

# TARGETING NEUROTENSIN RECEPTOR POSITIVE TUMORS: MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA IMAGING WITH <sup>68</sup>Ga-DOTA-NEUROTENSIN ENGINEERED FRAGMENT

M. Marenco<sup>1</sup>; V. Frangipane<sup>2</sup>; M.G. Persico<sup>1,3</sup>; M. Hodolič<sup>4</sup>; F. Meloni<sup>2</sup>; C. Aprile<sup>5</sup>; L. Lodola<sup>1</sup>

1- S.C. di Medicina Nucleare, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

2 - Dipartimento di Malattie dell'Apparato Respiratorio, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

3 - Istituto Universitario di Studi Superiori IUSS, Pavia, Italia

4 - Nuclear Medicine Research Department, IASON, Graz, Austria; Palacky University Medical Faculty, Olomouc, Czech Republic

5 - Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica CNAO, Pavia, Italia

## Introduzione

Il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) è un tumore aggressivo, con un'incidenza crescente in seguito all'esposizione all'amianto. L'MPM non risponde alla chemio-radioterapia convenzionale e la sopravvivenza media è di 14 mesi dalla diagnosi. È inoltre un tumore silente, infatti molti pazienti non manifestano sintomi fino agli stadi più avanzati di progressione. Ad oggi, il potere diagnostico dell'imaging PET/CT non sembra aumentare significativamente la precisione della diagnosi precoce (Fig.1).

Il frammento 6-13 della neurotensina, denominato DOTA-NT-20.3, marcato con <sup>68</sup>Ga (Iasotensin® IASON, Graz, Austria) è una nuova e promettente sonda per l'imaging recettoriale dei tumori over-esprimenti il recettore della neurotensina NTR1, tra cui il mesotelioma: l'over-espressione di NTR1 si verifica in una percentuale vicina al 90% dei casi di MPM e sembra correlare con un outcome particolarmente infausto.

Disporre di una sonda recettoriale specifica permetterebbe una diagnosi precoce puntuale e in grado di distinguere tra sede tumorale e infiammazione locale. Questo studio è stato condotto in vitro, sulla linea cellulare di MPM MSTO-211H, eseguendo test di uptake cellulare per valutare l'affinità, la cinetica di assorbimento e la velocità di interazione del radiofarmaco.

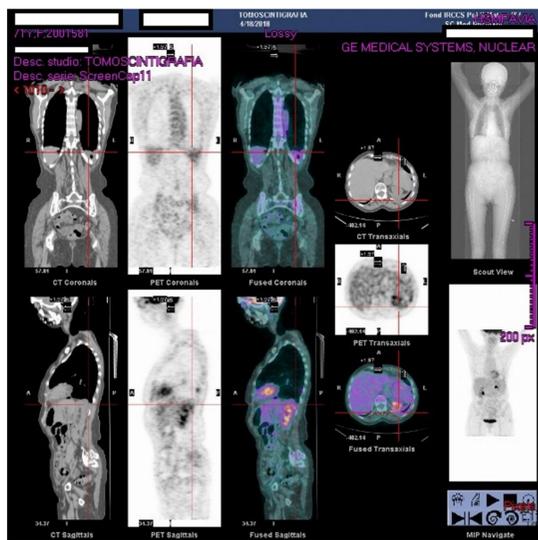


Figura 1

Imaging PET/CT di MPM con [<sup>18</sup>F]-FDG

## Metodi

Il frammento 6-13 della Neurotensina è stato opportunamente modificato per renderlo più stabile al metabolismo cellulare e derivatizzato con il chelante DOTA. Il composto è stato denominato DOTA-NT-20.3 da IASON.

Il generatore <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga (Eckert-Ziegler GmbH GalliaPharm - DE) è eluito con 8 ml di HCl 0.1 M ed è stata eseguita un'eluzione preliminare per eliminare il <sup>68</sup>Zn, la cui presenza può influire sulla resa di sintesi.

Per la marcatura del DOTA-NT-20.3 con <sup>68</sup>Ga, tramite modulo di sintesi automatico, sono stati utilizzati 150-800 MBq di <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> (circa 8.0 ml) e 50 µg di precursore, disciolti in 50 µL di TraceSelect Water.

Sono stati aggiunti 2 mL di tampone CH<sub>3</sub>COONa /CH<sub>3</sub>COOH 0.8 M e 400 µL di EtOH/H<sub>2</sub>O al 50/50% (v/v).

Il vial di reazione è stato scaldato a 80 ± 2 °C per 3 minuti e poi a 110 ± 2 °C per 7 minuti. Il prodotto è stato diluito con una soluzione salina allo 0.9%, per un volume finale di 8 mL. Il pH del prodotto finale è compreso tra 4.0 e 5.0.

Controlli di qualità: 20 µL di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 sono stati iniettati in HPLC (Varian 1100) dotata di una colonna ZORBAX Eclipse Plus C18, di un rivelatore a NaI (TI) per la radioattività e di uno UV-visibile a 254nm (diodes array). La fase mobile è costituita dal solvente A (acetone nitrile e acido trifluoroacetico allo 0.1%) e dal solvente B (acqua e acido trifluoroacetico allo 0.1%). La cromatografia HPLC è stata eseguita a 25 °C con un flusso di 0,6 mL/min e un gradiente di 00: 00-07: 00 min: 100-30% B.

Il tempo di ritenzione del <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 è di circa 7 minuti.

Uptake cellulare: le cellule della linea di mesotelioma umano MSTO-211H sono state piastrate a una densità di 2x10<sup>5</sup> cellule per piastra. La crescita è aderente alla superficie della petri. I test sono stati eseguiti a 24h dalla piastratura, quindi in condizioni di proliferazione cellulare.

Per il test di saturation binding, le cellule MSTO-211H sono state incubate per 40 minuti in presenza di concentrazioni crescenti di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3, pari a circa 50, 100, 300, 500 kBq.

Nei test di uptake rispetto al tempo, sono stati somministrati circa 100 kBq di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 e la captazione è stata valutata a diversi tempi: 60, 80, 100, 120 minuti.

I campioni di controllo sono stati sottoposti alla stessa procedura, ma sono stati incubati solo con terreno fresco. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a 37 °C.

## Risultati

L'uptake di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 (Fig.2) raggiunge la fase di plateau dopo 80 min di incubazione (Fig.3).

Le misure della radioattività, per determinare la quantità di peptide legato, sono state effettuate mediante contatore gamma (RaytestGita).

I valori di K<sub>d</sub> (4.486 pmol) e B<sub>max</sub> (3736 Bq) sono stati determinati mediante il modello di regressione non lineare one-site binding, utilizzando il software GraphPad Prism 5.01.

Il valore di B<sub>max</sub> è stato anche utilizzato per valutare il numero di recettori coinvolti nel legame, stimato in 4.5x10<sup>4</sup> siti per cellula. Il test è stato eseguito a 37 °C, quindi in presenza di un significativo livello di internalizzazione recettoriale.

L'analisi della curva isoterma, utilizzata per determinare la saturazione di legame, ha evidenziato un valore di Hill slope (h) pari a 0.744, indicando quindi la presenza di siti di legame multipli, senza cooperazione positiva (fig.4).

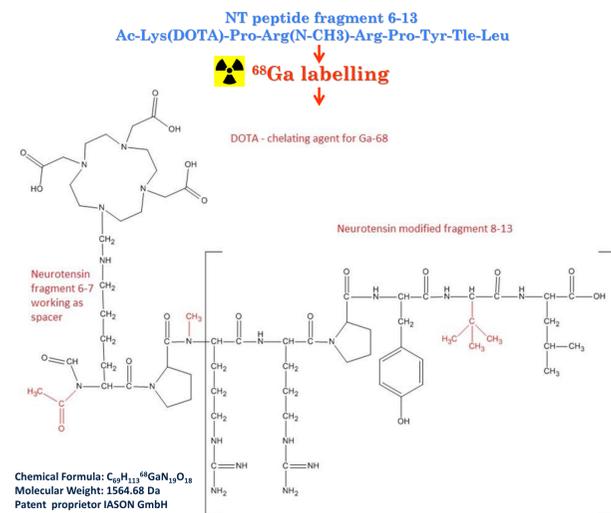


Figura 2

<sup>68</sup>Ga-NT-DOTA-20.3 labelling

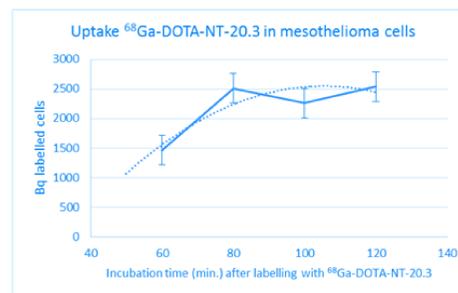


Figura 3

<sup>68</sup>Ga-NT-DOTA-20.3 uptake in MSTO-211H cells incubation vs. time (min)

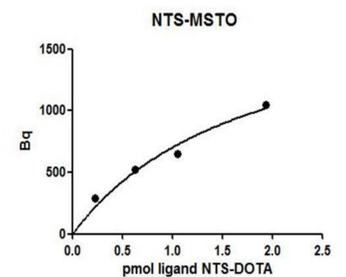


Figura 4

MSTO-211H <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 saturation binding experiment

## Conclusioni

L'utilizzo della sonda <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 per la diagnosi precoce di MPM è, a nostro avviso, l'applicazione clinica più promettente dell'analogo della neurotensina.

La decisione di testare il nuovo radiofarmaco *in vitro*, su una linea cellulare di mesotelioma, è prodromica a successivi studi *in vivo* e su paziente. Per la scelta del modello cellulare sono stati valutati i livelli di espressione di NTR1 delle MSTO-211H, la loro intensa capacità proliferativa e la loro aggressività tumorale, insieme alla ridotta bibliografia inerente studi condotti su questa linea cellulare.

I risultati preliminari sulla linea MSTO-211H indicano che il <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 ha delle buone potenzialità per l'imaging diagnostico del mesotelioma.

Sono necessari ulteriori verifiche *in vitro*, per valutare la selettività dell'analogo della neurotensina per il mesotelioma pleurico. Si prevede quindi di ampliare lo studio e testare l'uptake da parte dei linfociti e di colture primarie di adenocarcinoma polmonare derivanti da paziente.

Infine, la sostituzione dell'isotopo diagnostico <sup>68</sup>Ga con isotopi terapeutici (quali <sup>223</sup>Ra, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>In) potrebbe portare allo sviluppo di un nuovo farmaco teranostico, a somministrazione locale, utilizzabile non solo nella diagnosi ma anche nel trattamento specifico del Mesotelioma Pleurico Maligno.

## Ringraziamenti

Si ringrazia:

Nuclear Medicine research department, IASON GmbH, Graz, Austria per aver fornito gratuitamente il precursore DOTA-NT-20.3

Prof. F. Meloni e lo staff del Laboratorio di Ricerca afferente alla UOC Malattie dell'Apparato Respiratorio della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, per il loro fondamentale supporto nelle procedure di coltura cellulare e per aver fornito la linea di mesotelioma MSTO-211H

## Bibliografia

- Evidence of <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 uptake in pancreatic adenocarcinoma AsPC-1 cell line – *in vitro* study. M. Marenco, L. Lodola, M.G. Persico, V. Frangipane, A. Facoetti, C. Aprile, M. Hodolič. - Current Pharmaceutical Biotechnology 19. August 2018 DOI:10.2174/1389201019666180829152314
- Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. Alifano M1, Loi M, Camilleri-Broet S, Dupouy S, Régnard JF, Forgez P. - Biochimie. 2010 Feb;92(2):164-70. doi: 10.1016/j.biochi.2009.11.004. Epub 2009 Nov 20.
- Modern Nuclear Imaging for Paragangliomas: Beyond SPECT. D. Taieb, H. Neumann, D. Rubello, A. Al-Nahhas, B. Guillet and E. Hindie - J Nucl Med. 2012 Feb;53(2):264-74. doi: 10.2967/jnumed.111.098152.
- <sup>177</sup>Lu-3BP-227 for Neurotensin Receptor 1-Targeted Therapy of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: First Clinical Results. Baum RP, Singh A, Schuchardt C, Kulkarni HR, Klette I, Wiessalla S, Osterkamp F, Reineke U, Smerling C - J Nucl Med. 2018 May;59(5):809-814. doi: 10.2967/jnumed.117.193847. Epub 2017 Oct 12.