5 (^{213}Bi)
	1.6 ± 0.02 (^{212}Bi)	0.2 ± 0.1 (^{213}Bi)	
10^{-3} M EDTA	3.5 ± 0.5 (^{212}Pb)	0.5 ± 0.2 (^{221}Fr)	6.8 ± 3.7 (^{225}Ac)
	8.1 ± 0.9 (^{208}Tl)	0.4 ± 0.05 (^{213}Bi)	11.6 ± 1.7 (^{221}Fr)
	11.2 ± 1.5 (^{212}Bi)		10.3 ± 1.5 (^{213}Bi)
10^{-3} M cysteine	12.0 ± 4.2 (^{212}Pb)	0.3 ± 0.02 (^{221}Fr)	1.2 ± 0.5 (^{225}Ac)
	16.1 ± 6.1 (^{208}Tl)	0.4 ± 0.06 (^{213}Bi)	0.8 ± 0.4 (^{221}Fr)
	17.4 ± 2.0 (^{212}Bi)		13 ± 2.3 (^{213}Bi)
Human blood serum	6.8 ± 2.3 (^{212}Pb)	–	7.2 ± 0.2 (^{225}Ac)
	13.9 ± 1.2 (^{208}Tl)		5.9 ± 0.4 (^{221}Fr)
	7.3 ± 0.7 (^{212}Bi)		10.8 ± 2.0 (^{213}Bi)

2.4.3 Nanozeolite-SP(5-11)

Le nanozeoliti sono state anche funzionalizzate con la SP(5-11), ovvero una molecola che possiede un'elevata affinità verso il recettore NK-1 presente nelle cellule della glia; come sempre in questi casi, è stato aggiunto un *linker* PEG interposto tra la zeolite e l'SP(5-11). La struttura completa è mostrata in Figura 17 .

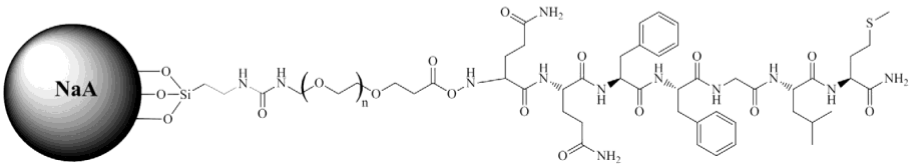


Figura 17 Struttura della NaA nanozeolite Ra-silano-PEG-SP(5-11) (tratta da [15]).

La stabilità di ^{223}Ra-silano-PEG-SP(5-11) in siero umano è molto elevata, in quanto la perdita di ^{223}Ra è inferiore allo 0.5% e la perdita di ^{221}Pb e ^{221}Bi varia dal 2 al 5% (Figura 18).

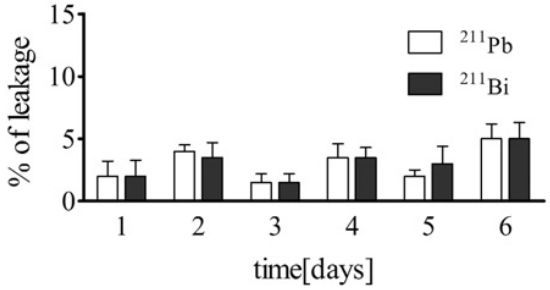


Figura 18 Stabilità di ^{223}RaA-Silano-PEG-SP(5-11) in siero umano in funzione del tempo (tratta da [15]).

La selettività di silano-PEG-SP(5-11) nei confronti del radio è invariata rispetto a quella della semplice nanozeolite, dimostrando che la presenza del *linker* e dell'agente targetizzante non ne modifica le proprietà di assorbimento. Si ritiene che la struttura porosa delle zeoliti non venga modificata dai sostituenti chimici, permettendo quindi l'assorbimento del ^{223}Ra attraverso il semplice scambio ionico.

2.4.4 Nanozeolite-D2B

In uno studio successivo le nanozeoliti sono state funzionalizzate con la D2B, una molecola che possiede un'elevata affinità per il recettore sovraespresso PSMA nel tumore prostatico. Anche in questo caso, come in precedenza, è stato aggiunto un *linker* silano-PEG tra la nanozeolite e D2B [16].

La stabilità di ^{223}Ra-silano-PEG-D2B è stata valutata in cloruro di sodio (0.9 % NaCl) e in siero umano per un periodo di 12 giorni (Figura 19).

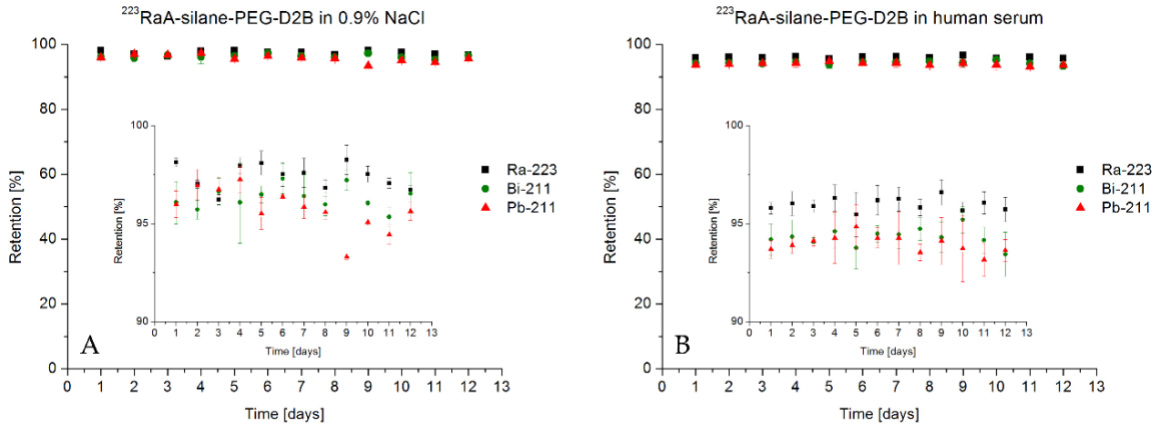


Figura 19 Percentuale di ritenzione del ^{223}Ra in (A) 0.9 % NaCl e in (B) siero umano; nell'inserto sono indicati i valori tra 90 e 100% (tratta da [16]).

La perdita di ^{223}Ra in NaCl e in siero umano dopo 12 giorni era rispettivamente di 3% e 4%. La perdita di ^{211}Pb e ^{211}Bi in entrambe le condizioni è stata inferiore al 6%.

Questi risultati molto promettenti possono essere spiegati dal riassorbimento nelle nanozeoliti del nuclide prodotto dal decadimento ^{219}Rn in quanto è noto come le nanozeoliti A possiedano un'elevata abilità nell'assorbire gli isotopi del radon [16]. In accordo con Holzwarth [17] i risultati ottenuti in siero umano non possono essere considerati validi per i modelli *in vivo* perché il flusso sanguigno potrebbe allontanare rapidamente il prodotto del decadimento dalla superficie delle nanoparticelle riducendo la probabilità di riassorbimento. Questo fenomeno potrebbe giocare un ruolo fondamentale anche nel prevenire il rilascio dei nuclidi dalla cellula in cui sono state internalizzate le nanozeoliti funzionalizzate. Tuttavia, si deve ricordare che il rilascio di prodotti di decadimento del radio potrebbe essere un problema trascurabile poiché il 75% delle particelle α viene emesso nei primi 4 secondi.

3 Conclusioni

Le particelle α targetizzate (TAT) utilizzabili per la cura di tumori rivestono un interesse sempre maggiore oggigiorno, in quanto possono rappresentare una strategia estremamente efficace nel contrasto delle malattie oncologiche e in particolare nella terapia contro le micrometastasi. Il successo di [^{223}Ra]$RaCl_2$ nella cura di pazienti con metastasi prostatica ossea rappresenta un passaggio fondamentale che mostra il potenziale rivestito dal radio in questo ambito. La ricerca di chelanti adatti per il radio, tuttavia, è ancora agli albori, poiché la chimica di coordinazione di questo ione è meno sviluppata rispetto a quella di altri radionuclidi per i quali esistono isotopi stabili.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di ricercare i chelanti finora studiati in letteratura ed analizzare i risultati ottenuti.
Il legante macrociclico macropa ha dimostrato di formare con rapidità dei complessi molto stabili con Ra^{2+}. A temperatura ambiente e in condizioni di pH fisiologico, il complesso [^{223}Ra(macropa)] è stabile per lunghi periodi sia *in vitro* che *in vivo*. Lo stesso successo è stato ottenuto dal complesso [^{223}Ra][Ra(macropa-β-alanina)], aprendo il percorso per altre possibili funzionalizzazioni per inserire molecole in grado di targetizzare recettori specifici. Inaspettatamente, tuttavia, [^{223}Ra][Ra(macropa-β-DUPA)] non ha mostrato stabilità sufficiente per essere utilizzato come radiofarmaco.

I calixareni offrono una cavità più rigida e più grande rispetto a quella di altri chelanti più utilizzati (come ad esempio il DOTA), e questa caratteristica li rende più affini a Ra^{2+}. La presenza di due gruppi ionizzabili che neutralizzano la carica del complesso e fungono da "lacci" impediscono al catione di allontanarsi dal complesso. I risultati ottenuti sono stati promettenti e consentono di proseguire con ulteriori studi volti a rendere questi chelanti bifunzionali (per il legame con il *linker*) e solubili in acqua (per operare più agevolmente le radiomarcature).

I risultati ottenuti con le NaA nanozeoliti hanno dimostrato che queste molecole sono delle ottime candidate come vettori di trasporto per il radio e per gli altri nuclidi prodotti dal suo decadimento (Figura 1). Quando funzionalizzate con molecole come silano-PEG, silano-PEG-SP(5-11) e ^{223}RaA-silano-PEG-D2B, esse mantengono la capacità di trattenere i nuclidi sia *in vivo* che *in vitro*. Inoltre, ^{223}RaA-silano-PEG(5-11) ^{223}RaA-silano-PEG-D2B hanno mostrato un'elevata affinità con i rispettivi recettori *in vitro.*
Sebbene al di fuori degli scopi di questa tesi, è utile sottolineare che le nanozeoliti RaA-silano-PEG-D2B sono state ulteriormente studiate in un lavoro recente [18] nel quale sono state valutate la tossicità, la farmacocinetica e la biodistribuzione. I risultati ottenuti confermano ulteriormente la grande potenzialità di questa categoria di molecole nell'ambito della TAT.

Bibliografia

[1] Young-Seung Kim, Martin W. Brechbiel, "An overview of targeted alpha therapy," *Tumor Biology,* pp. 1-2, 2012.

[2] Romain Eychenne, Michel Chérel, Férid Haddad, François Guérard and Jean-François Gestin, "Overview of the Most Promising Radionuclides for Targeted Alpha Therapy: The “Hopeful Eight”," *Pharmaceutics,* pp. 1-2, 2021.

[3] Narges K. Tafreshi, Michael L. Doligalski, Christopher J. Tichacek, Darpan N. Pandya, Mikalai M. Budzevich, Ghassan El-Haddad, Nikhil I. Khushalani, Eduardo G. Moros, Mark L. McLaughlin, Thaddeus J. Wadas and David L. Morse, "Development of Targeted Alpha Particle Therapy for Solid Tumors," *Molecules ,* pp. 1-9, 2019.

[4] Aohan Hu and Justin J. Wilson, "Advancing Chelation Strategies for Large Metal Ions for Nuclear Medicine Applications," *Account of chemical research,* pp. 1-6, 2022.

[5] Matthew Gott, Jörg Steinbach, Constantin Mamat, "The Radiochemical and Radiopharmaceutical Applications of Radium," *Open Chemistry,* pp. 1-2, 2016.

[6] Artem V. Matyskin, Niklas L. Hansson, Paul L. Brown, Christian Ekberg, "Barium and Radium Complexation with Ethylenediaminetetraacetic Acid in Aqueous Alkaline Sodium Chloride Media," *J Solution Chem ,* p. 1951, 2017.

[7] Paul L. Brown, Artem V. Matyskin and Christian Ekberg, "The aqueous chemistry of radium," *De Gruyter,* pp. 3-6, 2022.

[8] Peter J.H. Scott, Michael R. Kilbourn, "Determination of residual Kryptofix 2.2.2 levels in [18F]-labeled radiopharmaceuticals for human use," *Applied Radiation and Isotopes Elsevier,* p. 1, 2007.

[9] Gjermund Henriksena, Per Hoffa, Roy H. Larsena, "Evaluation of potential chelating agents for radium," *Pergamon, Applied Radiation and isotopes,* pp. 3-4, 2001.

[10] Diane S. Abou, Nikki A. Thiele, Nicholas T. Gutsche,f Alexandria Villmer,ab Hanwen Zhang, Joshua J. Woods, Kwamena E. Baidoo, Freddy E. Escorcia, Justin J. Wilson and Daniel L. J. Thorek, "Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand," *Royal Society of Chemistry,* pp. 1-7, 2021.

[11] Janine Steinberg, David Bauer, Falco Reissig, Martin Kçckerling, Hans-Jürgen Pietzsch and Constantin Mamat, "Modified Calix[4]crowns as Molecular Receptors for Barium," *Chemistry Open ,* pp. 1-4, 2018.

[12] Xiaoyuan Chen, Min Ji, Darrell R. Fisher and Chien M. Wai, " Ionizable Calixarene-Crown Ethers with High Selectivity for Radium over Light Alkaline Earth Metal Ions," *Inorganic Chemistry ,* pp. 3-4, 1999.

[13] David Bauer, Matthew Gott, Jörg Steinbach, Constantin Mamat, "Chelation of heavy group 2 (radio)metals by p-tert-butylcalix[4]arene- 1,3-crown-6 and logK determination via NMR," *Elsevier,* 2018.

[14] Agata Piotrowska, Edyta Leszczuk, Frank Bruchertseifer, Alfred Morgenstern, Aleksander Bilewicz, "Functionalized NaA nanozeolites labeled with [224,225]Ra for targeted alpha therapy," *Journal of Nanoparticle Research,* pp. 3-9, 2013.

[15] Agata Piotrowska, Sylwia Męczyńska-Wielgosz, Agnieszka Majkowska-Pilip, Przemysław Koźmiński, Grzegorz Wójciuk, Edyta Cędrowska, Frank Bruchertseifer, Alfred Morgenstern, Marcin Kruszewski, Aleksander Bilewicz, "Nanozeolite bioconjugates labeled with 223Ra for targeted alpha therapy," *Elsevier ,* pp. 13-15, 2016.

[16] Malwina Czerwiń ska, Giulio Fracasso, Marek Pruszyń ski, Aleksander Bilewicz, Marcin Kruszewski, Agnieszka Majkowska-Pilip and Anna Lankoff, "Design and Evaluation of 223Ra-Labeled and Anti-PSMA Targeted NaA Nanozeolites for Prostate Cancer Therapy–Part I," *materials,* pp. 1,2,15, 2020.

[17] Uwe Holzwarth, Isaac Ojea Jimenez and Luigi Calzolai, "A random walk approach to estimate the confinement of α-particle emitters in nanoparticles for targeted radionuclide therapy," *Holzwarth et al. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry,* pp. 1-26, 2018.

[18] Anna Lankoff, Malwina Czerwiń ska, Rafał Walczak, Urszula Karczmarczyk, Kamil Tomczyk, Kamil Brzóska, Giulio Fracasso, Piotr Garnuszek, Renata Mikołajczak and Marcin Kruszewski, "Design and Evaluation of 223Ra-Labeled and Anti-PSMA Targeted NaA Nanozeolites for Prostate Cancer Therapy—Part II. Toxicity, Pharmacokinetics and Biodistribution," *International journal of molecolar science ,* 2021.