

# Targeting Neurotensin Receptor positive tumors: *in vitro* binding of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with <sup>68</sup>Ga-DOTA-Neurotensin engineered fragment

L. Lodola<sup>1</sup>; M. Marengo<sup>1</sup>; M.G. Persico<sup>1,2</sup>; M. Hodolic<sup>3,4</sup>; G. Cavenaghi<sup>1</sup>; A. Facoetti<sup>5</sup>; C. Aprile<sup>5</sup>

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

2 - Istituto Universitario Studi Superiori IUSS, Pavia, Italia

3 - Nuclear Medicine research department, IASON GmbH, Graz, Austria

4 - Palacký University, Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc - Czech Republic

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

## Introduzione

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) è la neoplasia maligna più comune del pancreas e rappresenta circa il 96% di tutti i tumori pancreatici. A causa della mancanza di sintomi precoci specifici, nonché della particolare aggressività del tumore, nella maggior parte dei casi il trattamento è palliativo, con una sopravvivenza globale media di soli 8.5 mesi. Nei pazienti con PDAC, la PET/CT <sup>18</sup>F-FDG ha un ruolo consolidato nella stadiazione preoperatoria, nel sospetto di ripresa di malattia e nel follow-up del trattamento terapeutico. Tuttavia, la diagnostica PET attualmente disponibile non consente una precisa diagnosi precoce (fig.1).

I recettori della neurotensina sono over-espressi in diverse neoplasie, tra cui l'adenocarcinoma duttale pancreatico: è noto che una percentuale compresa tra il 75% e l'88% dei casi over-esprime il recettore nella neurotensina 1 (NTR1). Pertanto, questo sito recettoriale rappresenta un possibile bersaglio per lo sviluppo di nuove sonde PET con meccanismo recettoriale.

In quest'ottica, è stato sviluppato un analogo della Neurotensina, denominato DOTA-NT-20.3, marcato con l'isotopo PET <sup>68</sup>Ga (Isotensin® progettato da IASON, Graz, Austria).

Obiettivo di questo lavoro preliminare è la verifica in vitro dell'affinità, dell'interazione e dell'uptake di questo nuovo e promettente radiofarmaco, sulla linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico umano AsPC-1, la cui espressione di NTR1 è nota e ben documentata in letteratura.

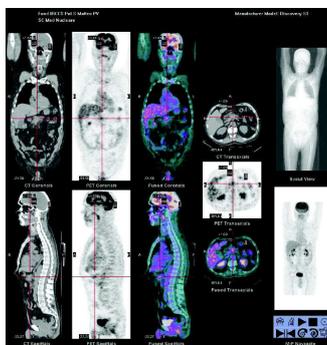


Figura 1  
Imaging PET/CT di PDAC con [<sup>18</sup>F]-FDG

## 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 generatore <sup>68</sup>Ga/<sup>68</sup>Zn (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(Tl) per la radioattività e di uno UV-visibile a 254nm (diodes array). La fase mobile è costituita dal solvente A (acetitrile 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 adenocarcinoma pancreatico umano PC-1 sono state placcate 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 i test di saturation binding, le cellule AsPC-1 sono state incubate per 40 minuti in presenza di concentrazioni crescenti di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3, pari a circa 50, 200, 400, 800, 1500 kBq. Nei test di uptake rispetto al tempo, sono stati somministrati circa 200 kBq di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 e la captazione è stata valutata a diversi tempi: 40, 60, 80 minuti. Le misure della radioattività, per determinare la quantità di peptide legato, sono state effettuate mediante rivelatore gamma NaI(Tl) (RaytestGita). 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.

## Ringraziamenti

Si ringraziano:

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

Prof. F. Meloni e lo staff del Laboratorio di Ricerca afferente alla UOC Malattie dell'Apparato Respiratorio dell'IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo per il loro fondamentale supporto nelle procedure di coltura cellulare

Dott.ssa A. Facoetti del Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica CNAO di Pavia per aver fornito la linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico AsPC-1

## Risultati

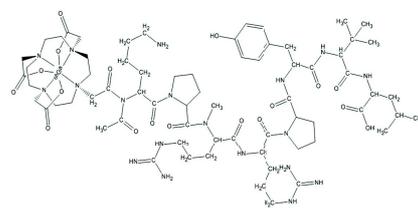
L'uptake di <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 (fig.2) raggiunge la fase di plateau dopo 80 min di incubazione (fig.3).

I valori di Kd (7.335 pmol) e Bmax (90.52 kBq) sono stati determinati mediante il modello di regressione non lineare one-site binding, utilizzando il software GraphPad Prism 5.01. Il valore di Bmax è stato anche utilizzato per valutare il numero di recettori coinvolti nel legame, stimato in 1.09x10<sup>6</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 0.83, indicando quindi la presenza di siti di legame multipli, senza cooperazione positiva (fig.4).

NT peptide fragment 6-13  
Ac-Lys(DOTA)-Pro-Arg(N-CH<sub>3</sub>)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu

<sup>68</sup>Ga labelling



Chemical Formula: C<sub>60</sub>H<sub>111</sub><sup>68</sup>GaN<sub>7</sub>O<sub>18</sub>  
Exact Mass: 1563.78  
Molecular Weight: 1564.68

Figura 2

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

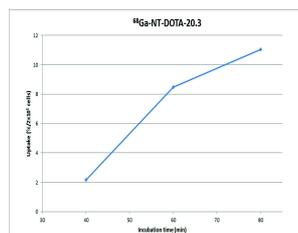


Figura 3

<sup>68</sup>Ga-NT-DOTA-20.3 uptake (%) in AsPC-1 cells incubation vs. time (min)

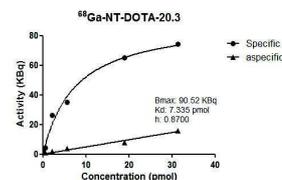


Figura 4

AsPC-1 <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 saturation binding experiment

## Conclusioni

Questo studio preliminare dimostra l'applicabilità nella pratica clinica del nuovo tracciante recettoriale, finalizzata ad una diagnosi di PDAC precoce e più puntuale.

Abbiamo deciso di utilizzare la linea cellulare AsPC-1 per gli alti livelli di espressione del recettore NTR1 e per l'intensa invasività tumorale. I risultati ottenuti sono a favore dell'applicabilità del modello, tuttavia riteniamo necessarie ulteriori verifiche prima di poter avviare uno studio clinico. Si prevede infatti di testare il radiofarmaco anche in altre linee di PDAC, con diverso grado di aggressività e di espressione recettoriale. Inoltre, essendo la pancreatite il principale fattore confondente la diagnosi, la sonda sarà studiata anche nella popolazione infiammatoria presente a livello della massa tumorale, per verificare la possibilità di discriminare le due differenti popolazioni cellulari, mediante cinetiche di uptake diversificate e specifiche.

Infine, la possibilità di sostituire l'isotopo diagnostico con uno terapeutico (<sup>223</sup>Ra, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>In), rappresenta un ulteriore motivo di forte interesse per lo studio del DOTA-NT-20.3, perché permetterebbe di disporre di un terapeutico specifico e mirato selettivamente contro il PDAC, la cui terapia attualmente non è risolutiva.

## Bibliografia

- Evidence of <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT-20.3 uptake in pancreatic adenocarcinoma AsPC-1 cell line – in vitro study. M. Marengo, L. Lodola, M.G. Persico, V. Frangipane, A. Facoetti, C. Aprile, M. Hodolic. - Current Pharmaceutical Biotechnology 19, August 2018
- Evaluation of neurotensin receptor 1 as a potential imaging target in pancreatic ductal adenocarcinoma. Yin, X.; Wang, M.; Wang, H.; Deng, H.; He, T.; Tan, Y.; Zhu, Z.; Wu, Z.; Hu, S.; Li, Z. - Amino Acids, 2017, 49(8), 1325-1335
- Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. Reubi, J.C.; Waser, B.; Friess, H.; Büchler, M.W. - Laissue, J.A. Gut, 1998; 42, 546-50
- <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.