



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



Dottorato di Ricerca "Medicina Molecolare e Clinica"  
Dipartimento di Promozione della Salute, Materno Infantile,  
Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE)  
Settore Scientifico Disciplinare MED/09 Medicina Interna

STUDI RADIOBIOLOGICI DI COMPLESSI CHELANTE-  
RADIONUCLIDE DIRETTI AL TUMORE CON ATTIVITÀ  
DIAGNOSTICA E/O TERAPEUTICA SU MODELLO MURINO E  
VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA BIOLOGICA UTILIZZANDO  
MODELLI DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE E RADIOMICA  
SU IMMAGINI MICROPET/CT

LA DOTTORESSA  
**Viviana Benfante**

IL COORDINATORE  
**Prof. Antonino Tuttolomondo**

IL TUTOR  
**Prof. Antonino Tuttolomondo**

CO TUTOR  
**Dott. Albert Comelli**

## SOMMARIO

Il campo dell'oncologia è sempre più oggetto di sfide insidiose e stimolanti e prevede un lavoro sinergico da parte di ricercatori appartenenti a differenti settori scientifici. La ricerca e sviluppo di nuove terapie e tecniche diagnostiche sempre più all'avanguardia sono sempre più spesso il risultato del lavoro di team di ricerca multidisciplinari in quanto la collaborazione di branche differenti della ricerca permette di avere punti di vista diversi e approcci sempre più complementari. In particolare, ciò è cruciale al fine di ottenere una caratterizzazione completa di patologie complesse come le varie forme di cancro, che necessitano di soluzioni diagnostiche e terapeutiche sempre più innovative, meno invasive e personalizzate.

Nell'ambito della medicina nucleare è sempre più richiesta l'integrazione di sistemi che simultaneamente espletano funzione di diagnosi e di terapia. Tale branca della ricerca biomedica è oggi nota come Teranostica (da "TERApeutico" e "diagNOSTICo"). Alla base di questo *topic* vi è la progettazione e sintesi di nuovi composti biochimico-farmaceutici che possono essere utilizzati per raggiungere entrambi gli obiettivi contemporaneamente, ovvero per la diagnosi e la cura di particolari forme di cancro.

Oggi, è notevole lo slancio che sta prendendo la branca della ricerca e sviluppo di nuovi nanosistemi innovativi, radiofarmaci, chelanti di radionuclidi sempre più performanti e stabili, oltre che la produzione di nuovi radionuclidi che, grazie a specifiche classi di radiazioni ionizzanti emesse, possono essere utilizzati sia per condurre imaging di Tomografia a Emissione di Positroni (PET) e Tomografia a Emissione di Singolo Fotone (SPECT), sia per svolgere un'azione diretta sulle cellule bersaglio. Tali cellule bersaglio, risentendo delle radiazioni ionizzanti emesse da particolari radionuclidi massivamente concentrati in un dato organo o tessuto, subiscono danni irreversibili che conducono a morte cellulare.

L'imaging medico nucleare basato su PET/CT mira a studiare i processi biochimici e fisiologici dei tessuti del corpo. Grazie a queste metodiche è possibile scoprire se un organo è compromesso oppure se qualche "barriera" fisiologica ha o meno la giusta permeabilità, e se quest'ultima pertanto sta subendo un'alterazione per cause patologiche. Ciò è possibile in quanto i radiofarmaci per imaging PET vengono assorbiti a livello degli organi bersaglio, sfruttando modifiche che dal punto di vista chimico consentono l'ingresso di tali composti in modo selettivo nei confronti di specifici tumori, risparmiando gli organi sani.

In base alle strumentazioni e tecniche (ad esempio, PET e/o SPECT) inoltre è possibile utilizzare classi differenti di radionuclidi. Ciò è vero dal momento che ciascun radionuclide è dotato di caratteristiche fisico-chimiche che lo rendono unico, come ad esempio emivita, tipo di decadimento, tipo di radiazioni ionizzanti emesse, ecc. E' in base a queste caratteristiche che viene selezionato il tipo di strumento (PET e/o SPECT), che, a sua volta, vanta capacità differenti di *detection* e di cattura delle emissioni radioattive. Quest'ultimo aspetto riguarda la gamma camera e l'apparecchio di rivelazione di queste radiazioni, costituito da materiale (cristalli di differente composizione e differenti scintillatori) diverso in base allo scopo.

Il Rame-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) è un radioisotopo con proprietà uniche dal punto di vista della medicina nucleare in quanto può essere utilizzato sia come agente diagnostico che terapeutico. Può essere utilizzato per la marcatura radioattiva di chelanti bifunzionali che trasportano una vasta gamma di farmacofori per colpire diversi substrati biologici. Il Gallio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) è un radionuclide utilizzato nella marcatura di radiotraccianti usati per la diagnosi del cancro, in particolare dei tumori neuroendocrini e della prostata. La tecnica guidata dalle immagini sta giocando un ruolo sempre più importante nello studio della biodistribuzione e della farmacocinetica dei farmaci in varie malattie, in particolare nei tumori. Pertanto, l'imaging basato su PET e SPECT è sempre più utilizzato per valutare la biodistribuzione e l'assorbimento (*uptake*) dei radiofarmaci teranostici.

Sebbene le proprietà di *uptake* dei radiofarmaci a livello dei tessuti/organi consenta di capire agevolmente dal punto di vista qualitativo se l'assorbimento è presente o meno a livello di un tumore, la valutazione quantitativa dei radiofarmaci attraverso PET e SPECT risulta ancora di difficile interpretazione.

Infatti, l'imaging PET ha una bassa risoluzione spaziale e manca di un chiaro quadro di riferimento anatomico, il che rende difficile localizzare accuratamente strutture anatomiche o lesioni che mostrano un accumulo anomalo di radiofarmaci. Pertanto, ad oggi, tutti questi sistemi sono associati alla Tomografia Computerizzata (CT), che scansiona e rivela accuratamente la morfologia dei distretti corporei, consentendo all'operatore di sovrapporre la fisiologia di un tumore con la sua morfologia.

Fino al 2001, per l'uso clinico erano disponibili solo scanner PET e CT autonomi e non integrati. Tuttavia, è possibile integrare set separati di immagini PET e CT in un unico studio utilizzando metodi ben noti di fusione delle immagini. Un prototipo di scanner PET/CT integrato è stato sviluppato nel 1998 per affrontare le sfide associate alla fusione di set di dati ottenuti da scanner PET e CT autonomi. Questo tipo di scanner fornisce immagini di elevata qualità clinica per PET e CT, consentendo un risparmio sui costi. Il primo sistema PET/CT integrato è apparso in ambito clinico nel 2001. Attualmente, tutti i principali fornitori offrono sistemi PET/CT integrati. Il vantaggio di usare queste tecniche di imaging è che esistono anche per sperimentazione preclinica, il che è fondamentale per rendere i test su radiofarmaci completamente traslazionali, portando i risultati dagli studi con modelli animali direttamente al letto del paziente. Inoltre, ciò che conferisce prestigio a questi dispositivi per uso preclinico è il fatto che la risoluzione è più elevata rispetto ai *device* per uso clinico.

Tuttavia, nonostante le tecniche di analisi dell'imaging clinico abbia fatto notevoli progressi, l'analisi dell'imaging preclinico PET per piccoli animali (microPET) è un ambito ancora attualmente molto discusso e in fase di sviluppo e implementazione. La ragione di ciò è duplice e consiste nel fatto che, da una parte, la ricerca sta progredendo nella creazione di *tool* sempre più performanti e capaci di estrarre più dati e informazioni possibili da ciascun tipo di immagine, e, dall'altro lato, sempre più e attuali e in fase di implementazione risultano gli studi per sviluppare flussi di lavoro capaci di aiutare ad applicare le potenzialità di questi tool sui modelli animali, anche

da parte di professionisti appartenenti a differenti settori scientifici. Tali operatori infatti, non sempre possiedono un *background* formativo specialistico nel settore dell' imaging di modelli animali, e, essendo coinvolti in questo tipo di attività di ricerca, devono interfacciarsi con questi metodi di analisi.

La scienza utilizza la radiomica per estrarre e analizzare caratteristiche (*features* radiomiche), parametri quantitativi estraibili da immagini biomediche, e sta guadagnando crescente attenzione negli ultimi anni non solo in ambito predittivo/prognostico, ma anche per la quantificazione e comparazione pre e post trattamento.

Pertanto, la sfida odierna è quella di ampliare gli orizzonti dell'imaging PET preclinico e dell'analisi quantitativa dell'assorbimento e biodistribuzione di radiofarmaci innovativi attraverso metodiche sempre più mini invasive.

Attraverso l'analisi delle immagini di medicina nucleare, quali PET/SPECT co-registrate con immagini morfologiche di CT, è possibile rivelare in dettaglio la fisiopatologia sottostante a livello di organi e tessuti. Le *features* radiomiche di un tumore possono fornire ulteriori informazioni quantitative oltre che qualitative sulla biologia e sul comportamento del tumore.

Lo scopo di questa tesi è lo sviluppo di un flusso di lavoro innovativo per l'analisi mini invasiva della biodistribuzione di nuovi composti teranostici marcati con Rame-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) e Gallio-64 ( $^{68}\text{Ga}$ ) e diretti a tumori overesprimenti il recettore per la colecistochinina 2, attraverso imaging microPET/CT e algoritmi di intelligenza artificiale e radiomica.

In particolare, i seguenti *topic* saranno trattati in questa tesi:

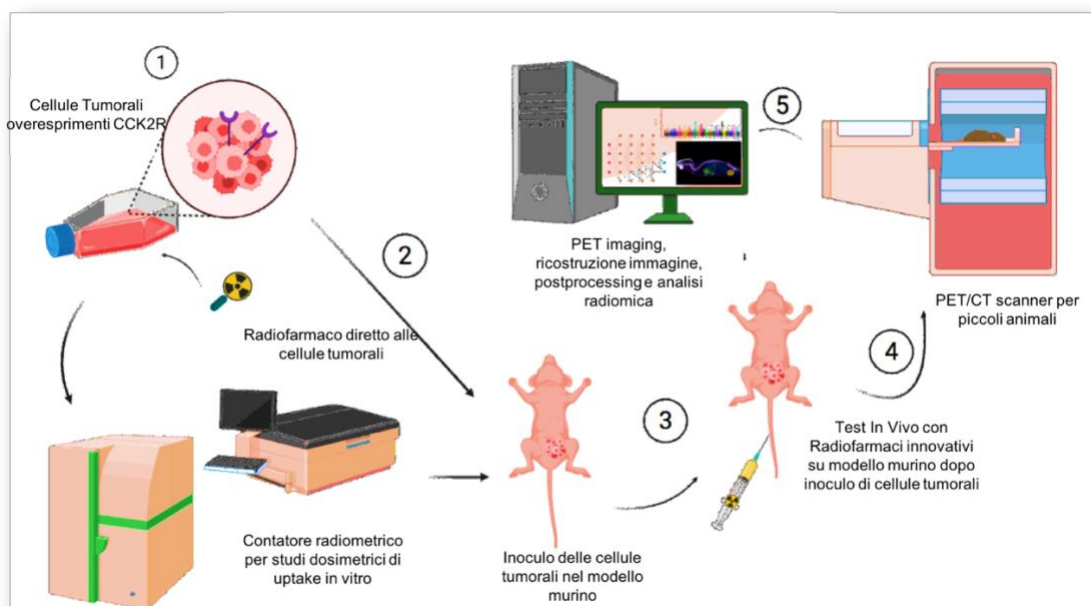
- Una panoramica della struttura dei radiofarmaci marcati con  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$ , definizione di radionuclidi e descrizione delle tecniche di imaging di tomografia ad emissione di positroni (PET), con un focus mirato sulla microPET/CT preclinica;
- Un nuovo sistema di supporto decisionale preclinico basato sulla radiomica in PET: uno studio preliminare sulla valutazione di un innovativo chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$  in modelli murini;
- Valutazione della biodistribuzione di un nuovo radiofarmaco marcato con  $^{68}\text{Ga}$  in un modello murino di cancro che sovraesprime CCK2R: metodi convenzionali e radiomici per l'analisi.

Questa tesi affronta un approccio innovativo per la valutazione della biodistribuzione di nuovi radiofarmaci in esperimenti preclinici in vivo usando imaging PET/CT in ambito teranostico.

La ricerca che verrà descritta ha previsto l'utilizzo in vivo di un nuovo chelante e radiofarmaco marcati con  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$  rispettivamente, basati su un approccio

innovativo e mini invasivo tramite imaging microPET/CT. Lo scopo del lavoro è stato quello di effettuare una analisi quantitativa dell'assorbimento e biodistribuzione di tali composti applicando algoritmi di intelligenza artificiale e l'analisi radiomica. Sebbene ulteriori indagini siano essenziali per validare i risultati, questi studi pongono le basi per approcci teranostici innovativi traslazionali da applicare in oncologia (Fig 1). È stato creato un nuovo metodo di analisi dell'imaging microPET/CT, che consente di effettuare delle valutazioni per quantificare i radiofarmaci assorbiti, estraendo nuovi biomarcatori direttamente dalle immagini. L'innovazione di questa ricerca risiede nella mini invasività di questo metodo di analisi, se si considera che attualmente questo tipo di studi fa uso esclusivamente della quantificazione istopatologica di ciascun organo. L'altro aspetto innovativo risiede nel fatto che fino ad oggi l'analisi radiomica è stata usata solo a scopo predittivo e solo in ambito clinico.

Il risultato ottenuto potrà essere di aiuto anche al personale scientifico coinvolto in questo genere di studi, che, contestualmente, potrebbe trarre ampiamente vantaggio dall'utilizzo di un flusso di lavoro semi automatizzato condotto con algoritmi di intelligenza artificiale e Radiomica da poter usare a supporto dei metodi convenzionali di analisi della biodistribuzione dei radiofarmaci.



**Figura 1.** Flusso di esperimenti nella ricerca traslazionale nell'ambito di nuovi radiofarmaci teranostici per malattie oncologiche.

Questo lavoro è stato sviluppato in collaborazione con il team multidisciplinare presso:

- Laboratorio di Imaging e Radiomica, Fondazione Ri.MED, Italia;
- University Of Pittsburgh Medical Center (UPMC) Italy;

- Dipartimento di Promozione della Salute, Assistenza materno-infantile, Medicina Interna e Specialità Mediche, Medicina Molecolare e Clinica, Università degli Studi di Palermo;
- School of Electrical and Computer Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA;

e grazie al supporto di:

- Istituto di Bioimmagine e Fisiologia Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR);
- *CAPiR* - Center for Advanced Preclinical in vivo Research;
- Dipartimento di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania;
- Unità Operativa di Anatomia Patologica, Dipartimento di Promozione della Salute, Assistenza materno-infantile, Medicina Interna e Specialità Mediche, Università degli Studi di Palermo;
- Emory University, Atlanta School of Medicine, GA, USA.

I contributi proposti hanno prodotto 16 pubblicazioni scientifiche su riviste e convegni indicizzati di informatica, biologia, biotecnologia e medicina. I lavori fino ad ora svolti risultano molto utili per il miglioramento dell'analisi delle immagini PET su modelli animali e possono essere utilizzati quotidianamente come sistemi di supporto alle decisioni biomediche per migliorare l'attuale metodologia utilizzata dagli operatori sanitari nelle valutazioni della biodistribuzione di nuovi radiofarmaci in modo mini-invasivo.

Gli sviluppi futuri di questa ricerca riguardano l'integrazione dei dati acquisiti mediante l'analisi di immagini con altri dati di radiobiologia in ambito oncologico provenienti da un'ampia tipologia di fonti differenti.

*Alla Mia Famiglia.  
Alla Stella Polare della mia vita, Mia Madre.*

## ABBREVIAZIONI

**μPET/CT:** microPET/CT (per piccoli animali)

**<sup>111</sup>In:** Indio-111

**<sup>11</sup>C:** Carbonio-11

**<sup>123</sup>I:** iodio-123

**<sup>124</sup>I:** iodio-124

**<sup>131</sup>I:** iodio-131

**<sup>13</sup>N:** Azoto-13

**<sup>15</sup>O:** Ossigeno-15

**<sup>177</sup>Lu:** Lutezio-177

**<sup>18</sup>F-FDG:** 2-desossi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucosio

**<sup>18</sup>F:** Fluoro-18

**<sup>225</sup>Ac:** attinio-225

**<sup>235</sup>U:** Uranio-235

**<sup>47</sup>Sc:** scadio-47

**<sup>64</sup>Cu:** Rame-64

**<sup>64</sup>Ni:** Nickel-64

**<sup>64</sup>Zn:** zinco-64

**<sup>66</sup>Ga:** Gallio-66

**<sup>67</sup>Ga:** Gallio-67

**<sup>68</sup>Ga:** Gallio-68

**<sup>68</sup>Ge:** Germanio-68

**<sup>86</sup>Y:** ittrio-86

**<sup>89</sup>Zr :** Zirconio-89

**<sup>90</sup>Y:** ittrio-90

**<sup>99m</sup>Tc:** Tecnezio-99 metastabile

**A431 CCK2R+:** cellule di carcinoma epidermoide umano overesprimente il recettore CCK2R

**A431:** linee cellulari di carcinoma epidermoide umano

**Ag-111:** Argento-111

**AK2:** adenilato chinasi 2

**AKT:** attivazione della COX-2 dipendente dalla proteina chinasi B

**BFC:** chelante bifunzionale

**CCK:** colecistochinina

**CCK1R:** recettore 1 della colecistochinina

**CCK2R:** recettore 2 della colecistochinina

**CT:** Tomografia Computerizzata

**DICOM:** Digital Imaging and Communications in Medicine

**DNA:** Acido DessossiriboNucleico

**DO2A2S:** 1,7-bis[2-(methylsulfonyl)ethyl]-4,10-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

**DOTA:** 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid

**E:** energia  
**EC:** Cattura Elettronica  
**FBP:** Retroproiezione Filtrata  
**FORE:** Fourier rebinning  
**FOV:** field of view  
**G17:** gastrina 17  
**Ga<sup>3+</sup>:** Gallio(III)  
**GEMM:** modelli murini ortotopici geneticamente modificati  
**GLCM:** matrice di co-occorrenza a livello di grigio  
**GLDM:** matrice a livello di grigio matrice di dipendenza  
**GLRLM:** matrice di lunghezza di esecuzione a livello di grigio  
**GLSZM:** matrice della zona di dimensione del livello di grigio  
**He:** elio  
**IBSI:** Image Biomarker Standardization Initiative  
**IT:** Transizione Isomerica  
**KeV:** kiloelettronvolt  
**LET:** Linear Energy Transfer  
**LoR:** linea di risposta  
**mAb:** anticorpi monoclonali  
**mCi:** milli Curie  
**MCL-1:** MAPK-dipendente nella leucemia a cellule mieloidi 1  
**MeV:** Mega elettronVolt  
**ML :** Massima Verosimiglianza  
**NET:** Tumori Neuroendocrini  
**NGLDM:** matrice di dipendenza del livello di grigio vicina  
**NODAGA:** 1,4,7-triazacyclononane, 1-glutaric acid-4,7 acetic acid  
**NOTA:** 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid  
**OSEM:** Massimizzazione Delle Aspettative Del Sottoinsieme Ordinato  
**PDX:** xenotrapianto derivato dal paziente  
**PET:** Tomografia a Emissione di Positroni  
**PKC:** proteina chinasi C  
**PVE:** Effetto del Volume Parziale  
**ROI :** regione di interesse  
**SPECT:** Tomografia Computerizzata A Emissione Di Fotone Singolo  
**SSRB:** single-slice rebinning  
**STAT3:** trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3  
**SUV:** Valore di assorbimento standardizzato  
**T1/2:** tempo di dimezzamento  
**Te:** Tellurio  
**TETA:** Triethylenetetramine  
**TRT:** Targeted Radionuclide Therapy  
**WT:** Wild Type  
**Z-360:** Nastorazepide

**μ: micro**

## Indice

<b>SOMMARIO</b>	<b>1</b>
<b>ABBREVIAZIONI</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Radioteranostica</b>	<b>12</b>
1.2.1 Valutazione Sperimentale di un Radiofarmaco	12
1.2.2 Terapia Mirata con Radionuclidi e Radioteranostica	14
1.2.3 Test dell'Agente Target e Recettore della Colecistochinina	15
1.2.4 Imaging con Radionuclidi: Tomografia Computerizzata a Emissione di Fotone Singolo (SPECT) e Tomografia a Emissione di Positroni (PET)	17
1.2.5 Classificazione dei Radionuclidi e Nuove Applicazioni nella Ricerca Traslazionale	18
<b>1.3 Molecular Imaging e Tomografia Computerizzata</b>	<b>24</b>
1.3.1 PET e SPECT	24
1.3.2 Protocolli Standard di Imaging PET	25
1.3.3 MicroCT Imaging	26
1.3.4 PET/CT: Imaging Multimodale	27
1.3.5 Radiofarmaci Innovativi e Imaging PET/CT Preclinica ( $\mu$ PET/CT)	28
1.3.6 Radionuclide Rame-64 ( $^{64}\text{Cu}$ )	29
1.3.7 Radionuclide Gallio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )	30
1.3.8 Cenni di Struttura Atomica e Decadimento Radioattivo	31
<b>1.4 Elaborazione dell'Imaging</b>	<b>35</b>
1.4.1 Ricostruzione dell'Imaging	35
1.4.2 Fusione dell'Imaging	35
<b>1.5 Analisi dell'Imaging</b>	<b>37</b>
1.5.1 Analisi dell'Imaging PET	37
1.5.2 Segmentazione	38
<b>1.6 Applicazione di Algoritmi di Intelligenza Artificiale nell'analisi dell'Imaging</b>	<b>39</b>
1.6.1 Radiomica	39
1.6.2 Test Statistici e Analisi	42

<b>2</b>	<b><u>SCOPO DELLO STUDIO</u></b>	<b>45</b>
2.1	Uno Studio Preliminare sulla Valutazione della Biodistribuzione Usando un Metodo non Invasivo Basato su un Workflow Radiomico su Imaging PET con un Composto Marcato con <sup>64</sup> Cu in Ambito Preclinico	45
2.2	Estensione del Workflow Radiomico su Sperimentazione Preclinica Usando un Radiofarmaco Marcato con <sup>68</sup> Ga in un Modello Murino di Cancro CCK2R-Positivo	46
<b>3</b>	<b><u>MATERIALIE METODI</u></b>	<b>47</b>
3.1	Esperimenti con <sup>64</sup> Cu - un Nuovo Sistema di Supporto Decisionale Preclinico Basato sulla Radiomica in PET: uno Studio Preliminare Sulla Valutazione di un Innovativo Chelante Marcato con <sup>64</sup> Cu in Modelli Murini	48
3.1.1	Composto e Radiomarcatura	48
3.1.2	Gruppi Sperimentali e Modello Murino	48
3.1.3	Dati Tecnici di Acquisizione di Imaging $\mu$ PET/CT	50
3.1.4	Co-Registrazione di Imaging PET/CT con Atlante Murino	51
3.1.5	Estrazione delle Features di Radiomica	53
3.1.6	Analisi Statistiche e Valutazione del Risultato della Performance di Analisi	53
3.2	Esperimenti Con <sup>68</sup> Ga - Valutazione della Biodistribuzione di un Nuovo Radiofarmaco Marcato con Ga-68 in un Modello Murino di Cancro che Sovraesprime CCK2R: Metodi Convenzionali e Radiomici per l'analisi	55
3.2.1	Radiofarmaco	55
3.2.2	Modello Animale e Linee Cellulari	55
3.2.3	Acquisizioni PET/CT	57
3.2.4	Valutazione della Necrosi Tumorale	58
3.2.5	Segmentazione Multiorgano Basata su Atlas	59
3.2.6	Estrazione e Analisi delle Features Radiomiche	61
<b>4</b>	<b><u>RISULTATI E DISCUSSIONI</u></b>	<b>63</b>
4.1	Esperimenti con <sup>64</sup> Cu	63
4.2	Esperimenti con <sup>68</sup> Ga	71
<b>5</b>	<b><u>CONCLUSIONI</u></b>	<b>76</b>
	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>79</b>

## CAPITOLO 1

### 1 Introduzione

La terapia radiofarmaceutica (*Radiopharmaceutical Therapy - RPT*) è un approccio al trattamento del cancro che impiega radiofarmaci iniettabili. Da più di 50 anni ha continuato a progredire nel tempo grazie alla scoperta di nuovi vettori e bersagli. La RPT utilizza proprietà biologiche simili alla radioterapia a fasci esterni, ma viene somministrata a livello sistemico e raggiunge il bersaglio in tutto il corpo. Questa terapia è spesso guidata dall'imaging dello stesso bersaglio, che consentendo all'operatore di identificare il bersaglio da colpire con una sonda radioattiva, può al contempo, danneggiare e ablate il bersaglio attraverso le radiazioni ionizzanti. Il primo utilizzo importante della RPT è stato per il trattamento delle malattie benigne e maligne della tiroide. Attualmente, la maggior parte delle nuove indicazioni mira a stabilizzare la malattia allo stadio terminale resistente ad altri trattamenti per poi intervenire con questa metodica più selettiva.

L'imaging di piccoli animali da laboratorio è ormai consolidato come una componente critica della ricerca biomedica preclinica e traslazionale. L'imaging preclinico infatti, consente analisi seriali di modelli di roditori (topi e ratti) di cancro umano e malattie cardiovascolari, neurologiche e di altro tipo durante il decorso naturale del processo patologico. Lo sviluppo di modelli di cancro e altre malattie di roditori geneticamente modificati è sempre più realistico e la capacità di monitorare questi modelli di malattie a lungo termine è quindi inestimabile. Inoltre, i modelli animali interi intatti facilitano lo studio degli aspetti sistemici della malattia come le metastasi del cancro. Prima dell'inizio dell'imaging di piccoli animali, gli animali da esperimento venivano generalmente sottoposti a imaging utilizzando strumentazione clinica. La necessità di una migliore risoluzione spaziale, di strumenti dedicati per l'imaging di piccoli animali, e contestualmente per l'analisi di imaging preclinico, e di strutture centralizzate per ospitare questi strumenti è stata motivata da una serie di considerazioni pratiche. Questi metodi possono accelerare il processo di scoperta dei farmaci e fornire analisi tempestive e clinicamente più significative della risposta terapeutica.

#### 1.2 RADIOTERANOSTICA

##### 1.2.1 Valutazione Sperimentale Di Un Radiofarmaco

Studi in vitro e in vivo sono fondamentali per determinare l'accuratezza, la selettività, la stabilità e le proprietà farmacocinetiche di peptidi e piccole molecole (*small*

*molecules*) radiomarcate. I dati di imaging non invasivi sono importanti anche per determinare le proprietà di imaging di un nuovo tracciante.

Gli studi sono necessari per verificare se il tracciante viene eliminato prevalentemente per via epatica o renale e se, in casi specifici, la barriera ematoencefalica viene superata. In questi casi, così come nella presente attività di ricerca, il tracciante viene iniettato nella vena della coda del topo e l'attività viene misurata utilizzando un contatore apposito che rileva l'attività presente nel volume iniettato all'inizio dell'esperimento, ma anche la quantità residua dopo l'iniezione, al fine di stimare il valore esatto dell'attività iniettata nell'animale. I protocolli standard possono includere indagini sulla stabilità metabolica del tracciante nel sangue, nel tumore, nei reni e nel fegato <sup>1</sup>.

La maggior parte degli approcci che utilizzano peptidi/*small molecule* o altri *carrier* radiomarcati si concentrano sul targeting dei recettori coinvolti nella biologia del tumore. Il fattore più importante nello sviluppo di questi traccianti è la scelta del modello di tumore appropriato. Nei casi in cui viene preso di mira un sottoinsieme di recettori, ciò può essere ottenuto utilizzando linee cellulari geneticamente modificate o selezionando linee cellulari con il modello di espressione desiderato. La maggior parte delle valutazioni in vivo vengono eseguite su topi o ratti, a cui viene iniettata per via sottocutanea la corrispondente linea cellulare tumorale. In alcuni casi, nella valutazione possono essere inclusi topi transgenici <sup>2</sup>. Questi topi possono essere utilizzati per studiare la funzione e la regolazione dei geni dei mammiferi, nonché per creare modelli di malattie umane che comportano la sovraespressione o la mancata espressione di una particolare proteina. Al contrario, per applicazioni oncologiche, sono utilizzati i topi nudi, in quanto molto performanti nell'inoculo e adesione delle colture cellulari tumorali in distretti quali la regione sottocutanea o il pannicolo adiposo, ecc <sup>3</sup>.

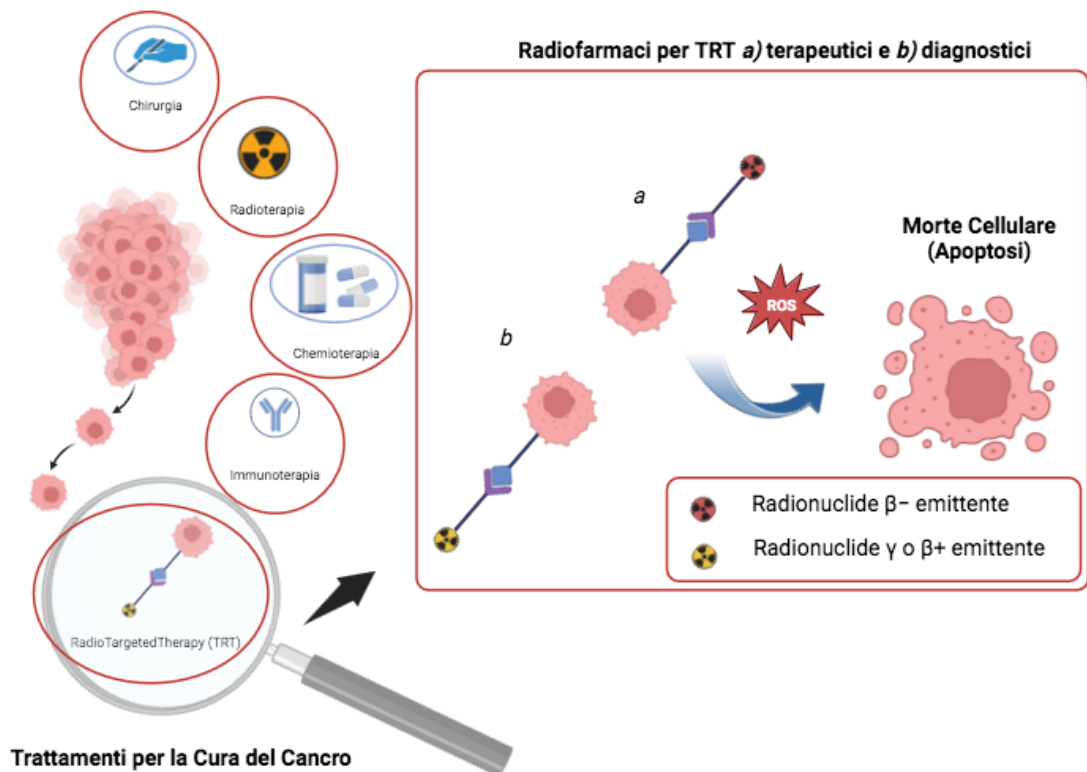
Un passo importante nello sviluppo del radiotracciante è la valutazione del composto radiomarcato utilizzando i corrispondenti modelli di malattia. Nella maggior parte dei casi vengono utilizzati xenotrapianti tumorali coltivati nei topi e il periodo di crescita dipende dal tipo di cellula tumorale utilizzata. Molte linee cellulari possono essere iniettate in sistemi tampone, ad esempio il tampone fosfato salino (*PBS*), ma per alcune linee cellulari è consigliato il Matrigel. Quest'ultimo contiene proteine strutturali e fattori di crescita che promuovono la differenziazione e la proliferazione di molti tipi cellulari. Dopo che il tumore ha raggiunto le dimensioni desiderate, la distribuzione del tracciante può essere studiata seguendo i protocolli di interesse, che dipendono sia dal tipo di decadimento sia dal tipo di emissione di radiazioni del composto radiomarcato da testare. Il rapporto tumore-fondo è un parametro importante per trarre conclusioni riguardo alle prestazioni del tracciante, ma è anche importante dimostrare che l'accumulo è tumore-specifico o specifico per il recettore target per il quale il composto è stato progettato <sup>4</sup>.

### 1.2.2 Terapia Mirata con Radionuclidi e Radioteranostica

In medicina nucleare, la terapia radionuclidica mirata (*Targeted Radionuclide Therapy - TRT*) è una tecnica all'avanguardia che consiste nell'utilizzo di radiofarmaci mirati a specifiche cellule bersaglio, i cui radionuclidi hanno delle energie e tipi di emissioni di radiazioni ionizzanti (es. particelle  $\alpha$ , raggi  $\beta^-$ , fotoni  $\gamma$ ) tali da andare a generare effetti citotossici e genotossici a cascata sulle cellule target <sup>5</sup>. Rispetto alla RPT, in cui spesso il radiofarmaco viene internalizzato attraverso pathway passivi a livello della membrana cellulare, la TRT agisce quasi sempre in modo attivo nei confronti dei recettori tumorali. Fino all'imaging di Tomografia a Emissione di Positroni (PET), i traccianti erano in gran parte limitati agli isotopi di iodio e al tecnezio 99-metastabile (<sup>99m</sup>Tc). Al momento, lo sforzo principale nel campo dello sviluppo di radiotraccianti è l'identificazione di sonde specifiche per colpire strutture cellulari, come i recettori associati al tumore.

La TRT differisce dalla radioterapia classica in quanto come bersaglio viene considerata una parte specifica delle cellule tumorali, come un recettore, anziché una parte tissutale del corpo. Ciò serve per permettere ai radiofarmaci di andare a colpire specificatamente quel recettore (*binding*) e di essere internalizzato per poter svolgere la sua azione in modo focalizzato e a corto raggio <sup>6</sup>, preservando i distretti tissutali sani. Per la progettazione e la scelta del radionuclide da utilizzare in una formulazione radiofarmaceutica in generale vanno considerate tutte le caratteristiche fisiche di ciascun isotopo radiattivo, come per esempio il tipo di energia emessa dal radionuclide, la sua emivita, tempo di dimezzamento e trasferimento lineare di energia (*Linear Energy Transfer - LET*), oltre alle caratteristiche biologiche del vettore di targeting che deve essere scelto per riconoscere il biomarcatore <sup>7</sup>.

Trattandosi di medicina di precisione e basandosi sul principio della TRT, la Radioteranostica (o Teranostica radiofarmaceutica), ha guadagnato popolarità negli ultimi anni <sup>8</sup> in quanto rappresenta un campo di applicazione molto innovativo, permettendo in ambito clinico di andare a ridurre le dosi di radiazioni ionizzanti sia in diagnosi che in terapia. Ciò è vero in quanto, come verrà approfondito nelle seguenti sezioni, questa branca della medicina nucleare si basa sulla scoperta di radiofarmaci utili per un doppio scopo, quello diagnostico ma anche terapeutico. Questo approccio è importante perché consente di marcare un singolo vettore target sia con radionuclidi adatti a imaging diagnostico (per esempio  $\gamma$  o  $\beta^+$  emettitori) sia radionuclidi adatti a terapia (che emettono  $\beta^-$ ) <sup>9</sup> (vedere Figura 2).



**Figura 2.** Panoramica degli attuali trattamenti oncologici. Focus sulla tipologia di struttura dei farmaci Radioteranostici: essi sono sviluppati, mantenendo fissa la componente affine al biomarcatore tumorale da colpire, e cambiando, in base allo scopo terapeutico(a)/diagnostico(b), soltanto il radionuclide.

### 1.2.3 Test Dell'agente Target E Recettore Della Colecistochinina

Il metabolismo fisiologico è essenziale per il corretto funzionamento di un organismo. Un assorbimento e un accumulo eccessivi di substrati possono interrompere questa omeostasi fisiologica, portando a disturbi metabolici come obesità, iperlipidemia, diabete e cancro.

Una porzione essenziale della cellula da considerare per la progettazione della struttura di un radiofarmaco per la radioterapia mirata è costituito dal recettore cellulare, cioè il *target* biologico (figura 2). La sua importanza è dovuta al concetto di *binding*, ovvero il riconoscimento e affinità che il farmaco e il target devono avere per fare in modo che determinati pathway vengano attivati o inibiti, e per consentire l'internalizzazione cellulare, nel caso terapeutico del farmaco stesso. In base al recettore sovraespresso sulle cellule tumorali, una porzione del radiofarmaco viene sviluppata opportunamente ed essa può essere dotata di vari chelanti che, in base al radionuclide selezionato, possono essere o meno distanziati con uno specifico linker in modo da permettere un corretto ingombro sterico utile alla sua efficacia biologica.

In questo progetto, come target biologico del radiofarmaco marcato con  $^{68}\text{Ga}$  è stato selezionato il recettore 2 della colecistochinina (CCK2R), molto utilizzato in studi di medicina nucleare e oncologia data la sua abbondante percentuale di overespressione in vari tipi di tumori come l'ovaio, il tratto gastrointestinale, il colon, la mammella, il carcinoma midollare della tiroide, il polmone e il pancreas <sup>10</sup>.

Oltre alla gastrina, la colecistochinina (CCK) funziona come un ormone peptidico neuro-intestinale che regola la fisiologia metabolica del sistema gastrointestinale. La CCK è prodotta prevalentemente dalle cellule I dell'intestino tenue e da specifici neuroni cerebrali. Pertanto, agisce come neurotrasmettitore e stimola la secrezione di enzimi pancreatici e la contrazione della cistifellea <sup>11</sup>. L'espressione della CCK endocrina segue un andamento bifasico, aumentando improvvisamente dopo la nascita e aumentando più lentamente durante l'età adulta. La CCK è coinvolta in diverse funzioni come i processi antinfiammatori e l'escrezione di sodio nelle urine <sup>12</sup>. I frammenti peptidici umani CCK più comuni sono CCK-58, CCK-33, CCK-22 e CCK-8, che attivano CCKR, un recettore accoppiato a proteine G. Il recettore CCKR è costituito da sette domini transmembrana, collegati da code N-terminali intracellulari e code C-terminali extracellulari, organizzate in anse. Esistono due tipi di CCKR, denominati CCKR di tipo 1 (CCK1R o CCKAR) e CCKR di tipo 2 (CCK2R o CCKBR o recettore della gastrina). Il CCK1R è costituito da 428 residui amminoacidici, mentre il CCK2R è costituito da 447 residui <sup>13</sup>. La principale distinzione tra CCK1R e gastrina risiede nel modello di riconoscimento del ligando. CCK1R lega il CCK (solfato) con un'affinità da 500 a 1000 volte più potente della gastrina e del CCK non solfato. Un farmacoforo CCK2R è rappresentato dalla sua amide pentapeptide carbossi-terminale, che può essere trovata sia nella CCK che nella gastrina. Pertanto, CCK2R lega la gastrina, la CCK solfatata e quella non solfatata con la stessa affinità e potenza, e non può discriminare tra le due forme di CCK <sup>14</sup>. La localizzazione di CCK2R ha un ruolo cruciale, poiché facilita l'interazione con diversi neurotrasmettitori, tra cui dopamina, serotonina e glutammato, nonché ormoni ipotalamici e neuropeptidi. Il CCK1R è espresso prevalentemente nel tratto gastrointestinale e nelle cellule acinose del pancreas, mentre il CCK2R si trova prevalentemente nello stomaco e nel sistema nervoso centrale <sup>15</sup>. CCK1R non sembra essere coinvolto nei processi di proliferazione, migrazione e apoptosi, a differenza della sua isoforma. CCK2R è implicato in numerosi percorsi che comunemente svolgono un ruolo nell'insorgenza dei tumori <sup>16</sup>. Alcuni di questi percorsi coinvolgono CCK2R, inclusa la sovraregolazione di BAX dipendente da CCK2R/COX-2 e Fas/FADD/caspasi8, nonché la sovraregolazione di CCK2R/proteina chinasi C (PKC)/MAPK-dipendente nella leucemia a cellule mieloidi 1 (MCL-1). Il coinvolgimento di CCK2R nei processi apoptotici rimane poco chiaro. Maggiore attenzione è stata invece rivolta al ruolo di CCK2R nel processo di proliferazione. La gastrina 17 (G17) e altri agonisti CCK2R sono stati collegati alla stimolazione della proliferazione cellulare tramite adenilato chinasi 2 (AK2)/trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3)/PI3K/attivazione della COX-2 dipendente dalla proteina chinasi B (AKT) <sup>16</sup>. Livelli elevati di gastrina promuovono la proliferazione delle cellule tumorali

attraverso l'attivazione di CCK2R, che a sua volta promuove le vie PI3K-AKT, notevoli per il coinvolgimento nella sopravvivenza delle cellule tumorali. Tumori multipli, incluso il cancro del pancreas umano, esprimono CCK2R. È stato scoperto che CCK2R è sovraespresso in vari tipi di tumore, tra cui il cancro del pancreas, il cancro della tiroide e i tumori apocrini del polmone, nonché i tumori delle cellule ovariche e gastrointestinali <sup>17</sup>. Gli antagonisti CCK2R sono utilizzati nella terapia mirata e nella medicina di precisione e possono essere utilizzati in soluzioni diagnostiche, terapeutiche e teranostiche innovative <sup>18</sup>.

Per colpire CCK2R, ad oggi, sono stati identificati e sviluppati diversi peptidi e anticorpi monoclonali (mAb). Inoltre, recentemente l'attenzione è stata spostata su alcune *small molecules*, che, rispetto ai peptidi e mAb hanno molti vantaggi, inclusi la non immunogenicità, la possibilità di essere sintetizzati chimicamente in modo efficace, la loro capacità di penetrare maggiormente in profondità nei tessuti e quindi poter attraversare facilmente i vasi sanguigni <sup>19</sup>. In questo progetto pertanto è stata selezionata la piccola molecola Nastorazepide (Z-360) <sup>20</sup>. Ai fini di questa attività di ricerca, lo Z-360 è stato opportunamente modificato a livello chimico per aumentare l'affinità di questa porzione per CCK2R. Tali modifiche chimiche sono state condotte grazie al lavoro di altri partner che si sono occupati interamente della sintesi e modifica dei composti che sono stati testati nel presente manoscritto.

#### **1.2.4 Imaging con radionuclidi: tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo (SPECT) e tomografia a emissione di positroni (PET)**

L'imaging dei radionuclidi offre una serie di importanti vantaggi rispetto ad altre modalità di imaging, incluso il fatto che le attività somministrate necessarie per l'imaging corrispondono a dosi di massa non farmacologiche e non perturbanti. Inoltre, le immagini dei radionuclidi sono quantitative o almeno semiquantitative.

L'imaging *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) e *Positron Emission Tomography* (PET) prevede l'acquisizione di immagini di proiezione da più angolazioni con incrementi angolari di 1 - 3° attorno al soggetto, la correzione per la risposta non uniforme del sistema di imaging e la ricostruzione matematica delle immagini della sezione trasversale. Entrambe le tomografie migliorano il contrasto dell'immagine e l'accuratezza quantitativa eliminando il contributo del conteggio derivante dalle attività nei tessuti sopra e sotto la sezione di interesse. La gamma-camera, nota anche come fotocamera a scintillazione o Anger, è il dispositivo predominante per entrambi gli scanner imaging PET e SPECT.

Nei sistemi di piccoli animali vengono utilizzati più cristalli opposti, tipicamente di forma quadrata. Un collimatore di gamma-camera, costituito da una piastra di piombo con fori (aperture), direziona la radiazione in arrivo <sup>21</sup>.

Nei sistemi clinici vengono utilizzati quasi esclusivamente collimatori a fori paralleli. Per i sistemi preclinici, vengono attualmente utilizzate aperture stenopeiche multi-

apertura angolate l'una rispetto all'altra, che combinano l'effetto di ingrandimento e la migliore risoluzione della collimazione stenopeica con la maggiore sensibilità offerta dalle aperture multiple.

In generale, il segnale luminoso proveniente da una soluzione di scintillazione (o da uno scintillatore solido) colpisce una serie bidimensionale di tubi fotomoltiplicatori (PMT) che sostengono il cristallo e l'intensità della luce che raggiunge ciascun PMT varia inversamente alla distanza tra il scintillatore e il rispettivo PMT.

L'imaging SPECT utilizza un gruppo gamma-camera che ruota attorno al soggetto per acquisire immagini di proiezione. Si può scegliere di utilizzare la collimazione a fori paralleli per l'imaging planare dinamico o statico <sup>22</sup>.

La PET utilizza positroni emessi da radionuclidi con un rapporto protoni-neutroni instabilmente elevato, che percorrono solo una breve distanza prima di andare incontro al processo di annichilazione (che verrà discusso in sezione 1.3.8). La direzione da cui ha avuto origine un evento di annichilazione viene quindi definita elettronicamente e la sensibilità è di due o tre ordini di grandezza superiore a quella della SPECT. Gli scanner PET clinici in genere si estendono per 15-20 cm nella direzione longitudinale del paziente, mentre in preclinica possono acquisire l'immagine di un topo intero in un'unica posizione del lettino. Il gruppo del rivelatore non ruota e i dati di proiezione vengono acquisiti contemporaneamente completamente attorno al soggetto. I moderni scanner PET utilizzano una serie di anelli di rivelatori discreti di piccola area che circondano il soggetto. I rivelatori più largamente utilizzati sono costituiti dal germanato di bismuto, l'ossido di silicato di gadolinio drogato con cerio, l'ossidi di silicato di lutezio drogato con cerio e l'ossido di silicato di ittrio drogato con cerio <sup>23</sup>.

### **1.2.5 Classificazione dei Radionuclidi e Nuove Applicazioni nella Ricerca Traslazionale**

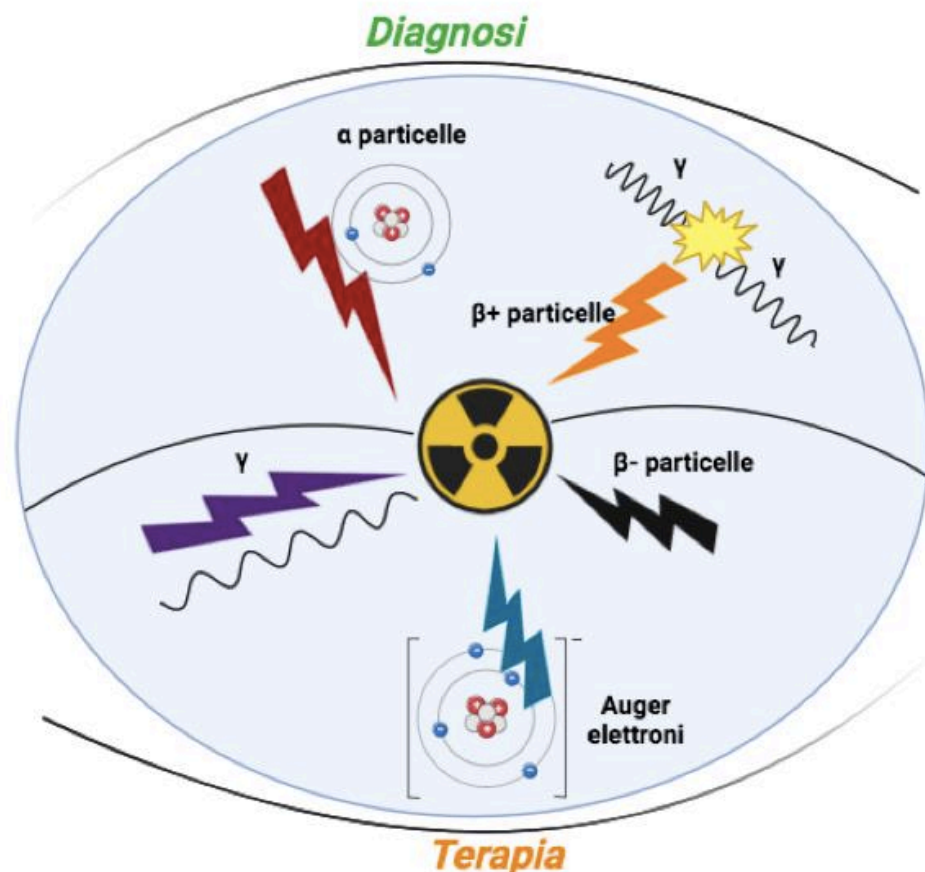
La medicina teranostica è molto promettente, ma il suo successo futuro dipende dalla disponibilità di radionuclidi adeguati allo scopo e dei composti organometallici utili alla loro preparazione, ovvero tutta la parte chimica coniugata alla porzione radioattiva utile al binding target-specifico <sup>24</sup>. Il futuro della tecnologia di produzione dei radionuclidi appare molto luminoso. Parlando di medicina nucleare e radioteranostica è necessario focalizzare innanzitutto l'attenzione sulla struttura di questi farmaci, partendo dalla componente radioattiva, ovvero il radionuclide. Come accennato precedentemente, i radionuclidi sono isotopi instabili che, attraverso processi di decadimento radioattivo, emettono subparticelle dotate di una specifica intensità di energia cinetica e radiazioni elettromagnetiche ad alta energia (quali ad es.  $\alpha$ ,  $\beta^{+/-}$ , elettroni Auger e/o raggi  $\gamma$ ) in un tempo chiamato tempo di dimezzamento o emivita ( $t_{1/2}$ ). Quest'ultimo costituisce una caratteristica intrinseca di ogni specie radioisotopica, insieme all'energia, al LET, ecc <sup>25</sup>. È proprio grazie a queste caratteristiche proprie di ciascuna specie radioattiva, che viene selezionato il radionuclide per la marcatura del radiofarmaco, e conseguentemente per il fine stesso

di quest'ultimo dal punto di vista delle applicazioni biomediche. Pertanto, oltre a questa prima classificazione, in base al fine preclinico e clinico, è possibile fare un'ulteriore sottoclassificazione.

I radionuclidi per uso diagnostico possono essere distinti in due tipi:

- (i) radionuclidi che emettono quasi esclusivamente raggi  $\beta^+$ , rilevabili tramite PET <sup>5</sup> ;
- (ii) raggi  $\gamma$ , rilevabili tramite SPECT <sup>26</sup> .

Di contro, tipicamente i radionuclidi utilizzati a scopo terapeutico sono caratterizzati da decadimento elettronico  $\alpha$ ,  $\beta^-$  o Auger <sup>27</sup> . Bisogna considerare che, in fase di sviluppo, ma ancora prima in fase di test, è necessario bilanciare la quantità di dose di ciascun farmaco in base all'attività del radionuclide. Ciò è essenziale per ridurre, e in particolare evitare, gli effetti della radiosensibilizzazione sul tumore bersaglio <sup>28,29</sup> . È per tale motivo che molti studi sono volti all'ottimizzazione di protocolli traslazionali che vadano a ridurre la dose di radiazioni ionizzanti, aumentando il beneficio del trattamento diagnostico e/o terapeutico (Figura 3), salvaguardando i tessuti sani.



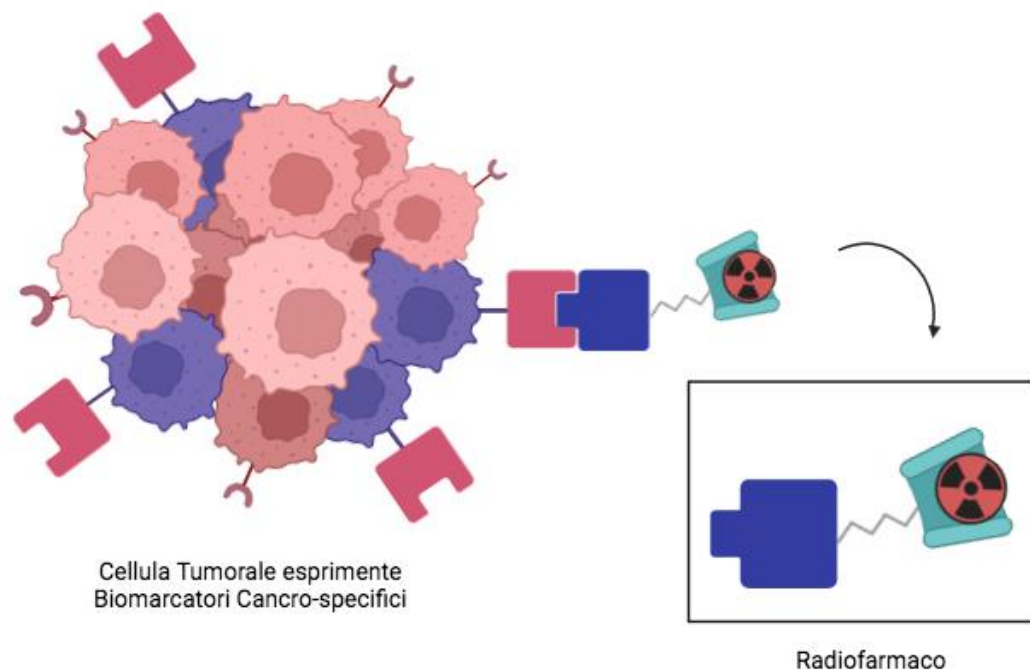
**Figura 3.** Approcci diagnostici e terapeutici che utilizzano emissioni di radiazioni ionizzanti.

Le emissioni  $\beta^+$  e  $\gamma$  vengono utilizzate per scopi diagnostici, poiché sia l'imaging PET che SPECT possono rilevarle. Gli elettroni  $\alpha$ ,  $\beta$  e Auger sono impiegati per applicazioni terapeutiche grazie al loro elevato LET.

La valutazione dell'efficacia biologica della dose radiofarmaceutica su bersagli specifici necessita di alcune considerazioni. Per utilizzare i radionuclidi terapeutici, infatti, alcuni parametri, quali il tempo di dimezzamento, l'energia e l'attività dei radionuclidi, devono essere valutati previamente in modo da poter bilanciare gli effetti della radiosensibilizzazione sul tumore bersaglio, evitando che i tessuti cancerosi possano sviluppare risposte adattative, e quindi, consentendo un miglioramento dell'ablazione del tumore e una diminuzione dei meccanismi di radioresistenza del tumore. Alcuni radiofarmaci come il 2-desossi-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-D-glucosio ( $^{18}\text{F}$ -FDG) sono diretti verso cellule particolari, senza la necessità di utilizzare agenti di modifica e targeting aggiuntivi. Infatti, il radiotracciante  $^{18}\text{F}$ -FDG è un analogo del glucosio, in cui un gruppo ossidrilico è stato sostituito con  $^{18}\text{F}$  <sup>30</sup>. A causa della sua somiglianza strutturale con il glucosio, il  $^{18}\text{F}$ -FDG mostra una naturale inclinazione ad essere assorbito selettivamente dai tumori in rapida proliferazione <sup>31</sup>. Il metabolismo disfunzionale del glucosio nelle cellule tumorali costringe queste ultime ad aumentare l'assorbimento del glucosio e il tasso glicolitico, raggiungendo spesso livelli fino a 200 volte superiori rispetto a quelli dei tessuti normali. Questo fenomeno è noto come effetto Warburg, caratteristica fisio-metabolica ampiamente considerata negli studi di ricerca sul cancro <sup>32</sup>. L'importanza del  $^{18}\text{F}$ -FDG ha portato alla sintesi di ulteriori surrogati simili al glucosio. Questi ultimi sono stati inoltre ottimizzati per la marcatura anche con altri radionuclidi diagnostici, tra cui  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , Indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ),  $^{18}\text{F}$ , Gallio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) e Rame-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ).

Schematizzando, i componenti principali caratterizzanti la struttura dei radiofarmaci sono pertanto i seguenti:

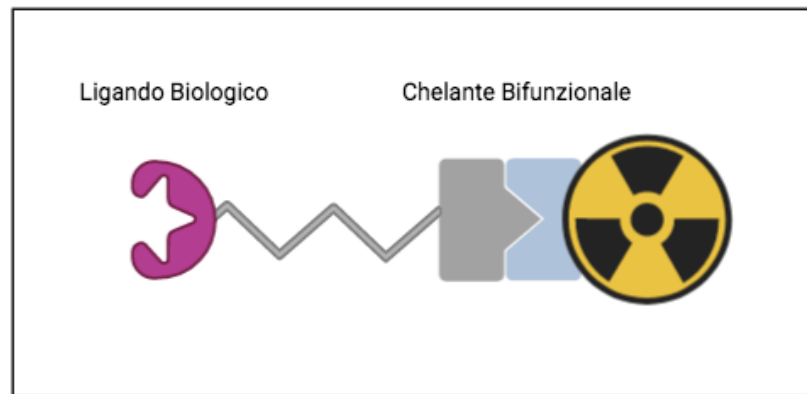
- (i) il radionuclide, che grazie al tipo di radiazioni ionizzanti emesse, causa danni singoli/doppi all'acido desossiribonucleico (*DNA*) delle cellule colpite, e grazie alle tecniche di imaging PET e SPECT, conferisce le proprietà traccianti diagnostiche (imaging);
- (ii) una biomolecola o ligando specifico (*targeting vector*) che definisce il riconoscimento, affinità e internalizzazione del radiofarmaco sul bersaglio cellulare;
- (iii) un chelante, generalmente presente, che stabilizza i metalli radioattivi;
- (iv) un *linker* o molecola direzionante capace di connettere l'intera molecola in modo stabile (vedere Figura 4).



**Figura 4.** Meccanismo di azione dei radiofarmaci per TRT su cellule target tumorali. Dettaglio della struttura di un radiofarmaco costituito da: (i) il radionuclide (ROSSO), (ii) una biomolecola o ligando specifico (BLU); (iii) un chelante (CELESTE); (iv) un *linker* o molecola direzionante (GRIGIO).

Contrariamente ai radiofarmaci contenenti radionuclidi come iodio, fluoro o isotopi di carbonio che sono legati covalentemente ai *drug carrier*, la maggior parte dei radiofarmaci per imaging che contengono un metallo all'interno della struttura, necessitano di altri componenti, come i chelanti. I chelanti svolgono la loro azione sequestrando cationi metallici e, pertanto, conferiscono al radiofarmaco un'elevata stabilità termodinamica e cinetica, evitando reazioni di transmetallazione. Quest'ultima consiste in una reazione di scambio di un metallo legato al residuo organico e quindi l'ottenimento di altri derivati metallici differenti. Se tale reazione avvenisse in modo aspecifico nel contesto radiofarmaceutico andrebbe a diminuire la selettività di tali composti per il tumore, creando più rumore di fondo e, parallelamente, anche più radiocitotossicità a livello dei distretti corporei sani. La conoscenza della struttura chimica del ligando biologico e della chimica di coordinazione degli ioni metallici, rende possibile l'ottimizzazione della combinazione del chelante e del linker in un'unica molecola, nota come chelante bifunzionale<sup>33</sup>. Il chelante bifunzionale è attaccato al vettore tramite un *linker* o *spacer*, ed è una molecola che contiene i gruppi donatori appropriati per la formazione di un composto di coordinazione con il radionuclide. I radiometalli sono gli unici che si applicano a questo concetto e, per garantire che non vi sia alcuna interferenza che vada ad alterare l'interazione con il

bersaglio a causa della coordinazione del metallo, il linker è posizionato separatamente dalla parte bioattiva della molecola (figura 5).



**Figura 5.** Schematizzazione di un composto radiofarmaceutico canonico in cui è presente un chelante bifunzionale. Da sinistra, il vettore (rosa) mira al tumore, riconosce e si lega a un biomarcatore tumorale (ovvero un recettore); il vettore è coniugato attraverso un distanziatore (grigio) al chelante (grigio-celeste), che a sua volta, mantiene sequestrato il radioisotopo metallico (giallo).

Radionuclidi e chelanti innovativi sono sempre più richiesti nella medicina nucleare. Questo perché le caratteristiche fisiche dei radioisotopi e le caratteristiche biologiche dei composti non sono sempre compatibili tra loro. Un certo numero di radionuclidi, infatti, hanno una lunga emivita rispetto ai vettori bersaglio (ad esempio, se consideriamo frammenti di anticorpi, peptidi di piccole molecole che si legano a specifici recettori di membrana overespressi sulla superficie delle cellule tumorali bersaglio); questo aspetto, in alcune circostanze, non rende compatibile la marcatura radioattiva con alcuni radioisotopi <sup>34</sup>. Pertanto, uno dei focus della ricerca in medicina nucleare e radiochimica è rappresentato dalla scoperta, test e valutazione degli effetti della biodistribuzione di radioisotopi aventi un'emivita compatibile con il vettore biologico di interesse, andando a ottimizzare i chelanti che siano chimicamente compatibili con il radionuclide in modo da stabilizzarne l'intero composto <sup>35</sup>. Altra sfida importante nell'ottimizzazione di nuovi radiofarmaci riguarda il tempo di decadimento e l'uso limitato di alcuni radioisotopi utilizzati in alcuni test di imaging <sup>36</sup>. Ciò riguarda la modalità di somministrazione di questi radionuclidi per uso diagnostico SPECT, come ad esempio il <sup>67</sup>Ga (tempo di dimezzamento 78 ore), che viene somministrato come citrato Ga<sup>3+</sup>, e che, oltre ad avere una lenta idrolisi, viene trasportato nell'organismo attraverso transferrina ed è utilizzato in casi di infiammazione e cancro <sup>5</sup>. Nella tecnica di imaging PET talvolta si preferisce l'uso dell'isotopo <sup>68</sup>Ga che, oltre ad usare le stesse proprietà chimiche del Ga<sup>3+</sup>, forma strutture più stabili con macrocicli più piccoli, tipo *1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid* (NOTA), rispetto invece al *1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''*-

*tetraacetic acid* (DOTA). L'altro aspetto vantaggioso che lo rende molto utile per imaging PET è il tempo di decadimento breve pari a 68 minuti <sup>37</sup>. Dunque, lo sviluppo di radiofarmaci che abbiano tempi di decadimento dei radioisotopi paragonabili alle emivite biologiche ad oggi è fortemente richiesto <sup>35</sup>.

A seconda di altri parametri, come la profondità del tessuto bersaglio e la risoluzione delle immagini PET, l'energia delle particelle emesse da ciascun radionuclide può variare <sup>38</sup>, in quanto la qualità ottimale dell'immagine dipende dall'energia delle particelle emesse <sup>39</sup>.

La tabella 1 mostra le caratteristiche fisiche di alcuni radionuclidi comunemente usati in imaging PET/SPECT.

**Tabella 1. Radionuclidi maggiormente usati in PET/SPECT imaging e teranostica**

Radionuclide	Tipo di Decadimento*	Tempo di dimezzamento	Energia	Prodotti del decadimento radioattivo
<sup>225</sup> Ac	$\alpha$ (100%)	9.92 giorni	5830 keV	<sup>221</sup> Fr
<sup>64</sup> Cu	EC $\beta^+$ (61.5%) $\beta^-$ (38.5%)	12.7 ore	278.01 keV 190.74 keV	<sup>64</sup> Zn
<sup>67</sup> Cu	$\beta^-$ (100%) $\gamma$ (52%)	3 giorni	185 keV	<sup>67</sup> Zn
<sup>68</sup> Ga	EC $\beta^+$ (100%)	68.1 minuti	836 keV	<sup>68</sup> Zn
<sup>123</sup> I	EC $\beta^+$ (100%)	13.2 ore	159 keV	<sup>123</sup> Te
<sup>124</sup> I	EC $\beta^+$ (100%)	1003.2 ore	366.8 keV	<sup>124</sup> Te
<sup>125</sup> I	EC (100%)	59.4 giorni	35.5 keV	<sup>125</sup> Te
<sup>131</sup> I	$\beta^-$ (100%)	8.02 giorni	191.6 keV	<sup>131</sup> Xe
<sup>177</sup> Lu	$\beta^-$ (100%)	6.64 giorni	148.8 keV	<sup>177</sup> Hf
<sup>99m</sup> Tc	IT(89%)	6.06 ore	140.5 keV	<sup>99</sup> Tc
<sup>86</sup> Y	EC $\beta^+$ (100%)	14.74 ore	589 keV	<sup>86</sup> Sr
<sup>90</sup> Y	$\beta^-$ (100%)	64.05 ore	932.4 keV	<sup>90</sup> Zr

\*Abbondanza in percentuale; EC cattura elettronica; IT transizione isomerica.

In radioteranostica, una branca interdisciplinare fra medicina nucleare e medicina personalizzata, vengono usati radioisotopi o coppie di radionuclidi per marcare lo stesso vettore di targeting per un duplice scopo, diagnostico e terapeutico, con l'obiettivo di ottimizzare l'uso di un singolo farmaco che svolge due funzioni distinte,

visualizzazione e trattamento attraverso lo scambio di radionuclidi specifici <sup>40</sup>. Una coppia teranostica può essere costituita da due isotopi dello stesso elemento o da due elementi diversi con caratteristiche chimiche simili. In quest'ultimo caso, è noto l'uso di <sup>68</sup>Ga per PET o <sup>111</sup>In per SPECT <sup>41</sup>, seguito da terapia utilizzando radiofarmaci marcati con lutezio-177 (<sup>177</sup>Lu) <sup>42</sup>, ittrio-90 (<sup>90</sup>Y) <sup>43</sup> o attinio-225 (<sup>225</sup>Ac) <sup>44</sup>. Rame-64/rame-67 (<sup>64</sup>Cu/<sup>67</sup>Cu) <sup>45</sup> è un esempio di coppia radioterapeutica che coinvolge due isotopi dello stesso elemento, insieme a iodio-123-124/iodio-131 (<sup>123/124</sup>I/<sup>131</sup>I) <sup>46</sup>, ittrio-86/ittrio-90 (<sup>86</sup>Y/<sup>90</sup>Y) <sup>47</sup>, isotopi di terbio <sup>48</sup> e anche isotopi di scandio <sup>49</sup>. <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu e <sup>47</sup>Sc [10.3390/diagnostics13071210] sono esempi di radionuclidi teranostici promettenti. Al fine di migliorare l'efficacia terapeutica di un radionuclide ideale per la TRT, oltre a considerare l'effetto *crossfire* e la complessità del danno al DNA <sup>50</sup>, che sono in parte correlati, è necessario studiare la comunicazione intercellulare tra soggetti sani e tessuti malati, nonché l'aspetto dosimetrico, attraverso studi in vitro e curve dose-risposta. A questo proposito, dovrebbero essere considerati tumori di grandi dimensioni caratterizzati da vascolarizzazione eterogenea e aree necrotiche, poiché rispondono in modo diverso ai radionuclidi.

Le marcature utilizzate negli esperimenti di seguito riportati sono state effettuate rispettivamente con <sup>64</sup>Cu e <sup>68</sup>Ga. Per questa ragione, verranno di seguito approfonditi i suddetti radioisotopi.

### 1.3 MOLECULAR IMAGING E TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA

Le tecniche di imaging molecolare sono utilizzate per visualizzare e misurare i processi biochimici in vivo utilizzando composti marcati con radioisotopi che emettono positroni.

#### 1.3.1 PET e SPECT

PET e SPECT utilizzano molecole marcate radioattivamente per visualizzare un bersaglio cellulare specifico. La PET utilizza cristalli di scintillazione per convertire l'energia dei fotoni in luce visibile, sensori di luce adatti, composti elettronici per la lettura dei segnali e unità di elaborazione delle immagini <sup>51</sup>.

A seconda del processo da acquisire, è necessario selezionare le sostanze appropriate e i radioisotopi per l'etichettatura. L'imaging SPECT consente sequenze di scansione più lunghe, seguendo processi lenti, cosa che non sarebbe possibile con isotopi che emettono positroni di breve durata.

La PET utilizza radiofarmaci marcati con emettitori beta, che si annichilano con gli elettroni per emettere due fotoni aventi energia pari a 511 keV, ciascuno nella

direzione opposta rispetto all'altro (ovvero formando un angolo di 180° tra loro). I fotoni vengono rilevati da due rilevatori contrapposti con una finestra temporale breve. I collimatori sono realizzati con materiale altamente assorbente, come piombo o tungsteno. Sono utilizzati nei sistemi SPECT clinici e i collimatori stenopeici offrono un'eccellente risoluzione spaziale submillimetrica <sup>26</sup>.

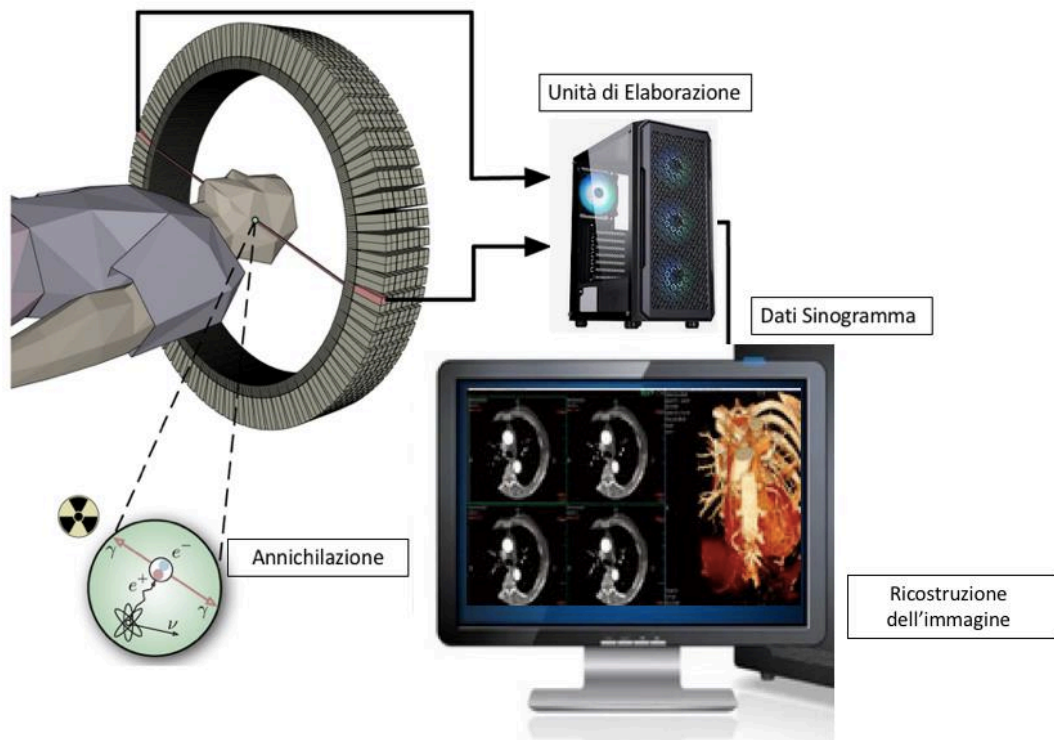
I dispositivi per l'imaging PET sono costituiti da un rivelatore di blocchi (un numero di singoli cristalli letti da un piccolo numero di tubi fotomoltiplicatori) o da una guida di luce continua e da una serie di PMT (simili a una gamma camera) <sup>52</sup>.

L'uso di cristalli di piccole dimensioni è vantaggioso nella PET, ma la necessità di un gran numero di canali elettronici aumenta il costo di tale progettazione. Rispetto all'imaging PET, la SPECT utilizza cristalli spessi per aumentare l'efficienza di rilevamento gamma, ma ciò aumenta l'incertezza nella localizzazione dell'interazione dei fotoni. È stato suggerito che gli scanner PET con due strati di cristallo radiali dello stesso materiale o di materiale diverso, migliorino la risoluzione spaziale ai bordi del campo visivo (*field of view* - FOV), rispetto agli scanner aventi un singolo strato di cristallo radiale a scintillazione <sup>53</sup>.

### 1.3.2 Protocolli Standard di Imaging PET

La tecnica di imaging PET/CT classica, usata per la valutazione metabolica del glucosio a livello oncologico su paziente, prevede l'iniezione di 10 - 20 mCi di FDG, l'acquisizione di immagini per 5 minuti e quindi l'acquisizione di 3 minuti di immagini utilizzando sorgenti da Germanio-68 (<sup>68</sup>Ge) per la correzione dell'attenuazione. Una tipica scansione PET di tutto il corpo richiede 20-45 minuti, a seconda dello scanner. La scansione in bianco (*scout*) è una procedura di controllo della qualità, effettuata di routine quotidianamente prima di sottoporre a scansione il paziente. Essa rileva qualsiasi deriva nell'uptake da parte del rivelatore e genera mappe di correzione <sup>54</sup>. Le scansioni di trasmissione si ottengono estraendo la sorgente di linea e ruotandola attorno al corpo per una certa durata di acquisizione. Inizialmente i dati PET venivano acquisiti utilizzando setti di tungsteno o piombo tra anelli rivelatori adiacenti e venivano ricostruiti utilizzando l'algoritmo di convoluzione 2D - retroproiezione. Le immagini PET 3D sono state formate impilando una successione di queste immagini 2D. L'imaging PET completamente 3D richiede nuovi algoritmi di ricostruzione dell'immagine molto più efficienti nonché caratteristiche migliori in termini di scintillatore, che aumentano la frazione di eventi diffusi Compton e causano un artefatto nell'immagine a bassa frequenza che deve essere corretto per l'imaging quantitativo. I progressi nella tecnologia informatica e negli algoritmi di ricostruzione delle immagini, nonché le caratteristiche fisiche dei nuovi scintillatori, hanno portato all'imaging completamente 3D nell'ultima generazione di scanner PET attualmente in commercio <sup>55</sup>.

Il metodo della retroproiezione filtrata (*filtered backprojection* - FBP) è stato il primo algoritmo di elaborazione di immagini PET e i più popolari tra gli algoritmi iterativi sono la massima verosimiglianza (*maximum-likelihood* - ML) e la massimizzazione delle aspettative del sottoinsieme ordinato (*ordered subset expectation maximization* - OSEM). I metodi di *rebinning* (*single-slice rebinning algorithm* - SSRB e *Fourier rebinning algorithm* - FORE) sono i metodi di rebinning più diffusi. La figura 6 mostra una schematizzazione del processo che va dalla scansione di un paziente tramite imaging PET all'elaborazione e ricostruzione dell'immagine <sup>56</sup>.



**Figura 6.** Schema illustrativo del processo di acquisizione dell'imaging di Tomografia a Emissione di Positroni (PET): successivamente all'iniezione del radiofarmaco nel paziente e attesa di un dato tempo dipendente dall'emivita del radionuclide (per esempio 110minuti è l'attesa prevista per una scansione con  $^{18}\text{F}$ -FDG), avviene la registrazione dei fotoni gamma (derivanti dall'annichilazione dei positroni) emessi in direzioni diametralmente opposte. Se i due fotoni arrivano in coincidenza al rivelatore, l'evento viene registrato. In tal caso, i dati dell'immagine vengono prodotti tramite procedure matematiche di ricostruzione dell'immagine.

### 1.3.3 MicroCT dell'Imaging

La micro-CT è stata promossa per varie applicazioni ormai da circa tre decenni, compresi i test non distruttivi e la ricerca in medicina. L'imaging in vivo di piccoli animali ha preso un forte slancio nella ricerca biomedica nell'ultimo decennio grazie alla nuova tecnologia dei rivelatori. I due tipi di scanner sono descritti separatamente di seguito. Gli scanner CT a rivelatore piatto offrono campi di misurazione molto ampi.

Nonostante per anni gli apparecchi preclinici di imaging CT siano stati ampiamente usati con i piccoli animali (topi e ratti), il loro utilizzo è destinato a diminuire poiché gli scanner di imaging micro-CT per piccoli animali dedicati sono diventati più ampiamente disponibili <sup>57</sup>.

La qualità dell'immagine e la dose vengono misurate durante i test di accettazione di un nuovo scanner e devono essere testate successivamente a intervalli regolari o ogni volta che si verificano problemi. I parametri più importanti della qualità dell'imaging da controllare sono l'accuratezza e la stabilità dei valori CT, nonché il rumore e l'omogeneità dell'imaging. Per controllare questi parametri vengono comunemente utilizzate bombole d'acqua. La risoluzione spaziale può essere valutata in due modi: mediante misurazione quantitativa oggettiva come una funzione di risposta puntuale e il calcolo della funzione di trasferimento della modulazione, oppure mediante ispezione visiva di schemi regolari. La post-elaborazione e il *rendering* sono necessari per garantire risultati oggettivi e riproducibili. Gli algoritmi avanzati di segmentazione 3D con soglie adattive locali dovrebbero essere preferiti agli approcci di segmentazione basati su soglie globali che vengono spesso applicati fetta per fetta <sup>58</sup>.

#### **1.3.4 PET/CT: Imaging Multimodale**

L'imaging multimodale viene eseguito per fornire una moltitudine di dati funzionali, metabolici e anatomici dallo stesso oggetto.

La tecnica di imaging PET, se considerata singolarmente, ha una risoluzione spaziale relativamente bassa e manca di un chiaro quadro di riferimento anatomico, il che rende difficile localizzare accuratamente strutture anatomiche o lesioni che mostrano un accumulo anomalo di radiotraccianti. L'imaging CT può superare questa limitazione. Nel 1998 è stato sviluppato un prototipo di scanner PET/CT integrato che forniva immagini anatomiche e funzionali accurate e registrate in un unico esame. Questo tipo di scanner ha aumentato sia la precisione dell'interpretazione che il livello di confidenza dei lettori. Il primo sistema PET/CT integrato a livello commerciale è apparso in ambito clinico nel 2001. Attualmente, tutti i principali fornitori offrono sistemi PET/CT integrati <sup>59</sup>.

Spesso le immagini vengono interpretate meglio quando i dati di imaging delle varie modalità vengono fusi insieme, in modo che le rispettive informazioni possano essere sovrapposte. La combinazione di PET e CT è certamente una delle combinazioni di maggior successo nell'imaging multimodale ed è stata ampiamente applicata nell'imaging clinico oncologico e in altri campi come l'artrite in caso infiammatorio o la ricerca cardiovascolare. L'imaging PET/CT viene eseguito utilizzando due dispositivi di imaging montati all'interno dello stesso *gantry* e coassialmente. I tempi di acquisizione della PET sono più lunghi rispetto ai tempi di acquisizione dell'immagine attraverso CT, e in alcuni casi una correzione dell'attenuazione PET basata sulla CT può comunque essere essenziale. La PET e la CT possono essere combinate per studiare parametri funzionali come la perfusione, e nuove tecniche

come la CT a doppia energia in combinazione con le nanoparticelle possono persino consentire di caratterizzare parametri più funzionali utilizzando la CT <sup>38</sup> .

La co-registrazione delle immagini può essere basata su punti di riferimento anatomici o artificiali nell'immagine o su valori di intensità del voxel. Esistono numerosi software di fusione di immagini, alcuni dei quali sono offerti da fornitori commerciali, mentre altri sono basati su sviluppo freeware o shareware <sup>60</sup> .

Tutti i sistemi PET/CT attualmente disponibili sono costituiti da due dispositivi, uno scanner PET e uno scanner CT, che vengono posizionati in tandem e consentono l'imaging sequenziale.

Il design di un lettino paziente per un sistema PET/CT integrato è diverso da quello di uno scanner PET/CT autonomo perché la corsa deve essere estesa e la deflessione del letto verso il basso dovuta al peso del paziente deve essere eliminata o almeno minimizzata e corretta <sup>61</sup> .

A causa dell'attenuazione dei fotoni di coincidenza dovuti all'assorbimento e alla perdita di energia lungo il percorso che i fotoni compiono all'interno del corpo, l'imaging PET subisce dei problemi di artefatti. Ciò si traduce in un profilo virtuale dell'attività ai bordi della superficie corporea e negli artefatti di imaging in posizioni più profonde all'interno del corpo. In una telecamera PET/CT integrata, la mappa di attenuazione del corpo viene costruita con l'ausilio dei raggi X provenienti dalla scansione CT e applicata alla scansione di emissione ottenuta con la componente PET della telecamera. Ciò si traduce in un'immagine che evidenzia correttamente l'attività a livello dei distretti tissutali del corpo localizzati più in profondità <sup>62</sup> .

### **1.3.5 Radiofarmaci Innovativi e Imaging PET/CT Preclinica ( $\mu$ PET/CT)**

Per essere traslazionale, una sperimentazione con radiofarmaci deve passare dal trial preclinico, prima di arrivare in clinica. Oggigiorno, nelle fasi precliniche della sperimentazione vengono utilizzati diversi tipi di modelli animali e per ogni specifica fase sperimentale viene utilizzato un modello murino ben definito, in base all'obiettivo che si deve raggiungere. Nel caso dei radiofarmaci nuovi da mettere in commercio, sono necessari studi tossicologici e di biodistribuzione sui topi per la caratterizzazione di processi a carico dei distretti corporei, quali l'internalizzazione, grado di citotossicità e dosimetria. Nonostante ciò, gli studi farmacologici e tossicologici possono essere tradotti in studi sperimentali su tumori primari umani con l'obiettivo di selezionare nuovi bersagli terapeutici, a partire da modelli murini ortotopici di specifici tumori umani <sup>63</sup> . Questo tipo di trapianto ortotopico in un modello di immunodeficienza murina è la causa dello sviluppo di metastasi principalmente in organi come fegato, polmoni e ossa. Quest'ultimo tipo di metastasi può generalmente essere indotto anche mediante iniezione endovenosa o intracardiaca di cellule <sup>64</sup> . Queste ipotesi pongono le basi per spiegare la scelta del modello murino negli studi oggetto di questa sperimentazione, poiché gli xenotrapianti con cellule tumorali

overesprimenti il recettore CCK2R sono stati utilizzati nel secondo studio di biodistribuzione radiofarmaceutica.

In questo contesto l'imaging molecolare gioca un ruolo fondamentale, in particolare con la tomografia ad emissione di positroni (PET). Inoltre, l'imaging dual-mode, come l'imaging PET/CT, consente l'integrazione delle caratteristiche anatomiche con quelle fisiologiche della malattia. I radiofarmaci utilizzati in diagnosi o terapia sono caratterizzati da diverse e specifiche tipologie di profili nucleari.

In particolare, a livello preclinico i radionuclidi più utilizzati in diagnosi PET sono quelli che emettono positroni ( $\beta^+$ ) o raggi gamma ( $\gamma$ ) come il Fluoro-18 ( $^{18}\text{F}$ ), lo Zirconio-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ) e il Gallio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).

I radionuclidi utilizzati in campo terapeutico emettono particelle alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta^-$ ) o elettroni Auger. Questi tipi di particelle agiscono inducendo potenziale citotossicità sui tessuti bersaglio (come i tessuti tumorali) attraverso uno specifico processo di ionizzazione che provoca danni all'acido desossiribonucleico (DNA) nel nucleo delle cellule tumorali, verso le quali sono opportunamente veicolati.

Come accennato, alla base della radioteranostica risiede il concetto che un radiofarmaco diagnostico è accoppiato ad un radiofarmaco terapeutico. Sebbene i radiometalli diagnostici, come  $^{111}\text{In}$  e  $^{68}\text{Ga}$ , e le loro controparti terapeutiche,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$ , siano tutti metalli trivalenti che possono essere attaccati a una porzione bersaglio con lo stesso chelante, come DOTA, le loro sottili differenze nelle loro strutture chimiche possono alterare le loro proprietà biologiche <sup>65,66</sup>. Una coppia di molecole teranostiche è definita "gemella nello spirito" perché, pur non essendo chimicamente o biologicamente identiche, mostrano profili di biodistribuzione simili a tal punto da consentire alla porzione diagnostica di predire adeguatamente la biodistribuzione dell'analogo terapeutico <sup>67</sup>.

In particolare, la controparte terapeutica è ulteriormente utile nello studio e rilevazione di processi come il flusso sanguigno locale, il metabolismo cellulare, l'espressione di recettori in vari tipi di cellule, l'attività dei neurotrasmettitori, il traffico e l'*homing* cellulare, l'invasione dei tessuti e la morte cellulare programmata <sup>68</sup>.

I risultati degli studi preclinici in vitro e in vivo sono cruciali per stabilire la selettività, la specificità e la sicurezza di ciascun farmaco e quindi sono cruciali anche per testare nuovi radiofarmaci <sup>69</sup>.

Ed ecco pertanto che i dispositivi PET/CT e SPECT/CT in modalità combinata sono ormai essenziali per l'indagine patologica del metabolismo e della morfologia degli organi, e per la risposta al trattamento.

### 1.3.6 Radionuclide Rame-64 ( $^{64}\text{Cu}$ )

Un esempio già noto di radiofarmaci teranostici a base di Rame (Cu) è rappresentato dalla coppia formata da  $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$  <sup>70</sup>. Il  $^{64}\text{Cu}$  è utilizzato nella PET (diagnosi) e nella terapia con radionuclidi grazie alle sue caratteristiche fisiche e al suo speciale profilo di decadimento ( $T_{1/2} = 12,7$  ore;  $\beta^+$ : 19%,  $\beta^-$ : 38%), che lo rendono un ottimo

candidato nell'approccio teranostico <sup>71</sup>. Il <sup>64</sup>Cu consente di acquisire immagini PET di alta qualità e contrasto e garantisce assorbimento e biodistribuzione affidabili, grazie alla sua lunga emivita. Il <sup>64</sup>Cu può essere collegato a diversi sistemi di targeting come anticorpi, peptidi, proteine e altre piccole molecole biologicamente importanti ed è molto promettente per la radioterapia mirata al tumore <sup>72</sup>. Il chelante, considerato il nostro primo studio con <sup>64</sup>Cu, è il 1,7-bis[2-(methylsulfanyl)ethyl]-4,10-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2A2S), un derivato del DOTA ampiamente discusso in <sup>73</sup>. Il vantaggio dell'utilizzo di questo nuovo chelante in vivo è rappresentato dal fatto che i derivati DOTA marcati con <sup>64</sup>Cu sono più stabili in vivo rispetto a quelli basati su Triethylenetetramine (TETA) marcati con <sup>64</sup>Cu [10.1089/cbr.2009.0674]. In particolare, è noto che DO2A2S è in grado di sfruttare gli stati di ossidazione 2+ e 1+ del rame per coordinarsi, rispettivamente, con i due bracci carbossilati e i due bracci solforati <sup>33,73</sup>. Di conseguenza, la ricerca preclinica è profondamente coinvolta nella sperimentazione animale per convalidare l'efficacia di nuovi chelanti per <sup>64</sup>Cu. Il <sup>64</sup>Cu è ben studiato sia per scopi diagnostici che terapeutici, il che lo rende eccellente per esperimenti con scopi terapeutici. Con un tempo di dimezzamento pari a 12,7 ore, il <sup>64</sup>Cu decade in <sup>64</sup>Ni con emissione di positroni ( $\beta^+$  = 17,9%,  $E_{max}$  = 660 keV,  $E_{media}$  = 288 keV) o cattura di elettroni ( $EC$  = 43,1%,  $E$  = 1675 e 1346 keV), oppure decade in <sup>64</sup>Zn, con rilascio di elettroni ( $\beta^-$  = 39,0%,  $E$  = 190,2 keV). Il rame esiste in due stati di ossidazione: Cu (I) e Cu (II). Il primo è meno dominante del secondo. Il rame è generalmente più stabile in vivo quando coniugato con chelanti macrociclici. Inoltre, il rame è solitamente legato a gruppi funzionali contenenti azoto, poiché si trova in composti con numeri di coordinazione compresi tra quattro e sei <sup>5</sup>.

### 1.3.7 Radionuclide Gallio-68 (<sup>68</sup>Ga)

Per quanto riguarda il <sup>68</sup>Ga, esistono in totale 40 radioisotopi, tre dei quali sono comunemente usati in medicina nucleare (<sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga e <sup>68</sup>Ga). Di questi, il <sup>68</sup>Ga è particolarmente adatto per l'imaging PET di un'ampia gamma di tipi di tumore, in particolare i tumori neuroendocrini <sup>74</sup>. Il <sup>68</sup>Ga(III) ha caratteristiche uniche che lo rendono un eccellente radiotracciante per la marcatura di biomolecole a basso peso molecolare <sup>75</sup>, come frammenti di anticorpi, oligonucleotidi e peptidi. Di conseguenza, questo radioisotopo può essere utilizzato per l'imaging di processi biologici in test in vivo, fornendo acquisizioni di immagini con una migliore risoluzione, scansioni a breve termine e riduzione minima della dose di radiazioni. Inoltre, la chimica di coordinazione del <sup>68</sup>Ga lo rende un candidato interessante per PET poiché, dato che Ga (III) è un bioisostere del catione ferro, esso è fortemente associato al trasportatore biologico del ferro <sup>76</sup>. In aggiunta, i complessi chelanti del gallio sono sufficientemente inerti alla transchelazione da parte della maggior parte delle biomolecole per una corretta efficacia nelle applicazioni in vivo <sup>77</sup>, eliminando il rischio di scambiare un metallo con un residuo organico in modo aspecifico. E' chiaro che per poter cambiare

la funzione *ad hoc* di un radiofarmaco è necessario cambiare il radionuclide con cui si effettua la marcatura ed eventualmente anche il tipo di chelazione necessaria. In particolare, la stabilità chimica, nel caso di sviluppo di composti marcati con  $^{68}\text{Ga}$  richiede ligandi bifunzionali, inclusi composti macrociclici con eteroatomi di azoto, come chelanti come DOTA e NOTA. I chelanti devono mostrare un'elevata stabilità termodinamica e inerzia cinetica verso il radionuclide per prevenire la dissociazione e le reazioni di competizione, ma consentire anche condizioni di etichettatura blande e rapide, soprattutto se l'agente di targeting è una biomolecola termicamente sensibile. Come radionuclide teranostico, il  $^{68}\text{Ga}$  ha anche il potenziale per essere applicato insieme ad altri radionuclidi diagnostici, come  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$ . Grazie a tutte queste caratteristiche, sono stati condotti numerosi studi preclinici sullo sviluppo di traccianti  $^{68}\text{Ga}$  per il rilevamento di tumori maligni, oltre al rilevamento per prestazioni funzionali dei tessuti, condizioni neurologiche, imaging cardiaco e artrite reumatoide <sup>5</sup>.

### 1.3.8 Cenni di Struttura Atomica e Decadimento Radioattivo

Una combinazione di un dato numero di protoni e neutroni in un nucleo porta ad un atomo chiamato nuclide (Tabella 2). Alcuni nuclidi (280 circa) sono stabili, mentre altri (più di 3400) sono instabili. I nuclidi instabili sono chiamati radionuclidi, la maggior parte dei quali sono prodotti artificialmente in un ciclotrone o in un reattore nucleare, usando alcuni nuclidi presenti in natura. In particolare, alcuni radionuclidi come Fluoro-18 ( $^{18}\text{F}$ ) sono prodotti attraverso un ciclotrone. Il ciclotrone è un acceleratore di particelle che accelera le particelle cariche ad alta velocità e le irradia verso un bersaglio adatto, producendo una reazione nucleare che crea un radioisotopo. Le particelle vengono iniettate al centro del ciclotrone e ruotano attorno all'asse fino a raggiungere lo spazio vuoto. Il campo elettrico accelera le particelle mentre lo attraversano. All'aumentare della velocità del fascio di particelle, il percorso a spirale delle particelle aumenta di raggio finché il raggio non viene estratto dalla macchina e gli elettroni vengono strappati via, trasformando ogni ione negativo in uno ione positivo. Altri radioisotopi, come il  $^{68}\text{Ga}$ , sono prodotti attraverso generatori di radionuclidi. Pertanto, il  $^{68}\text{Ga}$  (emivita  $t_{1/2} = 68$  minuti) è ottenuto da un generatore di germanio-68. Il germanio-68 (che viene preparato utilizzando energia da 30-60 MeV e un ciclotrone ad alta corrente) ha una lunga emivita (271 giorni), e quindi il generatore può essere trasportato su distanze molto lunghe e utilizzato per periodi fino ad un anno. Il  $^{68}\text{Ga}$  è stato utilizzato principalmente fino ad oggi nell'imaging del cancro quando usato per marcare peptidi per la creazione di nuovi radiotraccianti che mirano al recettore della somatostatina; questo è stato ampiamente utilizzato per studiare i tumori neuroendocrini (NET). Può anche essere utilizzato come  $^{68}\text{Ga}$ -citrato per studiare infezioni e infiammazioni <sup>78</sup>.

**Tabella 2. Caratteristiche Delle Particelle Subatomiche**

Particella	Carica	Massa (uma)	Massa (kg)	Massa (MeV)
Elettrone	-1	0.000549	$0.9108 \times 10^{-30}$	0.511
Protone	+1	1.00728	$1.6721 \times 10^{-27}$	938.78
Neutrone	0	1.00867	$1.6744 \times 10^{-27}$	939.07

uma = 1 unità di massa atomica =  $1.66 \times 10^{-27}$  kg = 1/12 di massa di  $^{12}\text{C}$

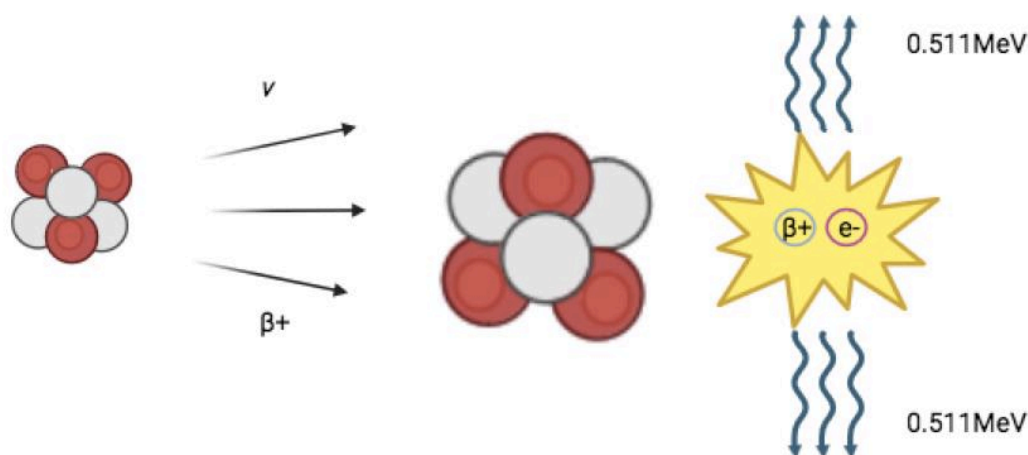
1 unità di massa atomica = 931 MeV

Ritornando alla struttura dei nuclidi, è noto che quelli aventi lo stesso numero di protoni sono chiamati isotopi; i nuclidi aventi lo stesso numero di neutroni sono chiamati isotoni; i nuclidi aventi lo stesso numero di massa sono detti isobari; e i nuclidi con lo stesso numero di massa ma differenti in energia sono chiamati isomeri. I radionuclidi sono instabili a causa della composizione inadeguata di neutroni e protoni o dell'eccesso di energia e, quindi, decadono per emissione di radiazioni come particelle, cattura di elettroni e transizione isomerica <sup>79</sup>.

Una proprietà condivisa da tutti gli emettitori di positroni è che i loro nuclei sono ricchi di protoni e, per stabilizzarsi, rimuovendo i protoni in eccesso e guadagnando invece neutroni, possono scegliere l'emissione di positroni o la cattura di elettroni (EC), entrambi processi di decadimento detto isobarico, ovvero il nucleo genitore e il nucleo figlio hanno lo stesso numero di massa. Il decadimento EC predomina nei nuclei di peso atomico più elevato (ad esempio,  $^{123}\text{I}$ ) nonostante il primo sia più prevalente nei nuclei di peso atomico inferiore, ad esempio, Carbonio-11 ( $^{11}\text{C}$ ), Azoto-13 ( $^{13}\text{N}$ ), Ossigeno-15 ( $^{15}\text{O}$ ), e  $^{18}\text{F}$ . Il positrone è un elettrone di antimateria con carica positiva ma con la stessa massa. Nella trasmutazione, il nucleo figlio ha lo stesso numero di massa, ma un numero atomico ridotto. Durante questo processo, un neutrino, una particella priva di massa e carica, fuoriesce senza interferire con la materia circostante. Poiché il positrone ha una massa piccola ed è carico positivamente, percorrerà una breve distanza, che sarà rallentata dai processi di diffusione nelle nubi di elettroni dei materiali circostanti, come per esempio il tessuto del paziente <sup>80</sup>.

Il positrone viaggia attraverso il materiale circostante, perdendo continuamente energia finché non si verifica una reazione di annichilazione, ovvero il positrone reagisce completamente con un elettrone. Questa reazione di annichilazione causa l'emissione di una coppia di fotoni da 511 keV ciascuno, oppure forma una particella di brevissima vita chiamata positronio. Il positronio è instabile e, in una frazione di secondo, anch'esso decade in una coppia di fotoni da 511 keV. In entrambi i casi la coppia di fotoni da 511 keV emessi, detti fotoni di annichilazione, hanno un'energia corrispondente alla massa a riposo combinata di un elettrone e di un positrone. I fotoni emessi vanno in direzioni opposte a circa 180° l'uno dall'altro. I fotoni di annichilazione non vengono sempre emessi a 180° l'uno dall'altro, a causa della quantità di moto residua del positrone prima che si combini con l'elettrone, ciò a sua

volta dipende dalle leggi di conservazione della quantità di moto. Pertanto esiste una piccola distribuzione di probabilità attorno alla loro direzione di emissione media di  $180^\circ$  (Figura 7) <sup>81</sup>.



**Figura 7.** Schematizzazione del processo di annichilazione dei positroni;  $\nu$  è un neutrino e  $\beta^+$  è il positrone.

Come accennato, i radionuclidi vanno incontro a differenti tipi di decadimento. Seguirà una breve descrizione di ciascuno di essi.

### *i) Decadimento alfa ( $\alpha$ )*

Questo decadimento si verifica in nuclei pesanti come Uranio-235 ( $^{235}\text{U}$ ). Le particelle alfa sono un nucleo dell'atomo di elio (He), avente due protoni e due neutroni nel nucleo con due elettroni orbitali strappati dal guscio esterno K. Le particelle  $\alpha$  sono emesse con energia discreta e hanno un raggio d'azione molto breve nella materia, ad esempio, circa 0.03 mm nei tessuti umani <sup>82</sup>.

### *ii) Decadimento beta ( $\beta^-$ )*

Questo particolare tipo di decadimento riguarda i radionuclidi ricchi di neutroni. In tale contesto, un neutrone nel nucleo viene convertito in un protone insieme all'emissione di una particella e di un antineutrino ( $\bar{\nu}$ ). Nel caso dell' I-131, la differenza di energia tra i due nuclidi (cioè tra  $^{131}\text{I}$  e  $^{131}\text{Xe}$ ) è chiamata energia di decadimento o energia di transizione, che è condivisa tra la particella e l'antineutrino ( $\bar{\nu}$ ). A causa della natura casuale del decadimento, le particelle sono emesse con uno spettro di energie di transizione comprese tra energia massima ed energia media pari ad un terzo dell'energia massima <sup>83</sup>.

### *iii) Cattura di elettroni (EC)*

Quando un radionuclide è ricco di protoni, ma ha un'energia inferiore a 1.022 MeV, decade per cattura di elettroni. In tale contesto, un elettrone viene catturato (strappato dal guscio più vicino) da un protone nel nucleo per produrre un neutrone, e un neutrino  $\nu$  viene emesso per conservare energia. Quando l'energia di transizione è inferiore a 1.022 MeV, il radionuclide decade definitivamente per cattura elettronica. Tuttavia, quando l'energia di transizione è superiore a 1.022 MeV, il radionuclide può decadere per emissione di positroni e/o cattura di elettroni. Maggiore è l'energia di transizione sopra 1.022 MeV, maggiore è la probabilità che il radionuclide decada per emissione di positroni. Alcuni esempi di radionuclidi che decadono per cattura elettronica sono I-111 e Ga-67 <sup>84</sup>.

*iv) Transizione Isomerica (IT)*

Quando un nucleo ha energia in eccesso rispetto allo stato fondamentale, può esistere in stati eccitati (energetici), chiamati stati isomerici. La durata di questi stati normalmente è molto breve (da 10<sup>-15</sup> a 10<sup>-12</sup> s); tuttavia, in alcuni casi, la durata può variare da pochi minuti ad anni. Quando uno stato isomerico ha una durata di vita più lunga, viene chiamato stato metastabile e ciò viene indicato con "m". Pertanto, avendo uno stato energetico di 140 keV sopra Tellurio (Te) e decadendo con un tempo di dimezzamento di 6 ore, Te è un isomero di Tecnezio (Tc). Naturalmente, questi stati isomerici decadono negli stati isomerici inferiori e infine negli stati fondamentali del nucleo prodotto, e le differenze di energia appaiono come fotoni dei raggi  $\gamma$ . In alternativa all'emissione di raggi  $\gamma$ , l'energia di eccitazione può essere trasferita a un elettrone, preferibilmente nel guscio più esterno K, che viene poi espulso con energia pari a  $E - E_n$ , dove  $E$  ed  $E_n$  sono rispettivamente l'energia dei raggi  $\gamma$  e l'energia di legame dell'elettrone. Questo processo è chiamato conversione interna e l'elettrone espulso è chiamato elettrone di conversione. Il posto vacante creato nel guscio esterno K viene riempito dalla transizione di un elettrone dal guscio superiore. Allo stesso modo nei gusci più esterni per esempio, i raggi X caratteristici LX e M possono essere emessi se il posto vacante nei gusci meno esterni L o M viene riempito mediante transizione elettronica dai gusci superiori. Come i raggi  $\gamma$ , l'energia caratteristica dei raggi X può essere emessa sotto forma di fotoni oppure trasferita ad un elettrone in un guscio che viene poi espulso, se energeticamente possibile. Quest'ultimo è chiamato processo Auger e l'elettrone espulso è chiamato elettrone Auger <sup>85</sup>.

## **1.4 ELABORAZIONE DELL'IMAGING**

### **1.4.1 Ricostruzione dell'Imaging**

La ricostruzione dell'immagine tomografica si basa sulla stima misurata dell'integrale della distribuzione del radiotracciante vista sotto diverse angolazioni (proiezioni). Gli algoritmi di ricostruzione possono essere suddivisi in due gruppi: analitici e statistici. I dati sono organizzati in una matrice 2D chiamata sinogramma, che viene poi utilizzata come input per gli algoritmi di ricostruzione. Gli algoritmi di ricostruzione analitica modellano la distribuzione del radiotracciante in modo semplificato, ma ignorano gli effetti fisici durante l'acquisizione, con conseguente ridotta precisione dell'immagine. La retroproiezione filtrata (FBP) è l'algoritmo analitico di ricostruzione più utilizzato. Algoritmi di ricostruzione statistica iterativa compensano le imprecisioni introdotte nell'immagine includendo nella stima iniziale dell'immagine i suddetti processi fisici <sup>86</sup>.

I raggi gamma che attraversano il materiale subiscono effetti di diffusione e fotoassorbimento, che causano attenuazione e diffusione. A seconda della risoluzione energetica del sistema di rilevamento, i raggi gamma possono ancora essere rilevati e erroneamente attribuiti a un'altra linea <sup>87</sup>.

Quando si effettua una scansione morfologica di piccoli animali, gli effetti di attenuazione e dispersione sono più pronunciati rispetto a quando si effettua una scansione attraverso nuclidi ad alta energia. Pertanto è necessario applicare metodi di correzione adeguati. L'imaging PET ha una risoluzione spazialmente variabile a causa dell'errore di parallasse. Sono allo studio diversi schemi per ridurre l'effetto di parallasse sfruttando schemi di rilevamento della profondità di interazione. Anche la risoluzione spaziale del dispositivo di imaging influenza significativamente la quantificazione a causa dell'effetto del volume parziale. La compensazione per l'effetto del volume parziale è un prerequisito per acquisire informazioni quantitative sulla distribuzione del radiotracciante. La PET rileva coincidenze casuali confrontando la rilevazione di due fotoni da parte di due rilevatori opposti all'interno di una finestra temporale specifica. Questo background può essere ridotto migliorando la risoluzione temporale del sistema, in particolare scegliendo scintillatori, fotorivelatori e dispositivi elettronici ad alta velocità <sup>88</sup>.

### **1.4.2 Fusione dell'Imaging**

Per consentire l'analisi con i software e i computer disponibili, le immagini possono essere sottocampionate calcolando la media di otto voxel vicini in un voxel più grande. Ciò riduce il numero di voxel e la dimensione totale della memoria di un fattore otto.

Per l'analisi degli organi dell'intero animale, spesso è sufficiente una risoluzione ridotta e il ritaglio può essere una soluzione per ridurre le dimensioni dell'immagine <sup>89</sup>.

Durante l'analisi potrebbe essere necessario ridimensionare, ruotare, traslare, capovolgere o, più in generale, trasformare i dati di imaging mediante una trasformazione fine. L'allineamento di due scansioni parziali da un dispositivo potrebbe richiedere solo una traduzione, che è anch'essa una trasformazione fine speciale <sup>90</sup>.

Le trasformazioni del corpo rigido sono comunemente utilizzate per la registrazione di immagini multimodali poiché utilizzano il fattore di ridimensionamento geometrico noto e determinato dalla dimensione del voxel. Per una trasformazione di corpo rigido sono necessari almeno tre marcatori corrispondenti in ciascuno dei due set di dati. L'errore di registrazione medio dipende dalla regione di interesse.

Per l'adattamento dei parametri, molte modalità di imaging non forniscono intensità di voxel con un'unità calibrata. L'adattamento parametrico può essere una soluzione adeguata per derivare voxel quantitativi e può essere eseguito dopo la segmentazione <sup>91</sup>.

Gli studi di imaging condotti su piccoli animali hanno il vantaggio di restituire all'operatore scientifico importanti informazioni relative alla struttura e funzione di organi coinvolti in patologie specifiche nell'ottica di predizione del progresso della malattia stessa nei modelli animali e, per la ricerca traslazionale, sui soggetti clinici. Una limitazione potrebbe essere data dalla ridotta dimensione degli organi, in particolare nei roditori, che corrisponde ad una scarsa risoluzione nelle immagini anatomiche, come nel caso delle immagini CT, ma soprattutto in quelle funzionali come le immagini PET. Per risolvere questo importante dettaglio, in particolar modo nella ricerca preclinica, così come in clinica, viene utilizzata la coregistrazione, metodica che permette di associare i dati delle immagini funzionali con quelli delle immagini anatomiche. In questo modo è possibile così individuare più facilmente le regioni del corpo interessate da variazioni funzionali, per esempio la quantificazione dell'uptake di radiofarmaco su un organo target. Tuttavia, proprio a livello preclinico, la fase della coregistrazione delle immagini è ancora non perfettamente ottimizzata per le varie applicazioni; da questo deriva l'importanza degli attuali studi su protocolli e workflow standardizzati per le diverse sperimentazioni.

Nel caso particolare dell'imaging PET con modelli murini, dallo stato dell'arte è evidente che la risoluzione spaziale relativa, cioè il rapporto voxel/dimensione dell'organo target, è bassa se paragonata alle immagini cliniche su paziente; ciò costituisce una incongruenza se si pensa che in generale la risoluzione delle immagini sui piccoli animali è maggiore rispetto a quella sugli umani. Pertanto se la risoluzione è così bassa da rendere difficile l'identificazione del target biologico/terapeutico, un'altra conseguenza è rappresentata dal problema degli effetti del volume parziale, che comporta una sovrastima o sottostima delle concentrazioni di radioattività sulle regioni target delle immagini PET ricostruite <sup>92</sup>.

## 1.5 ANALISI DELL'IMAGING

### 1.5.1 Analisi dell'Imaging PET

L'informazione delle immagini di PET dipende principalmente dal radiofarmaco o dal tracciante radiomarcato utilizzato, che interagisce specificamente con il bersaglio in vivo. Il contrasto dell'immagine, il rumore e la soglia di intensità dell'immagine superiore e inferiore scelta per la visualizzazione influiscono tutti sulla dimensione della regione target (regione tumorale) visualizzata. Per ridurre al minimo gli errori nella quantificazione dell'immagine rispetto alla soglia scelta, vengono utilizzati approcci diversi, come l'utilizzo di un riferimento anatomico come una scansione CT dello stesso soggetto, o l'utilizzo di un atlante anatomico per definire le regioni di interesse (*Region Of Interest* – ROI). Per una quantificazione accurata è necessario normalizzare tra loro tutte le immagini di uno studio e utilizzare una dimensione ROI basata su bordi visivi e basati sul colore. L'approccio migliore per l'analisi delle immagini PET o SPECT dipende dal disegno dello studio e dall'area target. È utile normalizzare tutte le immagini all'interno di uno studio in base alla dose iniettata e mantenere la dose iniettata il più costante possibile in un gruppo di animali. Mantenere costanti il tempo di scansione e il tempo di assorbimento del tracciante, effettuare la calibrazione incrociata degli scanner e calibrare il calibratore della dose, gli scanner per animali e il contatore gamma <sup>93</sup>.

L'imaging PET comporta l'attenuazione e la dispersione dei fotoni gamma nei tessuti o in corrispondenza dei materiali dello scanner. Trascurare l'effetto dell'attenuazione e della dispersione porterà sempre a una sottostima della quantità totale di attività misurata, nonché a un'ulteriore sfocatura dovuta alla diffusione. Per correggere gli effetti di attenuazione e la conseguente correzione della diffusione, è necessario misurare le proprietà di trasmissione dei raggi gamma a 511 keV per l'oggetto specifico. Ciò può essere ottenuto utilizzando una sorgente radioattiva esterna. I sistemi PET con una sorgente di trasmissione da 511 keV forniscono immagini con contrasto limitato, quindi i valori misurati devono essere riscaldati. Gli eventi di dispersione in genere non possono essere misurati o rilevati direttamente. In genere, uno dei metodi riguarda l'esecuzione di una simulazione Monte Carlo per stimare la dispersione. Poiché sempre più sistemi PET vengono combinati con gli scanner CT, le immagini CT possono essere utilizzate anche per ottenere dati di attenuazione PET. In alternativa alla misurazione diretta dei dati di trasmissione, i dati dell'immagine possono essere segmentati e fattori di attenuazione specifici del tessuto noti vengono assegnati per fornire informazioni di attenuazione adeguate per la PET. L'imaging PET nei topi viene spesso eseguito senza attenuazione e correzione della dispersione, poiché aumenterebbe il tempo di scansione della trasmissione e ridurrebbe il tempo di

anestesia dell'animale. Tuttavia, per gli animali più grandi come i ratti, la correzione dell'attenuazione è in genere applicata <sup>94</sup> .

L'effetto del volume parziale (*Partial Volume Effect* - PVE) è una proprietà intrinseca dei sistemi di imaging PET/SPECT e non può essere evitato. Esistono solo pochi algoritmi utilizzati sperimentalmente che consentono la correzione dell'effetto del volume parziale, ma i sistemi standard non forniscono alcun tipo di correzione. I risultati della PET in vivo possono differire significativamente dai risultati della conta attraverso gamma counter nei campioni *ex vivo* a causa dell'attenuazione e degli effetti sul volume parziale. La quantificazione in vitro e in vivo differisce di un fattore maggiore di 2 in genere. L'effetto del volume parziale è più predominante negli scanner PET per piccoli animali rispetto al PVE negli scanner clinici più grandi e dovrebbe essere sempre noto per mantenere un'accurata quantificazione attraverso PET <sup>95</sup> .

Esistono diversi modi per segnalare l'assorbimento quantitativo del tracciante in specifici organi di interesse, come la percentuale di dose iniettata per volume (%ID/mL) o l'attività per volume (kBq/mL). Il valore di assorbimento standard (SUV) è un parametro utilizzato principalmente per l'FDG. Può essere utilizzato per confrontare i valori tra pazienti con lo stesso tipo di tumore, ma, poiché i valori SUV sono spesso utilizzati nella diagnosi clinica, vengono applicati anche in campo preclinico, in modo da rendere il confronto il più traslazionale possibile <sup>96</sup> .

### 1.5.2 Segmentazione

La segmentazione è il processo di definizione delle regioni di interesse (ROI) come organi e lesioni nelle immagini per ricavare misurazioni quantitative come volumi o intensità medie delle ROI. Vengono comunemente utilizzati due tipi di ROI: geometriche e segmentazioni in termini di voxel. Le segmentazioni geometriche sono definite da forme primitive geometriche come sfere, ellissi, riquadri o cilindri, mentre le segmentazioni in termini di voxel sono tipicamente rappresentate come maschera binaria o maschera intera <sup>97</sup> .

La combinazione di soglia, taglio e crescita della regione può essere utilizzata per segmentare ossa e polmoni nelle immagini CT, ad esempio, separando le grandi parti dello scheletro collegate dai punti luminosi più piccoli nello stomaco e nell'intestino. Le regioni con forma convessa possono essere segmentate delineandone manualmente i confini. I software di segmentazione interattivi collegano i disegni manuali in 3D e determinano quindi la forma convessa. Molti studi richiedono la valutazione del sistema vascolare ed è necessario un agente di contrasto del torrente sanguigno per distinguere il sangue dai tessuti molli circostanti. Pertanto, sono stati sviluppati agenti di contrasto per il sangue capaci di mantenere una certa stabilità in circolazione. In

questo modo, i vasi sanguigni appaiono più evidenti e possono essere segmentati utilizzando la soglia (*threshold*)<sup>98</sup>.

La segmentazione interattiva può essere utilizzata per molti studi diversi, ma resta molto dipendente dall'operatore. Un software automatizzato di segmentazione dell'intero animale sarebbe molto utile per ridurre lo sforzo e i potenziali pregiudizi dipendenti dall'utente. La segmentazione automatizzata è difficile per la CT a causa del basso contrasto dei tessuti molli. Inoltre, i topi di grossa taglia forniscono un vantaggio, ma i modelli murini oncologici sono magri e ulteriormente aggravati dagli effetti collaterali delle chemioterapie, pertanto in questi ultimi casi la segmentazione degli organi è un passaggio ancora più critico, sebbene necessario per l'analisi<sup>99</sup>.

## 1.6 APPLICAZIONE DI ALGORITMI DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE NELL'ANALISI DELLE IMMAGINI

### 1.6.1 Radiomica

La radiomica<sup>100</sup> è un campo ibrido tra la matematica, la statistica e l'informatica che ha lo scopo di analizzare immagini biomediche dal punto di vista quantitativo mediante estrazioni di parametri detti *features* radiomiche. Tali parametri sono considerati dei veri e propri *biomarker* in quanto, valutando opportunamente in parallelo anche parametri fisiologici, è possibile connetterli all'interno del quadro clinico del paziente a scopo predittivo e/o prognostico e a supporto delle decisioni del medico<sup>100</sup>.

In modo particolare, la radiomica è diventata il metodo di analisi d'eccellenza nel caso di immagini tomografiche, quali tomografia a emissione di positroni (PET) e tomografia computerizzata (CT), ma anche risonanza magnetica (MR). Ciò è vero se consideriamo infatti la vastità di informazioni quantitative che non è possibile visualizzare attraverso l'occhio umano su questo tipo di immagini<sup>101-104</sup>. Una volta estratte le *features* è comunque importante dare un significato a questi parametri, ad esempio è noto che, per migliorare la previsione dell'esito e sopravvivenza di un paziente, è importante analizzare attraverso la radiomica l'eterogeneità di un tumore; esso infatti fenotipicamente ne quantifica il risultato più o meno efficace di un trattamento<sup>105</sup>.

Il software più utilizzato per l'estrazione delle *features* in ambito clinico è PyRadiomics<sup>106</sup> in quanto esso è conforme all'Image Biomarker Standardization Initiative (IBSI)<sup>107</sup>, e ciò garantisce una riproducibilità significativa delle *features* estratte. Le *features* estratte possono essere classificate in: descrittori di forma, statistiche del primo ordine e le seguenti matrici di texture: matrice di co-occorrenza a livello di grigio (*gray-level co-occurrence matrix* - GLCM), matrice di lunghezza di esecuzione a livello di grigio (*gray-level run-length matrix* - GLRLM), matrice di dipendenza a livello di grigio (*gray-level dependence matrix* - GLDM), matrice della

zona di dimensione del livello di grigio (*gray-level size-zone matrix* - GLSZM) e matrice di dipendenza della vicinanza di livello di grigio (*neighboring gray-level dependence matrix* - NGLDM).

Di seguito una breve panoramica riguardo le features appena citate.

I descrittori statistici del primo ordine (o caratteristiche “basate su istogramma”) descrivono la distribuzione di frequenza dei voxel all'interno di un organo utilizzando l'analisi dell'istogramma dei valori di intensità dei livelli di grigio. L'asimmetria della curva di distribuzione dei dati su valori inferiori (negativi) o superiori (positivi) rispetto alla media, così come anche la curtosi, che riflette la coda della distribuzione dei dati rispetto a una distribuzione gaussiana a causa di valori anomali, entropia e uniformità, rappresentano altri descrittori di questo tipo.

I descrittori della forma non dipendono dalla distribuzione dell'intensità del livello di grigio nell'immagine. Essi descrivono la geometria come il volume, il diametro massimo, area superficiale, la compattezza e la sfericità. In particolare, la superficie deriva dal calcolo mediante la triangolazione (ovvero la produzione di una serie di triangoli che ricoprono interamente la superficie) che consente di determinare il rapporto superficie/volume, mentre l'allineamento dell'organo ad un cerchio (2D) o una sfera (3D) è stabilito dalla compattezza e sfericità.

Le features di texture descrivono le posizioni relative dei voxel all'interno dell'immagine, fornendo informazioni sull'organizzazione spaziale dei livelli di grigio nella regione di interesse. In base alle seguenti classi di texture da cui sono ottenute, troviamo le seguenti features: (i) GLCM, indice della quantificazione dell'incidenza di voxel con la stessa intensità a una distanza predeterminata lungo una direzione fissa, (ii) GLRLM, serve a quantificare i voxel consecutivi con la stessa intensità lungo direzioni fisse, (iii) GLDM, quantifica il numero di segmenti di voxel aventi la stessa intensità in una data direzione, (iv) GLSZM quantifica il numero di voxel collegati che hanno uguale intensità di livello di grigio e (v) NGTDM quantifica le interrelazioni spaziali tra tre o più voxel.

Il workflow radiomico prevede diversi step, ovvero la segmentazione della regione target (un organo o un tumore ad esempio), l'estrazione di *features*, la selezione delle features più significative, e il modello di classificazione<sup>100</sup>. Dato che ciascuno step può risultare limitante e problematico, è necessario che ciascuno di questi passaggi di questo flusso di lavoro venga ottimizzato. Per evitare distorsioni nell'estrazione dei parametri, il primo blocco definisce la regione di interesse (ROI) nell'immagine. Si tratta di una questione importante negli studi di radiomica in cui la segmentazione del bersaglio viene eseguita manualmente. È quindi necessario utilizzare un sistema di segmentazione indipendente dall'operatore. Le definizioni matematiche possono essere utilizzate per calcolare molte caratteristiche in base alle ROI identificate. Gli strumenti di analisi automatizzata che eseguono analisi ad alto rendimento richiedono questo processo<sup>108-110</sup>. Tuttavia, le fasi di elaborazione delle immagini che portano all'estrazione delle features possono essere eseguite in molti modi diversi in termini di parametri di filtraggio spaziale, interpolazione e discretizzazione. È importante notare che il blocco di estrazione delle features dipende fortemente dallo strumento di analisi

delle immagini utilizzato poiché non esistono definizioni standardizzate e valori di riferimento convalidati. L'utilizzo dello stesso strumento di analisi, per uno studio specifico, può parzialmente risolvere questo problema. Un altro fattore da considerare riguarda la ridondanza, in quanto non tutte le features estratte sono significative per la prognosi, quindi è necessario uno step di riduzione e selezione delle features estratte<sup>100,111</sup>. Grazie a speciali modelli statistici è possibile scegliere le features più connesse all'outcome di riferimento, rendendo realmente più accurato e predittivo il processo radiomico che tiene conto di questo step essenziale<sup>100</sup>. Una volta effettuato questo step, è possibile costruire un modello di classificazione.

Un classificatore supervisionato utilizza delle *labels* (ovvero delle etichette) che contraddistinguono la classe di interesse, ad esempio se un tumore è benigno o è maligno, oppure se un soggetto è sano o malato. In questa fase il sistema viene "formato", cioè addestrato per imparare a riconoscere i vari casi, grazie alle etichette che vengono inserite dall'operatore. Nella seconda fase del processo di costruzione del classificatore, il sistema viene testato per prevedere l'etichetta sui nuovi casi. Per la fase di test è possibile avvalersi di un'ampia varietà di classificatori, tra cui Neural networks<sup>112</sup>, random forests<sup>100</sup>, support vector machines<sup>113</sup>, e modelli lineari generalizzati. Per queste motivazioni sopra menzionate, e per colmare tutte le lacune che ad oggi sono ancora presenti a livello preclinico dal punto di vista della predizione della biodistribuzione radiofarmaceutica, in questa tesi viene discusso un lavoro di ricerca basato sulla validazione di un nuovo flusso di lavoro radiomico che consiste in un sistema di segmentazione della regione di uptake del radiofarmaco e del tumore murino seguito da estrazione delle features radiomiche e un approccio di selezione delle features per creare un modello predittivo di valutazione della biodistribuzione del radiofarmaco nei modelli animali sottoposti a microPET/CT.

Nello specifico, la segmentazione degli organi murini e dei tumori murini è un tema caldo in quanto la maggior parte dei lavori preclinici sui radiofarmaci innovativi utilizzano i modelli murini (topi e ratti) per testare l'uptake del radiofarmaco negli organi. La segmentazione manuale per ottenere il volume di interesse richiede tempo e molta esperienza sul campo, specialmente se si parla di organi di modelli animali, dove l'esperienza dell'operatore non è sempre adeguata a questa delicata operazione, oltre ad essere soggetta a variabilità inter e intra-operatore. I problemi che emergono durante l'analisi radiomica riguardano proprio il disegno della regione di interesse in quanto questa, come già accennato, comporta una forte variabilità, che si ripercuote e si concretizza in risultati poco precisi e irripetibili<sup>114</sup>. Tra i metodi implementati per ottimizzare la segmentazione delle regioni target, gli approcci basati sull'utilizzo dell'atlante sono quelli più promettenti in preclinica<sup>33</sup>. L'obiettivo pertanto è quello di usare l'atlante per registrare ciascuna immagine di allineamento segmentata in una immagine target. In tale contesto, un punto cruciale è rappresentato dalla differenza che intercorre tra le immagini target e le forme rappresentative degli atlanti, pertanto l'accuratezza della registrazione delle immagini è necessaria al fine di ottenere una corretta segmentazione finale. Rispetto alle analisi statistiche classiche, attraverso gli algoritmi di machine learning/deep learning è possibile analizzare efficacemente una

incredibile vastità di dati a partire dall'estrazione automatica dei volumi degli organi e delle altre features estratte.

Gli strumenti per l'imaging degli animali devono avere un'elevata risoluzione spaziale e un'elevata sensibilità. I collimatori stenopeici possono raggiungere un'elevata risoluzione spaziale, ma una bassa sensibilità, quindi vengono utilizzati più rilevatori. Gli scanner PET possono acquisire immagini di piccoli animali con una risoluzione spaziale di 1.0 – 1.5 mm. La sensibilità viene aumentata da una lunga estensione assiale e dall'acquisizione di dati 3D.

Pertanto, nonostante la risoluzione delle immagini precliniche stia migliorando, la necessità di trovare dei metodi di analisi che possano consentire una detection approfondita delle caratteristiche degli organi e di ogni caso scansionato ad opportune condizioni sperimentali o cliniche, e che vada al di là della semplice osservazione visiva, risulta oggi essenziale, soprattutto in un ambito in forte sviluppo come quello della radioteranostica.

### 1.6.2 Test Statistici e Analisi

Oltre alle misurazioni quantitative che possono essere estratte dalle immagini precliniche, è necessario selezionare e applicare un test statistico per ricavare un'affermazione qualitativa in merito alla significatività dei risultati ottenuti.

Tutte le misurazioni derivate dalle immagini contengono un errore casuale e la variabilità biologica è una notevole fonte di varianza. Pertanto, il confronto delle singole misurazioni è raramente utile.

Un test statistico viene utilizzato per risolvere una domanda, stimando la probabilità che le misurazioni avvengano solo per caso, cioè senza alcuna reale differenza tra i gruppi. Un *P value* basso significa che probabilmente c'è una differenza, mentre un *P value* alto no.

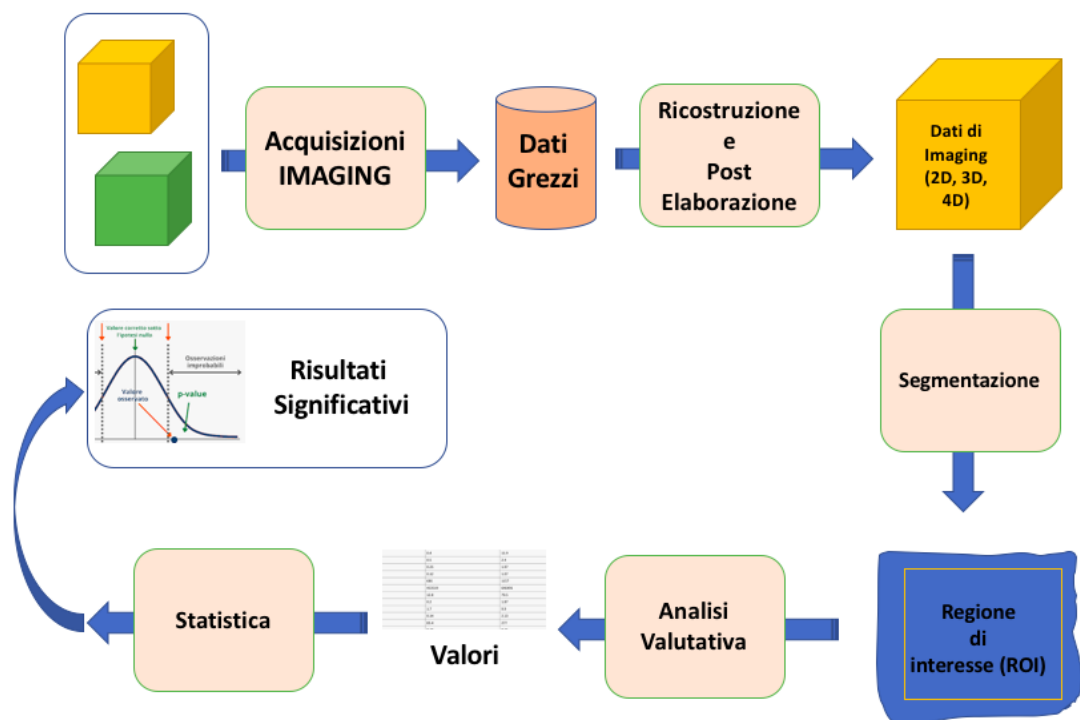
È più probabile che un effetto forte dia luogo a *P value* significativi rispetto a un effetto debole, e l'utilizzo di più animali può aumentare questa probabilità. I test statistici richiedono misurazioni indipendenti, ma è possibile calcolare la media di più misurazioni dello stesso animale per ridurre il rumore.

Il test t è il test statistico utilizzato più spesso e può essere utilizzato per verificare se le medie di due gruppi differiscono in modo significativo. Esistono varianti per campioni accoppiati e non accoppiati <sup>115</sup>.

Se si confrontano molti gruppi, dovrebbero essere utilizzati test multigruppo speciali, come l'ANOVA unidirezionale. Un *P value* basso in un test multigruppo significa che esistono differenze tra alcuni gruppi, ma non tra tutti i gruppi. Per capire quali sono i gruppi differenti tra di loro e quelli che sono simili risulta necessario applicare un *test post-hoc*. Il *test post-hoc* di Tukey è uno dei test più usati e un'alternativa più potente alla correzione di Bonferroni negli studi in cui sono presenti gruppi di animali <sup>116</sup>.

Un'analisi statistica basata su misurazioni quantitative o almeno comparabili rappresenta spesso una sfida importante per gli studi di imaging che coinvolgono piccoli animali. I dettagli interni del software di ricostruzione sono nascosti all'utente ma possono essere influenzati selezionando un kernel di ricostruzione per CT. I moderni dispositivi di imaging preclinico possono generare grandi set di dati che richiedono trasformazioni di immagini. Per risolvere questi problemi è possibile eseguire un adattamento parametrico. Per estrarre valori quantitativi dai dati dell'immagine, le regioni di interesse vengono definite corrispondenti a tipi di tessuto, organi o lesioni. Quindi, un test statistico viene applicato ai valori di misurazione estratti per generare una valutazione qualitativa e "significativa". È chiaro che, oltre a conoscere i potenziali ostacoli che possono subentrare nel processo di quantificazione dei dati estratti dalle immagini, è necessaria una vasta gamma di competenze interdisciplinari per pianificare e soprattutto per eseguire con successo studi di imaging su piccoli animali <sup>57</sup>.

La figura 8 riassume i passaggi sequenziali di un tipico workflow applicato allo studio di imaging sia preclinico sia clinico.



**Figura 8 :** Flusso di lavoro di uno studio di Imaging. Dopo l'acquisizione dei dati grezzi attraverso gli strumenti di scansione dei campioni (oggetti, animali, pazienti,...), le immagini vengono ricostruite e post-elaborate. Per analizzare i dati, le regioni di interesse (ROI) vengono segmentate (ovvero contornate) in ogni immagine ricostruita. Le ROI vengono usate per estrarre parametri quantitativi e misurare ad esempio l'uptake di un radiofarmaco in quella regione stessa. Infine test statistici vengono applicati per calcolare e controllare che ci siano differenze o relazioni

significative tra i gruppi analizzati (ad esempio, tra i casi pre e post trattamento o tra i casi a tempi di acquisizione diversi, ecc).

La maggior parte degli scanner preclinici e clinici forniscono un'immagine costituita da una griglia regolare di voxel. Le tre dimensioni dell'immagine sono chiamate dimensioni x, y e z e corrispondono a tre dimensioni spaziali ortogonali. Ogni voxel ha un valore di intensità che rappresenta una proprietà fisica della regione del tessuto corrispondente al voxel. I valori voxel vengono spesso memorizzati come numeri interi a 8 o 16 bit. Le modalità di imaging utilizzano diversi principi fisici per generare il segnale, ovvero le intensità dei voxel <sup>117</sup>.

Il rapporto segnale-rumore (*Signal-Noise Ratio* - SNR) e il rapporto contrasto-rumore (*Contrast- Noise Ratio* - CNR) sono importanti criteri di qualità delle immagini e possono essere aumentati applicando filtri (es. *smoothing*), anche se ciò potrebbe generare una scarsa nitidezza dell'immagine. A causa della dimensione del voxel e pertanto dalla scarsa precisione dei piccoli dettagli o bordi netti, la risoluzione effettiva di un dispositivo di imaging è generalmente più grossolana della risoluzione digitale e dovrebbe essere sempre superiore alla risoluzione digitale per non perdere informazioni preziose. La funzione di diffusione del punto di un dispositivo è spesso approssimata e l'effetto del volume parziale è un effetto relativo più ampio su oggetti piccoli che appariranno più grandi o potrebbero essere completamente sfumati sullo sfondo <sup>118</sup>.

## CAPITOLO 2

### 2 SCOPO DELLO STUDIO

Per una migliore e precisa detection e targeting dei radiofarmaci usati in teranostica, è importante se non addirittura necessario effettuare delle valutazioni quantitative della loro biodistribuzione, della loro localizzazione a livello d'organo e l'eventuale accumulo in particolari distretti anatomici. Questo può essere fatto in modo invasivo, prelevando campioni di sangue, tumore e tessuti in diversi momenti dopo la somministrazione endovenosa del radiofarmaco o/e in modo mini invasivo, utilizzando diverse tecniche di imaging. Esempi di modalità di imaging mini invasivo utilizzate abitualmente per monitorare la biodistribuzione e l'accumulo nel sito bersaglio di radiofarmaci sono la tomografia a emissione di positroni (PET) e la tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo (SPECT) <sup>119,120</sup> rispettivamente accoppiate a scansioni morfologiche di imaging CT/MR.

Data questa forte esigenza in ambito clinico, la medesima necessità esiste anche in ambito preclinico, in quanto, in questo secondo caso, risulta sempre più utile la possibilità di poter migliorare e perfezionare un metodo mini invasivo per la quantificazione della biodistribuzione dei radiofarmaci attraverso un workflow applicabile di volta in volta a modelli animali differenti e a radiofarmaci diversi con il fine ultimo di assistere tutto il personale scientifico che opera nel settore del molecular imaging.

In questo lavoro di attività di ricerca, per mettere a punto questo workflow è stato necessario procedere per step successivi secondo quanto descritto nella sezione 1.6.1. Pertanto, al fine di testare il workflow messo in atto, il primo studio è stato condotto su un modello murino privo di tumore e trattato con un chelante coniugato a un radioisotopo teranostico; il secondo studio, a completamento del primo, è stato condotto sul medesimo modello murino inoculato con tumore trattato con un radiofarmaco completo.

Le prossime sezioni descriveranno in dettaglio i suddetti studi.

#### **2.1 Uno Studio Preliminare sulla Valutazione della Biodistribuzione Usando un Metodo mini Invasivo Basato su un Workflow Radiomico su Imaging PET con un Composto Marcato con <sup>64</sup>Cu in Ambito Preclinico**

Lo scopo di questo studio è presentare un nuovo sistema di supporto decisionale preclinico basato su immagini micro-PET/CT per identificare diversi organi di topo e valutare, attraverso un'analisi radiomica mini invasiva, la biodistribuzione del chelante marcato con <sup>64</sup>Cu a tre tempi dopo l'iniezione del composto. Di solito, gli studi radiomici mirano a riflettere la fisiopatologia del tumore e, potenzialmente, lo sviluppo

della malattia attraverso l'implementazione di un modello predittivo basato sull'estrazione di caratteristiche rilevanti da immagini mediche e l'uso di modelli statistici, ad esempio <sup>121</sup>. In questo studio, la radiomica viene utilizzata in modo innovativo, ovvero con l'obiettivo di implementare uno strumento semi indipendente dall'operatore per studiare la biodistribuzione del tracciante marcato con <sup>64</sup>Cu nell'imaging PET nel tempo. Per raggiungere questo obiettivo, nove topi sono stati divisi nel gruppo 1 (acquisizione 1 ora dopo la somministrazione del chelante marcato con <sup>64</sup>Cu, n = 3), gruppo 2 (acquisizione 4 ore dopo la somministrazione del chelante marcato con <sup>64</sup>Cu, n = 3) e gruppo 3 (acquisizione 24 ore dopo la somministrazione del chelante marcato con <sup>64</sup>Cu, n = 3). Successivamente, le features radiomiche sono state estratte da diversi organi (polmoni, cuore, vescica, stomaco, milza, fegato, reni) per valutare i cambiamenti nel tempo della biodistribuzione del chelante marcato con <sup>64</sup>Cu.

## **2.2 Estensione del Workflow Radiomico su Sperimentazione Preclinica Usando un Radiofarmaco Marcato con <sup>68</sup>Ga in un Modello Murino di Cancro CCK2R-Positivo**

Lo scopo del presente studio consiste nella valutazione della biodistribuzione di un nuovo radiofarmaco marcato con <sup>68</sup>Ga iniettato in topi nudi Balb/c attraverso analisi istopatologiche su campioni biotipici e analisi radiomiche di immagini di tomografia a emissione di positroni/tomografia computerizzata (PET/CT) <sup>122</sup>. Il radiofarmaco marcato con <sup>68</sup>Ga è stato progettato per legarsi specificamente al recettore della colecistochinina (CCK2R). Questo recettore, naturalmente presente nei tessuti sani come lo stomaco, quando sovraespresso costituisce un biomarker per numerosi tumori. In questo esperimento, topi nudi Balb/c sono stati xenotraspiantati con una linea cellulare che sovraesprimeva CCK2R, mentre i controlli hanno ricevuto una linea cellulare wild-type (WT). Le immagini PET/CT sono state elaborate, segmentate dopo la co-registrazione basata su atlante e, di conseguenza, sono state estratte 112 features radiomiche per ciascun organo/tessuto indagato.

## CAPITOLO 3

### 3 MATERIALI E METODI

In entrambi gli studi (con il  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$ ) sono stati testati i prodotti generati all'interno del progetto "Isolpharm". Il nome del progetto si rifà alla tecnica ISOL, capace di rendere disponibili isotopi privi di vettore da molte diverse regioni della tabella dei nuclidi, aprendo la possibilità di sviluppare una nuova generazione di radiofarmaci, incluso l'Argento-111 (Ag-111), che è considerato un radionuclide molto promettente per la terapia. Le sue proprietà di decadimento lo rendono, senza alcun dubbio, un ottimo candidato per la radioterapia interna. È un emettitore  $\beta^-$  con emivita media (7,45 giorni), ha un'energia  $\beta^-$  favorevole all'uso in medicina, una penetrazione tissutale media (energia  $\beta^-$  media 360 keV e penetrazione tissutale media 1.8 mm) e una bassa percentuale di emissione  $\gamma$  associata. L'obiettivo finale del progetto consiste nella sintesi di nuovi radiofarmaci contenenti Ag-111, per il suo futuro utilizzo nella terapia mirata con radionuclidi (TRT). Essendo l'Ag-111 un elemento metallico, per progettare il farmaco è stata scelta la strategia indiretta di radiomarcatura in cui il radionuclide non è legato covalentemente al farmaco. Il vantaggio del metodo indiretto è che questi tipi di radiofarmaci offrono la possibilità di essere radiomarcati con diversi radionuclidi metallici, consentendo così un approccio terapeutico, e sono costituiti da quattro porzioni fondamentali: 1) un agente di targeting, 2) un linker, 3) un chelante bifunzionale (BFC) e 4) un radionuclide metallico (sezione 1.2.5). Tuttavia l'Ag-111 non è ancora mai stato prodotto e utilizzato a fini teranostici, ma ha tutti i requisiti per poter essere un ottimo candidato. Qui verranno discussi gli esperimenti condotti utilizzando il chelante per il  $^{64}\text{Cu}$  e successivamente il farmaco marcato con  $^{68}\text{Ga}$ , entrambi preliminari e propedeutici alla marcatura con il futuro Ag-111.

Nella progettazione dei radiofarmaci, è necessario che i chelanti siano stabili termicamente e cineticamente (come discusso nella sezione 1.2.2), pertanto, sebbene tali caratteristiche siano disponibili per elementi metallici "duri", come DOTA per  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{177}\text{Lu}$ , i chelanti per metalli "morbidi" presentano ancora alcune limitazioni, come nel caso del  $^{64}\text{Cu}$ , e maggiormente in altri, come l'Ag-111. Per questi motivi, nell'ambito del progetto Isolpharm, sono stati sintetizzati una serie di nuovi chelanti macrociclici basati sullo scaffold (cyclen) dell'1,4,7,10-tetraazaciclododecano con bracci laterali contenenti zolfo<sup>123</sup>. Ed è per questo motivo che sono stati effettuati gli studi in vivo che verranno presentati, usando due radionuclidi diversi, che andassero simultaneamente a simulare l'Ag-111 (ancora in fase di sviluppo) e successivamente il Lu-177 (anche questo in fase di ottimizzazione attraverso tecnica ISOL).

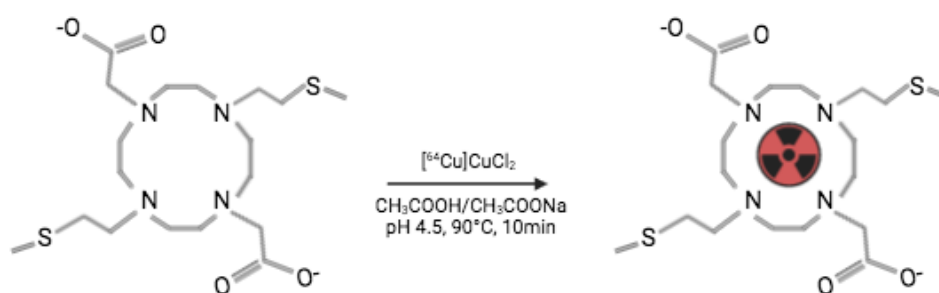
I seguenti paragrafi (a partire dai materiali e metodi fino ai risultati e discussioni) saranno divisi in due parti, una relativa alla sperimentazione con il chelante radiomarcato con  $^{64}\text{Cu}$ , e l'altra relativa alla sperimentazione con il radiofarmaco marcato con  $^{68}\text{Ga}$ .

### 3.1 Esperimenti con $^{64}\text{Cu}$ - un Nuovo Sistema di Supporto Decisionale Preclinico Basato sulla Radiomica in PET: uno Studio Preliminare sulla Valutazione di un Innovativo Chelante Marcato con $^{64}\text{Cu}$ in Modelli Murini

#### 3.1.1 Composto e Radiomarcatura

In questo primo studio preliminare un nuovo chelante per  $^{64}\text{Cu}$  è stato testato su modello murino per mettere a punto il nuovo workflow preclinico per la quantificazione della biodistribuzione mediante radiomica.

La sperimentazione dell'intera molecola in vivo è stata pianificata negli esperimenti successivi. In particolare, *1,7-bis(2-(methylsulfanyl)ethyl)-4,10,diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane* (DO2A2S), un derivato del tetraazaciclododecano (cyclen) contenente zolfo, descritto in modo dettagliato nel lavoro condotto da Tosato et al. <sup>73</sup> e sintetizzato nel contesto del progetto "ISOLPHARM", è stato utilizzato per chelare il  $^{64}\text{Cu}$  nel nostro studio preclinico preliminare di biodistribuzione di nuovi complessi chelanti-radiometalli su un modello murino. DO2A2S è stato radiomarcato con  $^{64}\text{Cu}$  presso l'Ospedale Cannizzaro (Catania, Italia) ed è stata ottenuta un'elevata resa (>98%). La reazione di complessazione richiedeva condizioni di reazione difficili, come pH acido (circa 4.5) e temperatura di  $90^\circ\text{C}$ , per essere veloce (10 minuti), come mostrato nella Figura 9.



**Figura 9.** Schematizzazione della reazione di radiomarcatura con  $^{64}\text{Cu}$

#### 3.1.2 Gruppi Sperimentali e Modello Murino

In questo studio preliminare con  $^{64}\text{Cu}$  sono stati utilizzati nove topi femmine del ceppo Balb/C nudo (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl-Charles River/Envigo) di 6 settimane del peso di  $18.0 \pm 0.7$  g (figura 10). Gli animali sono stati alloggiati in modo casuale in gabbie IVC, utilizzando una densità di 3 topi per gabbia in gabbie IVC individuali a temperatura costante ( $23\text{--}25^\circ\text{C}$ ) con accesso *ad libitum* a cibo e acqua.

Tutti gli animali sono stati sottoposti a imaging micro-PET/CT (Albira Si) per l'analisi della biodistribuzione in vivo di [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S a tre time point, ovvero 1 ora, 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione del composto radioattivo.

Nei giorni precedenti l'esperimento, è stata somministrata ai topi una dieta standard.

Il giorno delle scansioni PET/CT gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano (4% per l'induzione, 2% per il mantenimento) e il composto radiomarcato con <sup>64</sup>Cu è stato iniettato per via endovenosa nella coda con un'attività di circa  $\sim 7$  MBq in un volume massimo di 50  $\mu$ L. L'acquisizione della PET è stata eseguita a tre tempi prestabiliti (1 ora, 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione), ed i principali parametri vitali sono stati costantemente monitorati. A partire dalle scansioni PET, i topi sono stati suddivisi in tre gruppi: gruppo 1 (acquisizione micro-PET dopo 1 ora dalla somministrazione del [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S, n = 3), gruppo 2 (acquisizione micro-PET dopo 4 ore dalla somministrazione del [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S, n = 3) e gruppo 3 (acquisizione micro-PET dopo 24 ore dalla somministrazione del [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S, n = 3).

Non è stata rilevata alcuna sofferenza dopo la procedura di iniezione del radiotracciante (Figura 10). Oltre all'imaging PET è stato eseguito un esame diagnostico morfologico (CT) che, attraverso una co-registrazione con immagini PET, ha permesso di associare le informazioni metaboliche, date dall'esame PET, alla morfologia dell'organo, data appunto dalle scansioni CT.

Al termine delle acquisizioni PET/CT, i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale, una volta terminato il follow-up previsto. Gli organi sono stati conservati in paraffina per eventuali successive analisi che non sono state approfondite nel lavoro discusso in questa tesi.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti dopo l'approvazione del Ministero della Salute italiano (decreto: n. 44/2021-PR), e sono stati condotti in conformità con il principio della Dichiarazione di Basilea e con le normative europee e italiane (Direttiva dell'Unione Europea 2010/63/UE, e D.Lgs. 26/2014).

Sono stati compiuti tutti gli sforzi per sostituire, ridurre e perfezionare l'uso degli animali da laboratorio. Lo studio è stato condotto anche in conformità con le raccomandazioni del comitato locale per il benessere degli animali (OPBA, Università di Catania, Catania, Italia); il protocollo è stato approvato dall'OPBA e dal Ministero della Salute italiano.



**Figura 10.** Modello murino BALB/c Nudo e iniezione intravenosa di radiofarmaco.

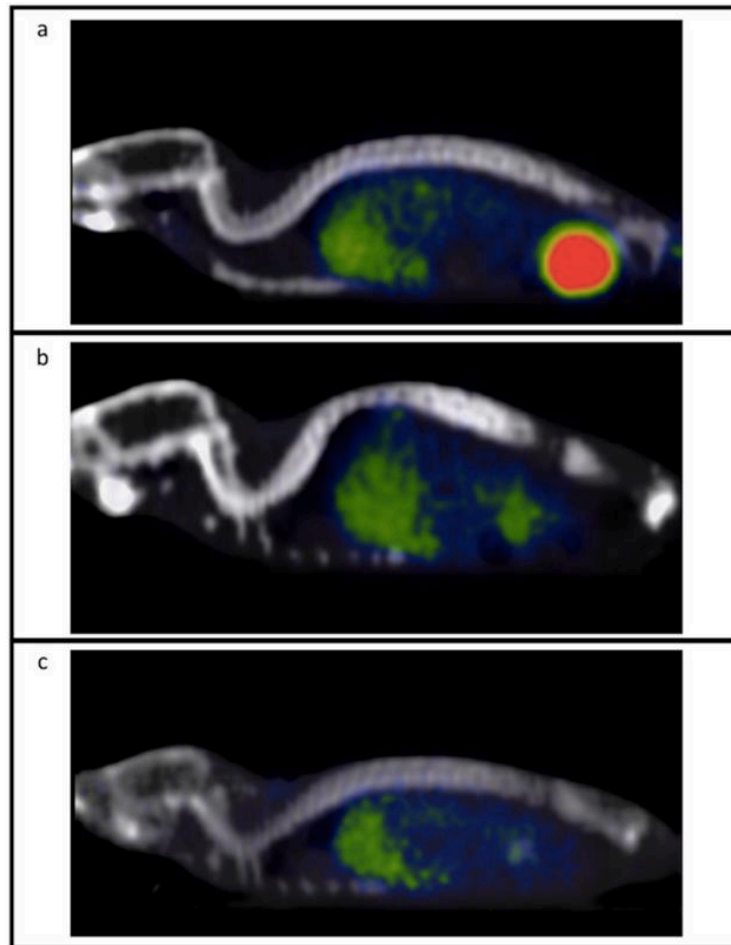
### 3.1.3 Dati Tecnici di Acquisizione di imaging $\mu$ PET/CT

L'acquisizione tomografica degli attuali scanner PET sono progettati per effettuare acquisizioni di immagini tomografiche in modalità tridimensionale (o volumetrica), in modo da consentire la rivelazione dei processi di annichilazione in modo simultaneo anche su più anelli. Per essere acquisiti dal rivelatore, i due fotoni derivati dal medesimo processo di annichilazione devono colpire il rivelatore in un intervallo di tempo massimo, definito finestra temporale. La linea di risposta (LoR) è invece una linea ideale descritta dallo spazio percorso dai due fotoni verso il rivelatore. I dati che vengono acquisiti dai rivelatori vengono trasformati in sinogrammi, cioè costituiscono delle vere e proprie matrici bidimensionali. La ricostruzione dell'immagine avviene a partire da queste matrici attraverso algoritmi classificati in FBP (se basati su Fourier attraverso linguaggio python) e MLEM (se basati su processi Iterativi attraverso Machine Learning) <sup>55</sup>.

Una volta fatta la suddetta premessa, per quanto concerne l'esperimento con  $^{64}\text{Cu}$ , i set di dati delle scansioni micro-PET/CT sono stati acquisiti utilizzando una micro-PET/CT preclinica (Albira Si, Bruker), messa a disposizione dai laboratori del Centro CAPIR (Center for Advanced Preclinical *in vivo* Research), presso l'Università di Catania, Italia, essendo tale centro coinvolto nel progetto ISOLPHARM. I set di dati CT sono stati acquisiti utilizzando 600 views in una configurazione a bassa risoluzione, una posizione iniziale orizzontale di 37 mm, un FOV di 64 mm, un'energia dei raggi X pari a 35 kV, una corrente di 200  $\mu\text{A}$  e la dimensione di ciascun voxel della CT era pari a  $500 \times 500 \times 500 \mu\text{m}^3$ . Le immagini DICOM (Digital Image Communications in Medicine) sono state ottenute utilizzando un algoritmo FBP basato

su 3D. Le immagini PET sono state ricostruite utilizzando l'algoritmo 3D-MLEM con un totale di 12 iterazioni. Il voxel PET era pari a  $500 \times 500 \times 500 \mu\text{m}^3$ .

I topi sono stati divisi nei seguenti 3 gruppi di acquisizione: acquisizione 1 ora, 4 ore e 24 ore dopo la somministrazione del  $[^{64}\text{Cu}]$  DO2A2S. Le immagini microPET/CT suddette sono mostrate in figura 11.

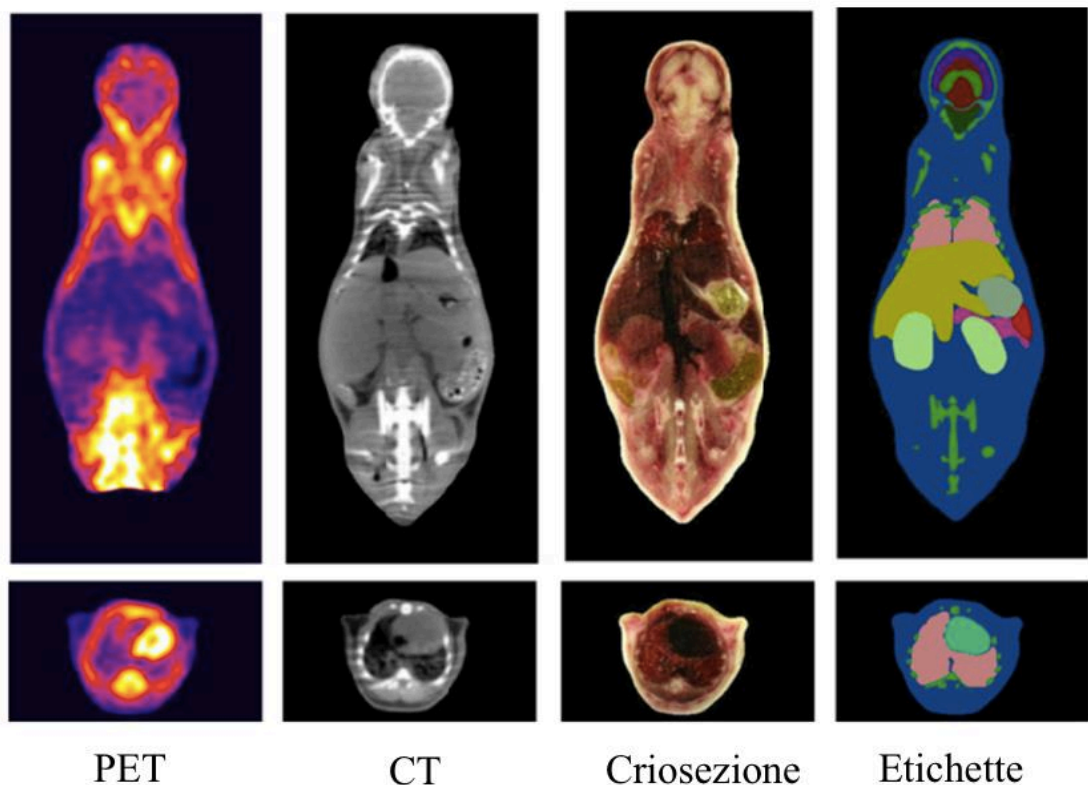


**Figura 11.** Immagini PET/CT di tre topi a cui è stato iniettato il  $[^{64}\text{Cu}]$  DO2A2S ai tre tempi di acquisizione tramite micro-PET/CT (Albira Si micro-PET/CT). (a) Topo scansionato 1 ora dopo la somministrazione del composto radioattivo; (b) topo scansionato 4 ore dopo la somministrazione del composto radioattivo; (c) topo scansionato 24 ore dopo la somministrazione del composto radioattivo.

### 3.1.4 Co-Registrazione di imaging PET/CT con Atlante Murino

Tutte le scansioni PET/CT sono state pre-elaborate spazialmente e sottoposte a segmentazione attraverso la co-registrazione con un modello spaziale standard. Per questo protocollo, un algoritmo MATLAB®<sup>124</sup> è stato personalizzato per ridurre l'intervallo di intensità dell'immagine CT (dalla scala Hounsfield a un formato in scala di grigi a 8 bit); ciò è servito anche per segmentare, ma soprattutto per eliminare tutto

ciò che non apparteneva al corpo del topo dalle immagini CT, come ad esempio il lettino su cui l'animale era stato alloggiato. Terminata questa fase di rifinitura e pulizia delle immagini, è stata condotta una registrazione multistep (3 fasi) per effettuare la sovrapposizione dell'atlante 3D del Digimouse a corpo intero <sup>125</sup> sulle scansioni CT. La scelta di questo modello è risultata la più idonea a questo studio in quanto l'anatomia del topo usato e le modalità di imaging (come per esempio le scansioni PET/CT e le immagini criosezionate di topi nudi normali) utilizzate per ottenere le immagini risultano paragonabili. In particolare, nel workflow di co-registrazione è stata usata solo la parte di atlante relativo alla CT, perché il radionuclide usato in questo lavoro (<sup>64</sup>Cu) risulta differente rispetto a quello con cui è stato costruito l'atlante di riferimento (ovvero il <sup>18</sup>F) e, pertanto, per non alterare i nostri risultati di biodistribuzione, non è stata considerata la parte funzionale. La Figura 12 mostra sezioni coronali rappresentative dell'atlante Digimouse <sup>125</sup>, insieme alle etichette di segmentazione degli organi.



**Figura 12.** Digimouse Atlas <sup>125</sup>. a) PET; b) CT c) Criosezione d) Etichette

Per la registrazione delle immagini, attraverso il software ITK-Snap <sup>126</sup> è stato eseguito un allineamento lineare semiautomatico; successivamente, è stato effettuato un warping non lineare automatizzato usando l'applicazione Elastix <sup>127</sup>, il cui utilizzo è stato ottimizzato tramite alcuni accorgimenti locali, basati sia su ispezione visiva sia attraverso 3DSlicer <sup>128</sup>.

Per una corrispondenza maggiore di ciascun topo al sistema di coordinate, l'atlante è stato pre-allineato a mano attraverso una roto-traslazione rigida. Ciò è servito per rendere più accessibile il flusso alla parte successiva del flusso di lavoro, ovvero l'algoritmo automatizzato. Per garantire una corretta sovrapposizione del contorno globale della forma del topo e migliorare maggiormente la registrazione delle principali strutture anatomiche con il contrasto più elevato, come la colonna vertebrale, il cranio e gli arti, un modello di deformazione B-spline ha permesso di utilizzare l'intensità per la fase di registrazione non lineare <sup>129</sup>. Anche in questo caso è stata condotta una ispezione visiva per posizionare dei marcatori manualmente e perfezionare localmente le differenze e i disallineamenti inattesi a livello delle parti a basso contrasto, come i polmoni. Infine, tutte queste trasformazioni lineari e non lineari stimate sono state sfruttate per distorcere le maschere binarie delle regioni di interesse (ROI) selezionate in ogni spazio specifico del soggetto.

### **3.1.5 Estrazione delle Features di Radiomica**

Dopo il processo di co-registrazione, i vari organi di interesse sono stati identificati e le maschere binarie di ciascun organo sono state esportate, tra cui fegato, vescica, cuore, stomaco, milza, polmoni e reni. Le maschere in questione sono state così impostate con i seguenti valori: sfondo o background 0, e organo di interesse 1.

Una considerazione va fatta in merito alle modifiche da fare sulle immagini PET in formato DICOM. In particolare, è necessario considerare un parametro importante chiamato Valore di Assorbimento Standardizzato (Standardized Uptake Value – SUV), che rappresenta un fattore che consente di fare una stima semiquantitativa per la valutazione della biodistribuzione del radiofarmaco nelle immagini PET <sup>130,131</sup>. Pertanto, nel caso delle immagini acquisite tramite PET, è stato necessario convertire queste in immagini SUV, in quanto questo parametro consente di normalizzare l'attività di ciascun voxel, tenendo conto anche di altri fattori che vanno inclusi durante l'analisi radiomica, quali peso del topo, attività di radiofarmaco somministrata e tempo di acquisizione.

Una volta apportate queste modifiche, dalle immagini PET e dalle maschere co-registrate sono state estratte 108 *features* radiomiche, usando il software PyRadiomics <sup>106</sup>. La scelta del software è dovuta al fatto che questo è un software conforme all'Image Biomarker Standardization Initiative (IBSI).

### **3.1.6 Analisi Statistiche e Valutazione del Risultato della Performance di Analisi**

Per la valutazione della prestazione dell'approccio radiomico descritto è stata usata l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) e il test post hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD). L'analisi ANOVA unidirezionale serve a paragonare le

medie tra i gruppi, identificando se una delle medie risulta più significativa rispetto alle altre presenti negli altri gruppi. In dettaglio, grazie all'ANOVA unidirezionale è possibile indentificare le differenze statisticamente significative tra le medie di tre o più gruppi indipendenti tra loro, mettendo a paragone la variabilità presente all'interno di ciascun gruppo di campioni con la variabilità tra i diversi gruppi. Nel nostro caso particolare, in questo studio l'ANOVA unidirezionale è stata applicata per fare un confronto tra le medie tra i gruppi ai tre tempi post-iniezione del chelante radiomarcato con  $^{64}\text{Cu}$ .

Nello specifico, si verifica l'ipotesi nulla, ovvero:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 \cdots \mu_k \quad (1)$$

dove  $\mu$  = gruppo medio e  $k$  = numero di gruppi. Se l'ANOVA unidirezionale restituisce un risultato statisticamente significativo ( $p$  value inferiore a 0.05), l'ipotesi alternativa viene accettata: esistono almeno due medie di gruppo che sono statisticamente significative l'una dall'altra.

Sono state considerate le features radiomiche con valore  $p < 0.05$  nell'ANOVA unidirezionale per trovare la percentuale di features radiomiche diverse tra almeno due gruppi (su 108 features radiomiche totali).

Tuttavia, dal momento che l'ANOVA non riesce a dare informazioni su quale gruppo sia significativamente diverso dagli altri, ma soltanto sul fatto che almeno due gruppi sono statisticamente diversi, è stato necessario utilizzare il test Tukey HSD.

Questo test di analisi statistica è una analisi a posteriori che serve per confrontare fra loro a due a due le medie dei vari gruppi. Viene calcolato un parametro per ciascuna coppia, vale a dire la statistica Q Tukey HSD, come:

$$Q - \text{statistic} = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}_j}{\sqrt{s_w^2/n}} \quad (2)$$

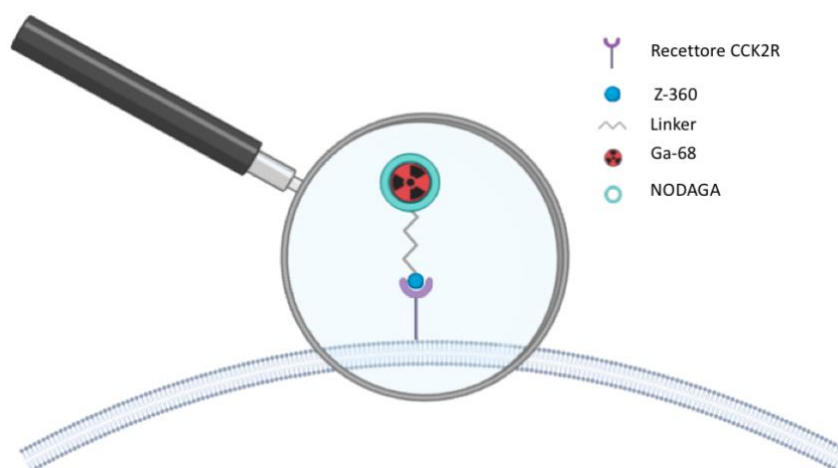
dove  $\bar{X}_i$  e  $\bar{X}_j$  sono le medie dei campioni confrontati,  $n$  è la dimensione del campione e  $s_w^2$  è la varianza intra-gruppo. Pertanto, è stato calcolato il  $p$  value del confronto tra la Q statistica osservata e la Q critica. Questo valore può essere verificato nelle tabelle della distribuzione dell'intervallo studentizzato inverso <sup>132</sup>.

Infine, per identificare quale fra le tre coppie di gruppi mostrava una differenza statisticamente significativa (espressa in percentuale), tenendo in considerazione 108 *features radiomiche* totali, sono state selezionate le features radiomiche con  $p$  value di Tukey HSD  $< 0.05$ .

## 3.2 Esperimenti con $^{68}\text{Ga}$ - Valutazione della Biodistribuzione di un Nuovo Radiofarmaco Marcato con Ga-68 in un Modello Murino di Cancro che Sovraesprime CCK2R: Metodi Convenzionali e Radiomici per l'Analisi

### 3.2.1 Radiofarmaco

La struttura radiofarmaceutica è composta da un chelante bifunzionale in grado di collegare il radionuclide  $^{68}\text{Ga}$  al linker, e dal ligando direzionale, rappresentato dallo Z360, che è un antagonista ampiamente utilizzato del CCK2R, con il ruolo di guidare tutta la molecola al CCK2R overespresso (figura 13) <sup>133</sup>.



**Figura 13.** Struttura del radiofarmaco [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-Z360. Il radiofarmaco è costituito da un radionuclide ( $^{68}\text{Ga}$ ), un chelante bifunzionale (NODAGA) e un vettore di targeting, noto come Z-360. Z-360 è un antagonista del CCK2R, che funge da bersaglio molecolare nello studio.

La marcatura del farmaco con  $^{68}\text{Ga}$  è stata effettuata presso l'Ospedale Cannizzaro di Catania. Per ottenere una resa elevata in un tempo relativamente rapido (5 minuti), il protocollo di etichettatura è stato impostato ad un pH pari a 4.5 e una temperatura pari a  $90^{\circ}\text{C}$

### 3.2.2 Modello Animale e Linee Cellulari

Gli esperimenti sono stati eseguiti su topi femmine Balb/c Nude di 8 settimane (Charles River Laboratory), del peso di  $24 \pm 3$  g.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in conformità con la direttiva del Consiglio della Comunità Europea e le normative italiane (Consiglio CEE 2010/63/UE e D.Lgs.

26/2014 italiano). Il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute italiano (numero di autorizzazione n. n. 44/2021-PR). Sono stati compiuti sforzi per sostituire, ridurre e perfezionare l'uso di animali da laboratorio. Per evitare sofferenze irrilevanti ai topi trattati, l'eutanasia è stata eseguita non appena raggiunto il punteggio finale. L'endpoint utilizzato per determinare se gli animali dovessero essere sottoposti ad eutanasia è stato raggiunto quando le lesioni tumorali presentavano una dimensione superiore a 1.2 cm e/o una perdita di peso superiore al 20%. Sono stati fatti tutti gli sforzi ragionevoli per alleviare la sofferenza, evitando le procedure più dolorose. Per ridurre al minimo la sofferenza e il disagio dei topi, è stato fornito l'arricchimento ambientale standard di due nidi, un tunnel divertente in cartone e un blocco da masticare in legno.

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie IVC a temperatura costante (23–25°C) sotto un ciclo luce/buio di 12/12 ore con accesso ad libitum a cibo e acqua. I topi sono stati alloggiati utilizzando una densità di 3 topi per gabbia in gabbie IVC individuali.

I 16 topi nudi Balb/c sono stati divisi in due gruppi.

Tumori eterotopici sono stati indotti nei due gruppi mediante iniezione sottocutanea di  $3 \times 10^6$  cellule di carcinoma epidermoide umano A431, wilde type (A431 WT) e overesprimenti CCK2R (A431 CCK2R+), rispettivamente (Figura 14). Le cellule sono state coltivate a 37°C in un ambiente umidificato con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per la crescita cellulare è stato utilizzato il terreno Eagle modificato Dulbecco (DMEM), integrato con siero bovino fetale inattivato al calore al 10% e contenente 4.5 g/l di glucosio. Le cellule A431 CCK2R+ sono state generate secondo Aloj et al.<sup>134</sup> e la selezione delle cellule CCK2R+ è stata mantenuta attraverso l'aggiunta dell'analogo della neomicina G418 (500 g/ml) al mezzo di crescita.

L'impianto è stato effettuato utilizzando 1:1 (v/v) di Matrigel e sospeso in 100 uL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).

La salute dei topi è stata monitorata due volte a settimana.

Dopo 12 giorni post-innesti (g.p.i.), il radiofarmaco è stato iniettato intravena (i.v.) nei topi e i topi sono stati sottoposti a scansioni  $\mu$ PET/CT tramite Albira Si  $\mu$ PET/CT di Bruker per eseguire la biodistribuzione in vivo di [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Z360. Ciascun gruppo è stato diviso in 2 sottogruppi, facendo riferimento a due diversi tempi PET/CT: 30 minuti o 2 ore dopo l'iniezione (p.i.). La selezione dei due punti temporali ha preso in considerazione l'emivita del radionuclide <sup>68</sup>Ga (68 minuti) per valutare i potenziali cambiamenti nella biodistribuzione radiofarmaceutica nel tempo, tenendo conto della diminuzione dell'attività radiofarmaceutica. Le procedure  $\mu$ PET/CT sono state eseguite in anestesia generale (miscela di isoflurano e ossigeno).

Dopo la procedura, i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e l'attività dei tessuti è stata valutata tramite contatore  $\gamma$ . I tumori sono stati anche pesati e conservati in para-formaldeide (PFA), per eseguire le future analisi tissutali ex vivo. Si tiene a precisare che queste ultime non saranno oggetto di discussione di questa tesi, in quanto riguarda lo studio di un altro gruppo di collaborazione.



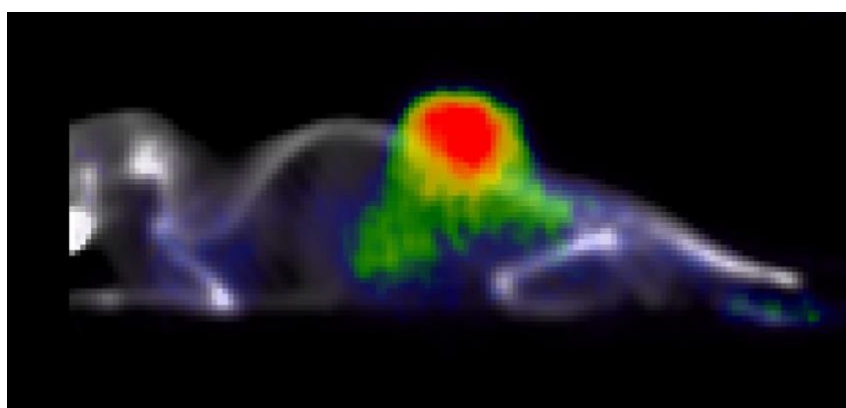
**Figura 14.** Topi BALB/c nudi dopo 12 giorni dall'inoculo di a) cellule di carcinoma epidermoide umano A431 CCK2R+, e b) cellule di carcinoma epidermoide umano A431 WT, rispettivamente.

### 3.2.3 Acquisizioni PET/CT

La micro-PET/CT ( $\mu$ PET/CT) consente l'acquisizione di immagini per studiare le condizioni fisiopatologiche di modelli animali di piccola taglia. Il set di dati è stato acquisito tramite  $\mu$ PET/CT (Albira Si Bruker), situato presso il Centro di Ricerca Preclinica Avanzata (CAPiR), Università di Catania, Italia (figure 15 e 16). Infatti, questa piattaforma preclinica consente di indagare le condizioni fisiopatologiche di modelli animali di piccole dimensioni. La piattaforma è dotata di un sistema di anestesia completamente integrato. Le immagini CT sono state acquisite a bassa risoluzione, attraverso 600 viste e 45 mm di posizione orizzontale iniziale, FOV di 64 mm 35kV di energia raggi X, 200A di corrente. Le dimensioni del voxel PET e CT erano pari a  $500 \times 500 \times 500 \text{mm}^3$ . Le immagini sono state salvate in Digital Image Communications in Medicine (DICOM) e poi ricostruite dall' algoritmo 3D-MLEM, con 12 iterazioni.



**Figura 15.** Immagini CT di topo xenotrapiantato con linea cellulare A431 CCK2R+ a cui è stato iniettato il [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-Z360 2ore dopo la somministrazione del composto radioattivo. La regione etichettata in ROSSO sul dorso del topo rappresenta il tumore al dodicesimo giorno di crescita dopo l'inoculo delle cellule.



**Figura 16.** Immagini PET/CT (Albira Si micro-PET/CT) di un topo xenotrapiantato con linea cellulare A431 CCK2R+ a cui è stato iniettato il [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-Z360 2 ore dopo la somministrazione del composto radioattivo. L'uptake del radiofarmaco è presente a livello del tumore al dodicesimo giorno di crescita dopo l'inoculo delle cellule.

### 3.2.4 Valutazione della Necrosi Tumorale

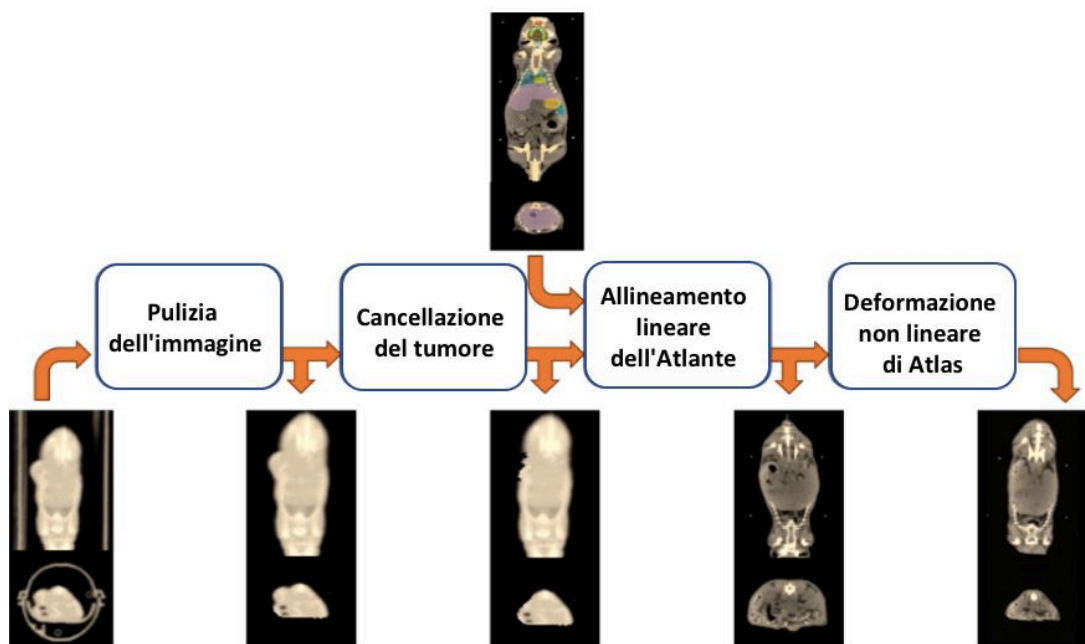
Organi e tumori sono stati raccolti dai topi sottoposti a eutanasia, fissati con paraformaldeide al 4% (PFA), processati per l'inclusione in paraffina (Surgipath Paraplast Plus, Leica) e sezionati per le analisi istopatologiche. La colorazione immunoistochimica è stata effettuata presso il dipartimento di anatomia patologica del Policlinico "P. Giaccone" dell'Università di Palermo, grazie alla Prof.ssa D. Cabibi e Dott. G. Giannone. Le sezioni in paraffina sono state colorate con ematossilina-eosina (H&E; Sigma) per valutazioni istopatologiche complessive. Le immagini dei vetrini interi (*Whole slide images* - WSI) sono state acquisite (Ventana DP 200) con un

obiettivo di ingrandimento 20x. Le immagini sono state archiviate in formato colore RGB. Le valutazioni della necrosi della patologia digitale sono state eseguite utilizzando il software QuPath v. 0.5.0. La segmentazione manuale del WSI è stata assistita dal software QuPath. Per ogni WSI, la necrosi tumorale e le regioni tumorali totali sono state segmentate e la misura dell'area è stata fornita da QuPath, mostrata in  $\mu\text{m}$  o pixel. Per ciascun campione, la percentuale (%) di necrosi tumorale è stata misurata attraverso la formula  $(A_n/A_t) \times 100$ , in cui  $A_n$  sta per l'area di necrosi, mentre  $A_t$  rappresenta l'area totale del tumore.

Solo i tumori con una percentuale di necrosi  $< 50\%$  sono stati inclusi nei seguenti studi radiomici.

### 3.2.5 Segmentazione Multiorgano Basata su Atlas

Il processo di segmentazione è stato condotto per tutte le scansioni PET/CT utilizzando tecniche di co-registrazione con uno spazio modello standard, come illustrato nella Figura 17.



**Figura 17.** Flusso di lavoro di segmentazione basato su Atlas. Ciascuna scansione CT originale (b) è stata sottoposta alla prima preelaborazione per la rimozione del supporto dell'animale (c) e la cancellazione del tumore (d); quindi la segmentazione multiorgano è stata ottenuta deformando l'atlante Digimouse CT (a) attraverso una trasformazione affine (e), seguita da una mappatura B-spline e spline a piastra sottile (f).

Inizialmente, la pre-elaborazione spaziale delle immagini CT è stata eseguita utilizzando un algoritmo proprietario MATLAB®<sup>125</sup>. Questa pre-elaborazione mirava a rimuovere le strutture non correlate al topo dalle scansioni CT, compreso il lettino dove alloggiava l'animale, regolando al contempo l'intervallo di intensità

dell'immagine CT dalla scala Hounsfield a un formato in scala di grigi a 8 bit. Successivamente, sono stati eseguiti il modellamento manuale e la rimozione delle masse tumorali sottocutanee dalle immagini CT per mitigare i potenziali effetti confondenti legati alla forma durante il processo di deformazione dell'atlante. In casi specifici in cui la crescita del tumore ha interessato organi interni, come i reni, l'esclusione di queste aree tumorali dalle scansioni ha permesso all'atlante di tenere conto meglio di queste variabilità di forma.

Dopo le fasi di pre-elaborazione, una procedura di registrazione in tre fasi ha consentito di allineare l'atlante 3D del Digimouse a corpo intero <sup>135</sup> con ciascuna scansione CT. Questo modello è stato ritenuto idoneo grazie al suo allineamento con il modello anatomico del topo e alla sua costruzione da modalità di imaging simili (PET, CT a raggi X e immagini di criosezione di topi nudi normali). Tuttavia, nel nostro approccio di co-registrazione, è stata utilizzata solo la componente CT dell'atlante, poiché la sua parte funzionale è correlata all'assorbimento della PET, che potrebbe influenzare così potenzialmente i modelli di biodistribuzione e successivamente anche i risultati dello studio.

Il processo di segmentazione stesso è stato condotto nello spazio soggetto nativo piuttosto che nello spazio modello <sup>126,136</sup>. Questo approccio prevedeva la registrazione dell'atlante su ciascuna immagine CT e, di conseguenza, la propagazione delle etichette. Questo metodo è stato preferito alla normalizzazione delle immagini nello spazio dell'atlante a causa della bassa risoluzione delle scansioni CT e per evitare la deformazione e l'interpolazione della PET, che potrebbero avere un impatto negativo sulle successive fasi di estrazione delle features. Il processo di registrazione comprendeva un allineamento lineare semiautomatico utilizzando il software ITK-Snap <sup>127</sup>, seguito da una deformazione non lineare automatizzata utilizzando il toolkit Elastix <sup>128</sup>. Inoltre, sono stati eseguiti piccoli perfezionamenti locali attraverso l'ispezione visiva e ottenuti utilizzando lo strumento di registrazione dei punti di riferimento di 3DSlicer <sup>129</sup>. Per una ulteriore elaborazione, l'atlante di ciascun topo è stato sottoposto a pre-allineamento manuale per effettuare una corrispondenza specifica al sistema di coordinate del soggetto attraverso una rigida roto-traslazione. Questo pre-allineamento mirava a facilitare la successiva convergenza automatizzata degli algoritmi. Successivamente, è stata stimata una trasformazione affine ottimale, utilizzando le informazioni reciproche come metrica di similarità con un approccio multi-risoluzione (utilizzando metà risoluzione al livello più grossolano e risoluzione completa al livello più fine a causa delle limitazioni della qualità dei dati grezzi). Successivamente, è stata condotta una registrazione non lineare basata sull'intensità utilizzando un modello di deformazione B-spline basato sulla metrica, sulla routine di ottimizzazione e sulle impostazioni dei parametri come dettagliato in <sup>137</sup>. Questa procedura completa ha notevolmente migliorato l'allineamento delle principali strutture anatomiche con contrasto elevato, come la colonna vertebrale, il cranio e gli arti. Tuttavia, i disallineamenti previsti nei tessuti di interesse a basso contrasto, come la vescica, e piccole differenze residue nel contorno polmonare hanno reso necessari perfezionamenti locali. Pertanto, è stata generata una mappatura spline a piastra sottile,

ottenuta attraverso molteplici definizioni di punti di riferimento posizionate manualmente mediante ispezione visiva.

Infine, le trasformazioni lineari e non lineari stimate durante questi processi sono state utilizzate per deformare le maschere binarie del volume di interesse selezionato (VOI) in ciascuno spazio specifico del soggetto.

### 3.2.6 Estrazione e Analisi delle Features Radiomiche

Dopo la co-registrazione dell'Atlante, come descritto in precedenza, gli organi di interesse (ovvero cuore, vescica, stomaco, milza, fegato, reni, polmoni) e i tumori sono stati identificati ed esportati come maschere binarie (sfondo etichettato come 0, organo di interesse etichettato come 1).

Prima di estrarre le features, i DICOM PET hanno sono stati modificati per includere il valore di assorbimento standardizzato (SUV), come dettagliato nei riferimenti <sup>137</sup>. Il SUV è un parametro semiquantitativo ampiamente utilizzato per stimare la biodistribuzione nelle immagini PET. Questo parametro normalizza l'attività dei voxel considerando il tempo di acquisizione, l'attività somministrata e il peso del topo. Essenzialmente, le immagini PET sono state convertite in immagini SUV, consentendo l'incorporazione di fattori che altrimenti sarebbero stati trascurati durante l'analisi radiomica. Utilizzando PET e maschere co-registrate, sono state estratte un totale di 112 features radiomiche utilizzando un software di analisi conforme all'iniziativa di standardizzazione dei biomarcatori di immagini (IBSI) <sup>107</sup>, ovvero PyRadiomics <sup>106</sup>, per aumentare la riproducibilità delle features estratte. Questo è un aspetto cruciale degli studi di radiomica <sup>137</sup>. PyRadiomics è un programma open source basato su Python progettato per il calcolo scientifico, compatibile con varie piattaforme.

Attraverso il software sono state estratti vari tipi di features, inclusi descrittori di forma, statistiche del primo ordine e matrici di texture come la matrice di co-occorrenza a livello di grigio (*gray-level co-occurrence matrix* - GLCM), la matrice di lunghezza di esecuzione a livello di grigio (*gray-level run-length matrix* - GLRLM), la matrice di dipendenza a livello di grigio (*gray-level dependence matrix* - GLDM), dimensione del livello di grigio-matrice di zona (*gray-level dependence matrix* - GLSZM) e matrice di dipendenza del livello di grigio vicina (*neighboring gray-level dependence matrix* - NGLDM). I descrittori di forma riguardano le caratteristiche geometriche degli oggetti nell'immagine e non sono influenzati dalla distribuzione dell'intensità dei livelli di grigio. Questi descrittori comprendono attributi come volume, diametro massimo, area superficiale, compattezza e sfericità. I descrittori statistici del primo ordine, noti anche come features basate sull'istogramma, analizzano la distribuzione di frequenza delle intensità dei voxel all'interno di un organo esaminando l'istogramma di valori di intensità del livello di grigio.

Le features della trama/*texture*, d'altro canto, forniscono informazioni sulla disposizione spaziale dei livelli di grigio all'interno dell'immagine. Esse valutano le

posizioni relative dei voxel, offrendo informazioni sull'organizzazione spaziale dei livelli di grigio all'interno dell'organo di interesse. Le prestazioni dell'approccio proposto sono state valutate utilizzando il t-test non appaiato (*unpaired t-test*). Questo test statistico viene utilizzato per determinare se esiste una differenza significativa tra le medie di due gruppi indipendenti.

In altre parole, il t-test non appaiato confronta per ciascun gruppo (nel nostro caso, le quattro diverse condizioni a 2 ore, a 30 minuti, indipendentemente dai punti temporali e indipendentemente dai gruppi WT e CCK2R), in ciascun singolo organo/tumore, le medie di ciascuna delle 112 features, determinare se una di queste medie rappresenta una variazione statisticamente significativa rispetto alle altre. Infine, le features radiomiche con un valore p inferiore a 0,05 sono state ritenute significative. Queste features sono state esaminate per determinare la percentuale di variazione tra le 112 features complessive per ciascun singolo organo. Questo processo mirava a identificare quali features mostrassero cambiamenti statisticamente significativi nelle quattro coppie di gruppi presi in considerazione.

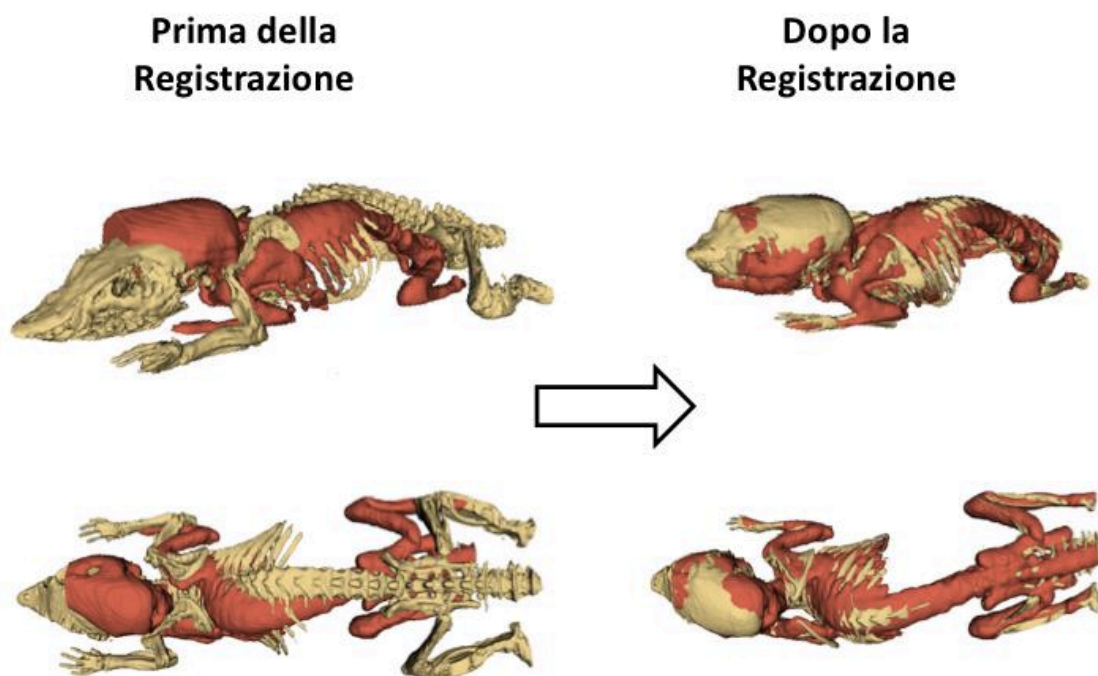
## CAPITOLO 4

### 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

#### 4.1 Esperimenti Con $^{64}\text{Cu}$

Nove topi femmine del ceppo nudo Balb/C di 6 settimane sono stati sottoposti a imaging micro-PET in tre diversi punti temporali dopo l'iniezione di chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$  per valutare la sua biodistribuzione nel modello murino in diversi tempi di acquisizione, ovvero 1 ora, 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione con il radiofarmaco.

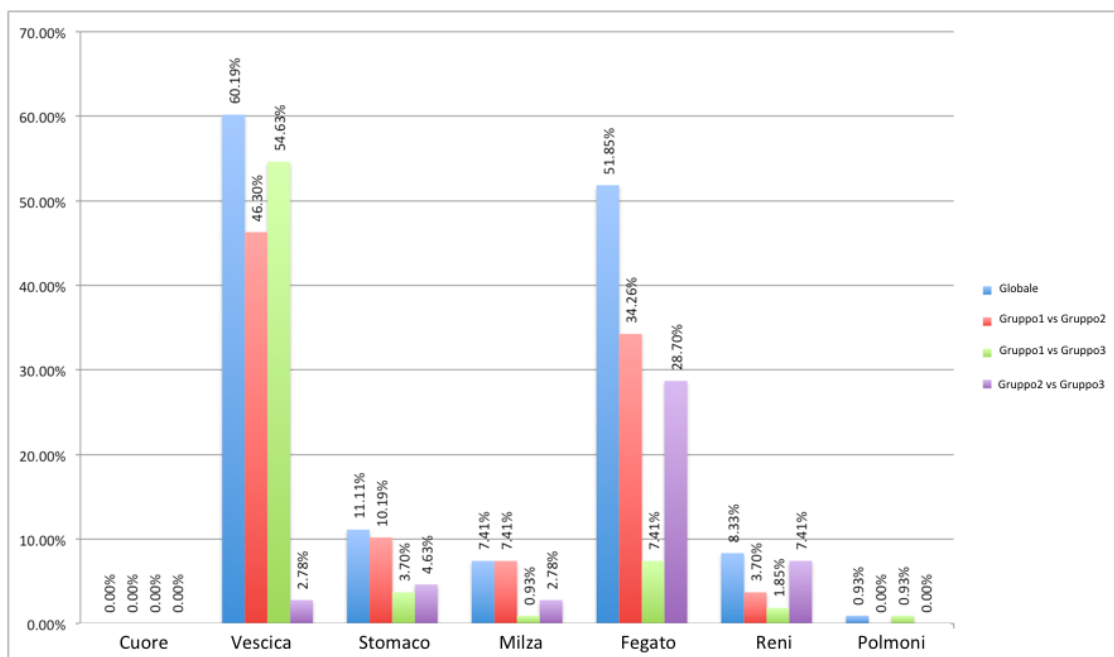
La Figura 18 mostra lo scheletro segmentato 3D dell'atlante Digimouse sovrapposto a un topo rappresentativo, sia prima che dopo la procedura di registrazione; quantitativamente, questo flusso di lavoro ha raggiunto accuratezze di registrazione che vanno dall'87.5% al 91%, con una prestazione media dell'89%  $\pm$  1%, in termini di correlazione dell'intensità tra l'atlante deformato e le immagini CT originali.



**Figura 18.** Prestazioni di registrazione qualitativa, valutate attraverso la sovrapposizione di strutture ossee standard (gialle) e reali (rosse).

Dopo la co-registrazione dell'atlante, le features radiomiche delle immagini PET sono state estratte da sette diversi target: cuore, vescica, stomaco, fegato, milza, rene e polmone.

Le analisi ANOVA e HSD hanno mostrato un comportamento diverso a seconda dell'organo indagato nei tre diversi momenti successivi all'iniezione del chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$ , come mostrato in Figura 19 e Tabella 3.



**Figura 19.** Analisi dei test ANOVA e HSD che mostrano differenze nelle features radiomiche estratte nei tre gruppi di topi (colonna blu) e differenze considerando coppie di gruppi: primo gruppo rispetto al secondo gruppo (colonna rossa), primo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna verde) e il secondo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna viola).

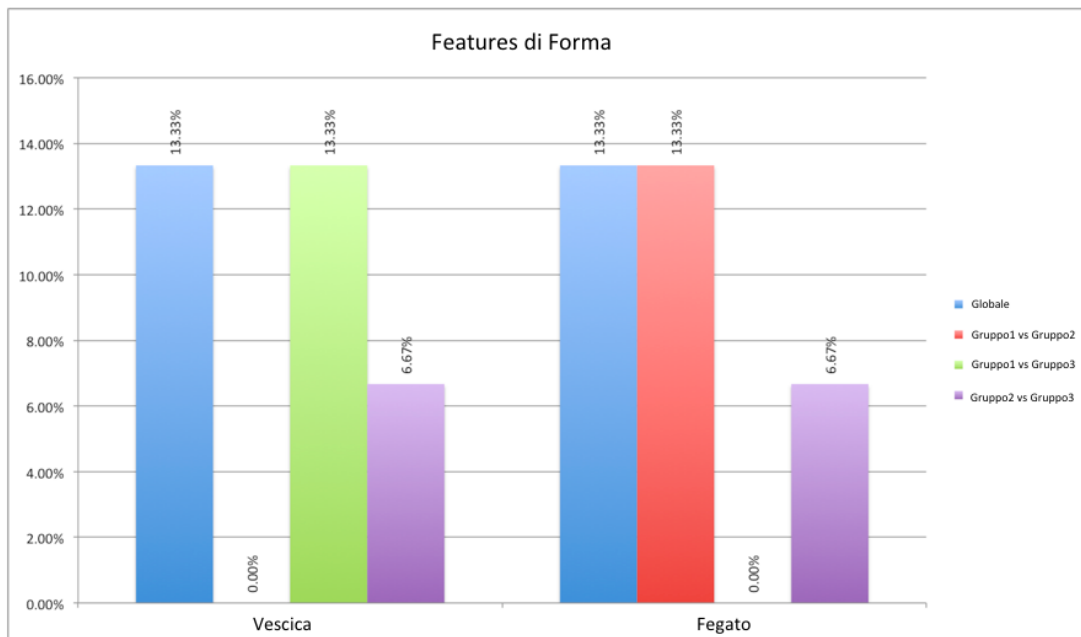
**Tabella 3.** Analisi dei test ANOVA e HSD basate sui sette distretti investigati.

Regione Target	Globale	Gruppo 1 vs. Gruppo 2	Gruppo 1 vs. Gruppo 3	Gruppo 2 vs. Gruppo 3
Cuore	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Vescica	60.19%	46.30%	54.63%	2.78%
Stomaco	11.11%	10.19%	3.70%	4.63%
Milza	7.41%	7.41%	0.93%	2.78%
Fegato	51.85%	34.26%	7.41%	28.70%
Rene	8.33%	3.70%	1.85%	7.41%
Polmone	0.93%	0.00%	0.93%	0.00%

In ciascuna riga è riportata la percentuale di features radiomiche che hanno mostrato variazioni significative ( $p\text{-value} < 0.05$ ) tra i tre gruppi di topi.

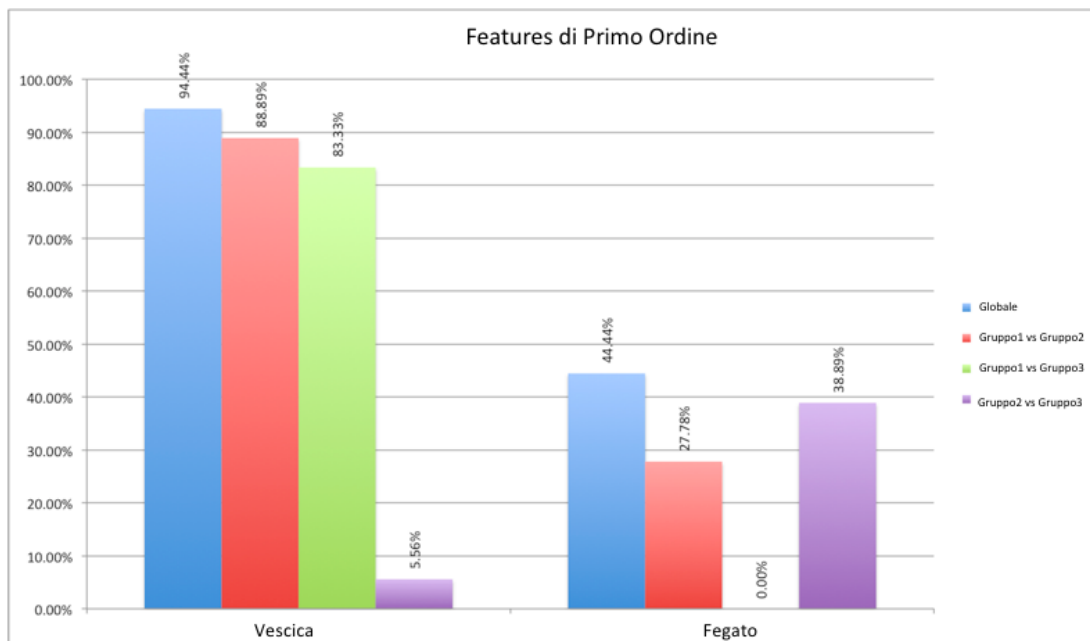
Nello specifico, nei distretti cardiaco e polmonare, meno dello 0.93% delle 108 features estratte hanno mostrato variazioni significative (valore p inferiore a 0.05) tra i tre gruppi di topi. Questo era un risultato prevedibile poiché l'assorbimento in questi organi è molto basso (SUVmax e SUVmean erano  $0.36 \pm 0.98$  e  $0.12 \pm 0.02$  nel cuore,  $0.43 \pm 0.09$  e  $0.13 \pm 0.02$  nel polmone). Una situazione intermedia si è verificata nei distretti di stomaco, milza e rene, dove un massimo dell'11.11% delle features era statisticamente diverso. Inoltre, in questo caso, l'assorbimento della PET era piuttosto basso in tutti e tre i gruppi (SUVmax e SUVmean erano  $0.53 \pm 0.15$  e  $0.26 \pm 0.11$  nello stomaco,  $0.36 \pm 0.11$  e  $0.16 \pm 0.05$  nella milza e  $0.51 \pm 0.16$  e  $0.20 \pm 0.06$  nel rene). Nei distretti dello stomaco e dei reni le differenze maggiori si sono verificate tra il gruppo 1 e il gruppo 2, mentre nel distretto dei reni le differenze maggiori si sono verificate tra il gruppo 2 e il gruppo 3. Infine, oltre il 60% e il 51% delle features erano differenti rispettivamente nei distretti della vescica e del fegato. In questi distretti, l'assorbimento è stato molto più elevato rispetto agli altri distretti (SUVmax e SUVmean erano  $4.54 \pm 6.64$  e  $2.25 \pm 3.34$  nella vescica e  $0.86 \pm 0.24$  e  $0.35 \pm 0.08$  nel fegato) e si sono verificate ampie variazioni tra il gruppo 1 e il gruppo 2, e il gruppo 1 e il gruppo 3 per la vescica, e tra il gruppo 1 e il gruppo 2, e il gruppo 2 e il gruppo 3 per il fegato.

Concentrando l'attenzione sui due distretti (ovvero vescica e fegato) dei tre gruppi di topi con la maggiore variazione significativa delle features radiomiche, è stata eseguita un'analisi particolare considerando le features divise in tre classi (vedi Sezione 3.1.5): forma/*shape* (15 features), primo ordine/*first order* (18 features) e trama/*texture* (75 features). Come previsto, la classe meno sensibile al tempo di acquisizione era la forma/*shape*. Questa classe di features riguarda gli aspetti geometrici del target di interesse come volume, diametro massimo, area superficiale, compattezza e sfericità. Ovviamente non riguarda la forma dal punto di vista morfologico (come nelle immagini CT) ma dal punto di vista della biodistribuzione del chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$ . Pertanto, era prevedibile una differenza minima (vedere Figura 20): due features (vale a dire, *shape\_Flatness* e *shape\_LeastAxisLength*) su 15 features hanno mostrato una variazione significativa nei tre gruppi.



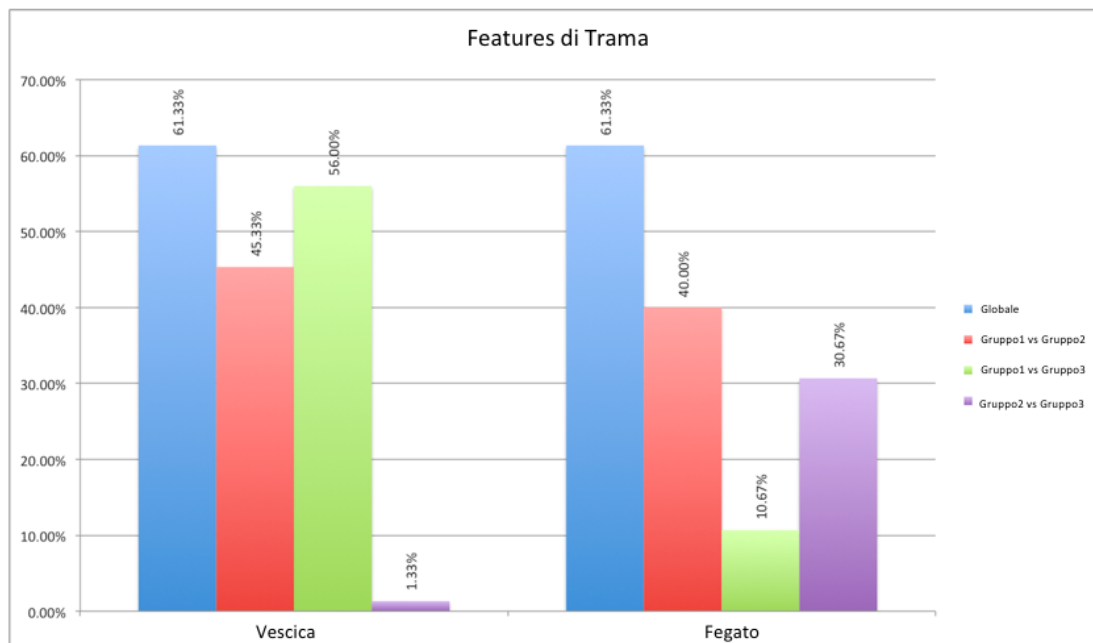
**Figura 20.** Le analisi dei test ANOVA e HSD mostrano differenze nel gruppo di features della forma (15 features) nei tre gruppi di topi (colonna blu) e differenze considerando coppie di gruppi: primo gruppo rispetto al secondo gruppo (colonna rossa), primo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna verde) e il secondo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna viola).

Allo stesso modo è stata analizzata la classe del primo ordine/*first-order* (vedi Figura 21). Questa classe riguarda funzionalità “basate su istogrammi” che descrivono la distribuzione di frequenza dei voxel all'interno del target attraverso l'analisi dell'istogramma dei valori di intensità del livello di grigio. Contrariamente alla prima classe esaminata, la maggior parte delle features appartenenti a questo gruppo variavano significativamente nel distretto vescicale considerato il gruppo 1 rispetto agli altri gruppi. Ciò era dovuto al fatto che dopo un'ora (topi del primo gruppo) il chelante non era stato eliminato dall'organismo. Una concentrazione di  $^{64}\text{Cu}$  molto più bassa si è verificata a 4 e 24 ore. Per quanto riguarda il distretto epatico, più del 44% delle features estratte variavano nel tempo. Abbastanza inaspettatamente, non c'era alcuna variazione tra il primo gruppo e il terzo gruppo. Serviranno indagini più approfondite per analizzare questo aspetto.



**Figura 21.** Le analisi dei test ANOVA e HSD mostrano differenze nel gruppo di features di primo ordine/first-order (18 features) nei tre gruppi di topi (colonna blu) e differenze considerando coppie di gruppi: primo gruppo rispetto al secondo gruppo (colonna rossa), primo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna verde) e il secondo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna viola).

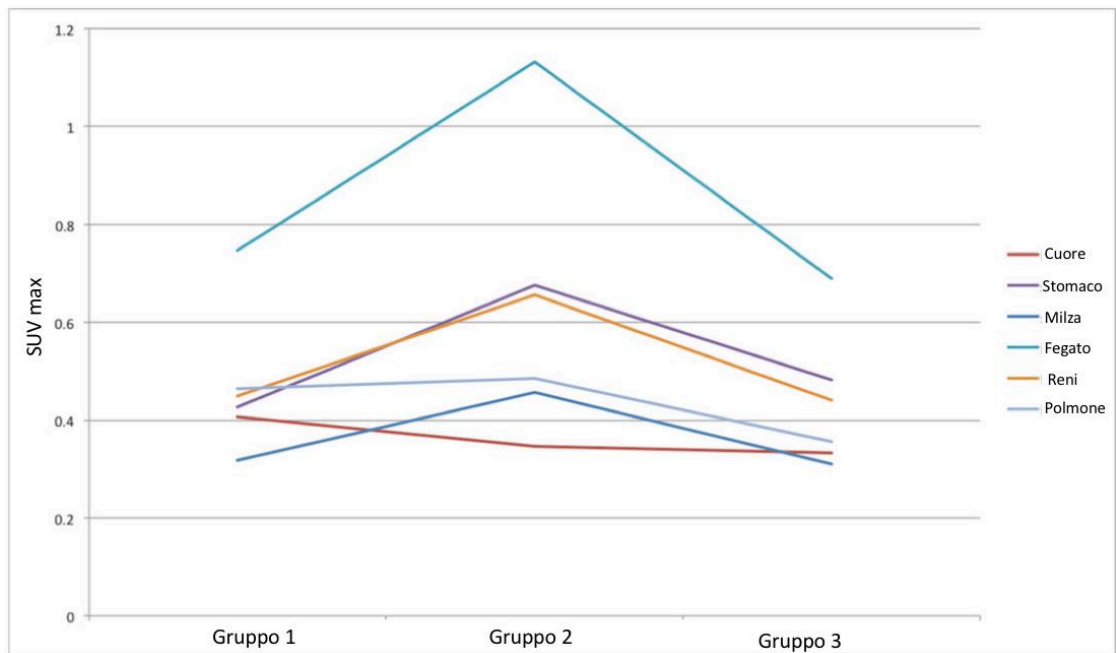
Per quanto riguarda la classe di trama/*texture*, come la classe precedente, anche questa dipende fortemente dai livelli di grigio e quindi dalla biodistribuzione del chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$ . In particolare fornisce informazioni sull'organizzazione spaziale dei livelli di grigio nell'organo di interesse. Per entrambi i distretti, più del 61% delle features estratte varia nel tempo (vedi Figura 22), ottenendo risultati simili all'analisi precedente (differenza minima tra il gruppo 2 e 3 nel distretto vescicale, e tra il gruppo 1 e 3 nel distretto epatico).



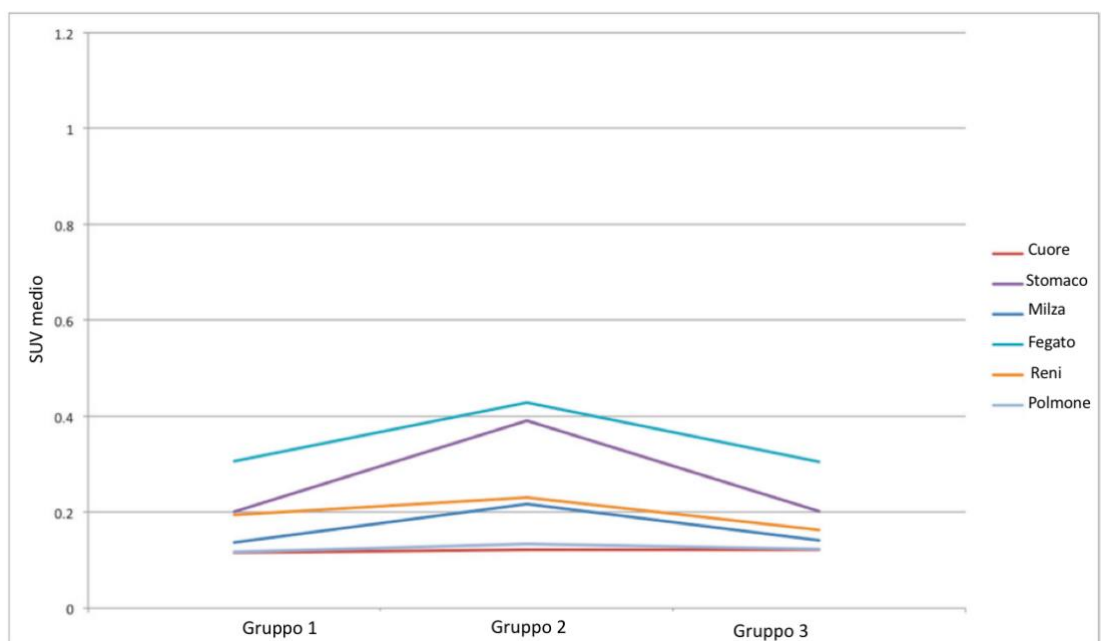
**Figura 22.** Le analisi dei test ANOVA e HSD mostrano differenze nel gruppo trama/texture (75 features) nei tre gruppi di topi (colonna blu) e differenze considerando coppie di gruppi: primo gruppo rispetto al secondo gruppo (colonna rossa), primo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna verde) e il secondo gruppo rispetto al terzo gruppo (colonna viola).

Infine, è stata eseguita un'analisi tradizionale basata sui SUV per valutarne le variazioni nel tempo. Nello specifico sono stati considerati SUVmax e SUVmean e le loro variazioni nei diversi organi sono mostrate rispettivamente in Figura 23 e Figura 24. Per facilitare la lettura, abbiamo escluso nella Figura 22 e nella Figura 23 la vescica, i cui SUV erano più alti rispetto agli altri organi, rendendoli illeggibili. Pertanto, le variazioni del SUV nella vescica sono mostrate nella Figura 25. Come previsto, il SUVmax è suscettibile a una maggiore variazione tra i gruppi, ma ciò è dovuto anche al rumore<sup>138</sup>. È un dato di fatto che il SUVmax corrisponde al valore massimo di voxel nel target e un singolo voxel potrebbe non essere rappresentativo dell'assorbimento complessivo del target. Questo valore è più resistente all'effetto volume parziale (PVE) ed è indipendente dall'operatore, ma è altamente variabile a causa dell'elevato livello di rumore nei dati PET<sup>139</sup>. Di conseguenza, è opportuno concentrarsi anche sui risultati del SUVmean, che è più stabile e il cui comportamento è in linea con i risultati ottenuti dalla precedente analisi basata sul sistema di supporto alle decisioni proposto. Nello specifico, fegato, vescica e stomaco hanno mostrato le variazioni più elevate in termini di SUVmean. Allo stesso modo, nell'analisi basata sul sistema di supporto alle decisioni proposto, SUVmax e SUVmean erano tra le features radiomiche che mostravano variazioni significative in questi tre organi. Ciò non è accaduto in nessun altro organo. In particolare, il SUVmax variava significativamente tra i gruppi 1 e 2, e tra i gruppi 1 e 3 nella vescica, e tra i gruppi 1

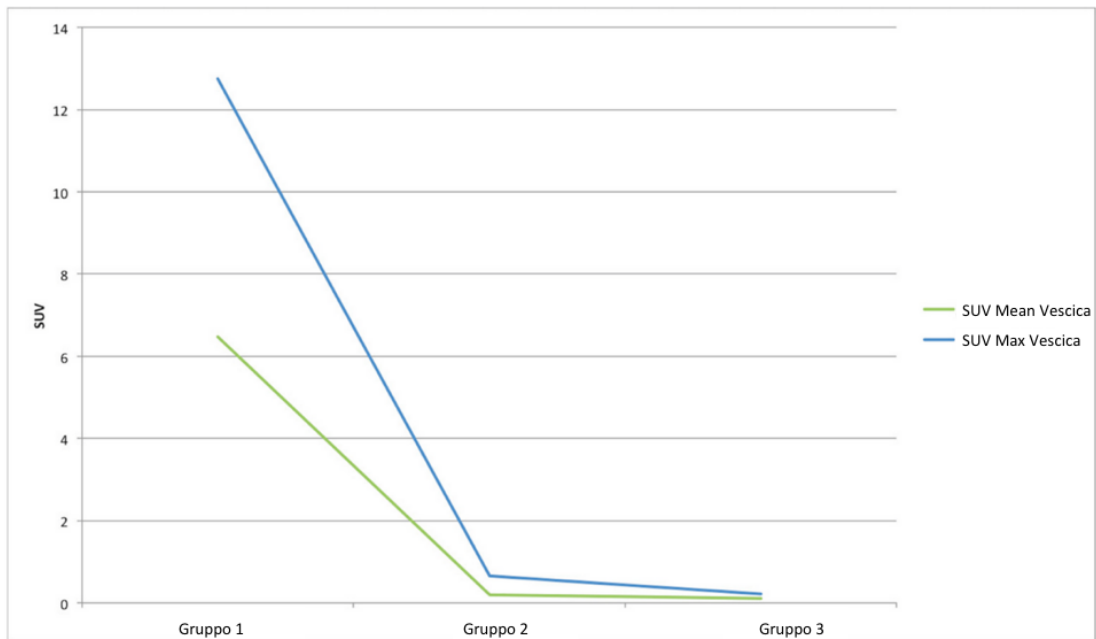
e 2, e tra i gruppi 2 e 3 nel fegato. La media SUV variava significativamente tra i gruppi 2 e 3 nella vescica, tra i gruppi 2 e 3 nello stomaco, e tra i gruppi 2 e 3 nel fegato.



**Figura 23.** Variazioni del SUVmax tra i gruppi nei distretti di cuore, stomaco, milza, fegato, reni e polmone.



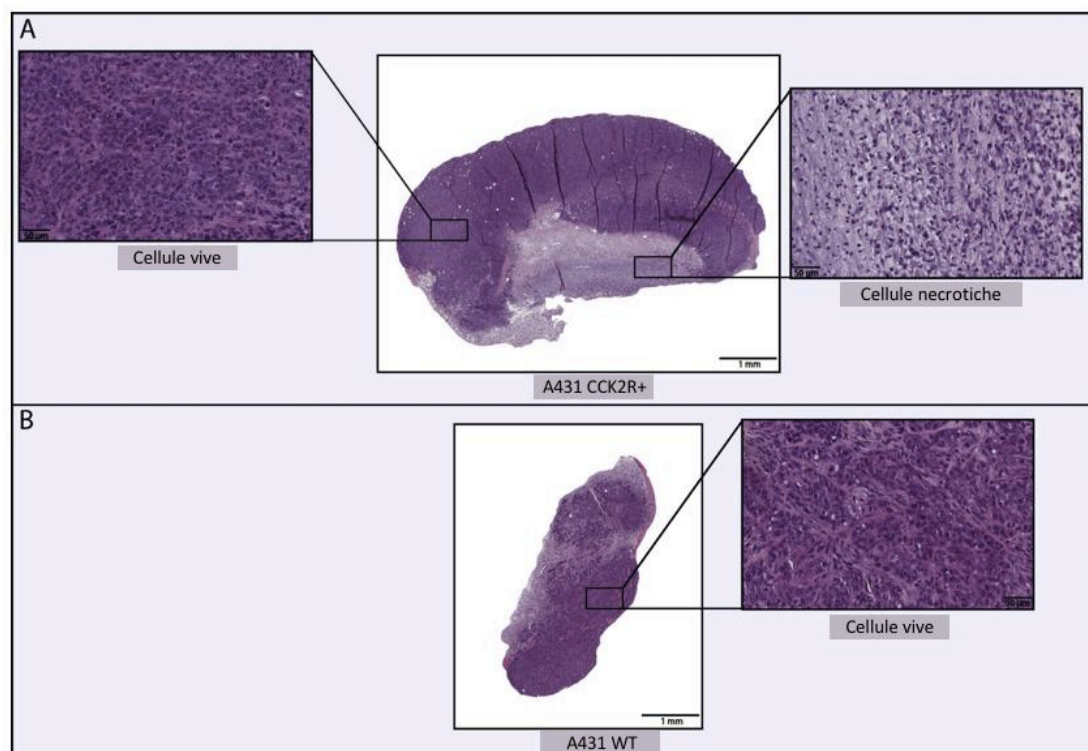
**Figura 24.** Variazioni SUVmean tra i gruppi nei distretti di cuore, stomaco, milza, fegato, reni e polmone.



**Figura 25.** SUVmax e SUVmean variano tra i gruppi nei distretti vescicali.

## 4.2 Esperimenti con $^{68}\text{Ga}$

Il modello di topo nudo Balb/c è stato xenotrapiantato con linee cellulari di carcinoma epidermoide umano (A431) WT e che sovraesprimono CCK2R, il bersaglio molecolare dello studio. Dopo l'eutanasia, organi e tumori sono stati raccolti e trattati per la colorazione istopatologica H&E. La valutazione WSI, eseguita tramite patologia digitale, ha rivelato il rapido tasso di crescita della linea cellulare A431 CCK2R+, con conseguente necrosi estesa all'interno del nucleo del tumore (Figura 26).



**Figura 26.** Valutazione digitale della necrosi nei tumori epidermoidi umani A431 WT e A431 CCK2R+. La figura illustra le aree necrotiche e vitali all'interno dei tumori. I tumori A431 CCK2R+ mostrano circa il 15-20% di necrosi rispetto all'area totale (A), mentre i tumori A431 WT mostrano un'assenza di necrosi (B).

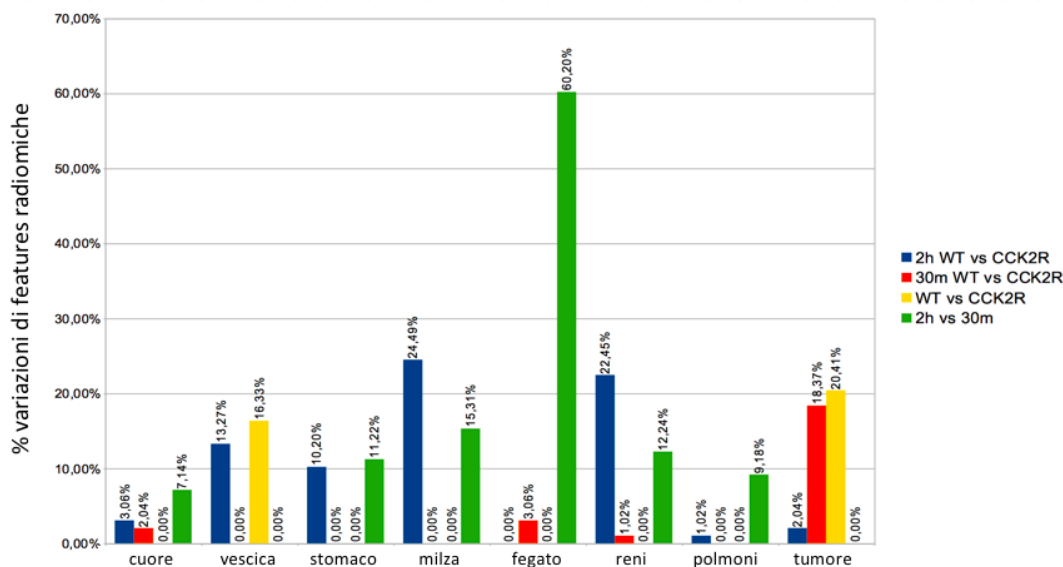
Un tumore necrotico è caratterizzato da una rapida crescita che supera la capacità di angiogenesi, con conseguente incapacità di vascolarizzare l'intera area tumorale <sup>140</sup>. Esiste un impatto della necrosi sull'assorbimento dei radiofarmaci a livello tumorale, anche nel caso di quelli CCK2R+, e ciò è noto essere un ostacolo al targeting dei radiofarmaci e contribuisce alla radioresistenza <sup>140,141</sup>. Attraverso la segmentazione con QuPath, sono state quantificate le aree tumorali viventi nei WSI rispetto alle aree tumorali totali e alle rispettive percentuali. I tumori con aree di necrosi elevate (>50%) sono stati esclusi dall'analisi radiomica, concentrando l'attenzione solo sui tumori con aree di necrosi minime. Infatti, il livello notevolmente elevato di necrosi in questi

tumori può distorcere l'assorbimento dei radiofarmaci, determinando un segnale disomogeneo e potenzialmente fuorviante <sup>140</sup>. Questa analisi specifica ha fornito informazioni sull'assenza di necrosi nei tumori WT rispetto ai tumori CCK2R, che presentavano un'area necrotica compresa tra il 15 e il 20%.

Il radiofarmaco esaminato consisteva nel radionuclide <sup>68</sup>Ga che marcava un vettore di targeting Z360, [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Z360. Z360, un antagonista ampiamente utilizzato del CCK2R, per guidare l'intera molecola verso i siti di sovraespressione del CCK2R. Per una valutazione minimamente invasiva della biodistribuzione radiofarmaceutica basata su immagini PET/CT di modelli animali, è stato utilizzato il flusso di lavoro precedentemente stabilito, testato con <sup>64</sup>Cu <sup>33</sup>. Inoltre, è stata ottenuta un'elevata precisione di co-registrazione, inclusa la correlazione dell'intensità tra l'atlante deformato e le immagini CT <sup>142</sup>.

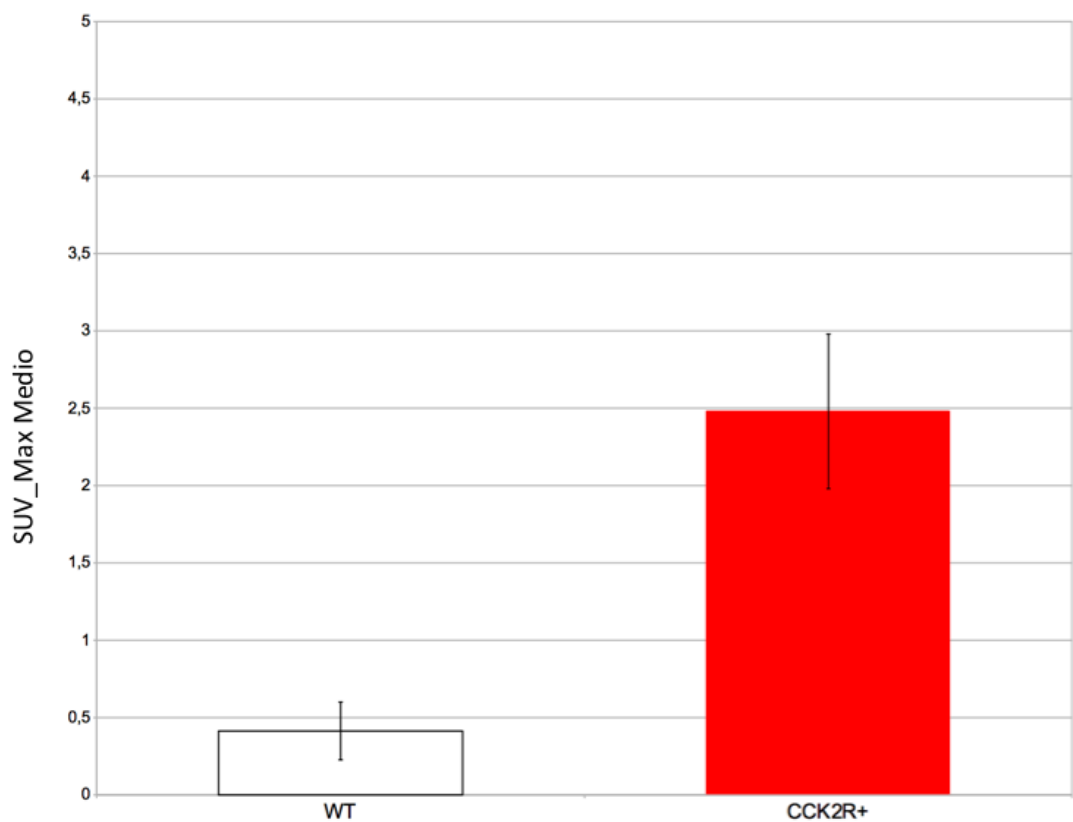
In questo studio, le immagini PET/CT e le analisi radiomiche sono state utilizzate per valutare la biodistribuzione del radiofarmaco 30 minuti e 2 ore dopo l'iniezione. L'analisi radiomica ha permesso di identificare 112 features radiomiche in ciascun diverso distretto corporeo. La variazione radiomica in percentuale è stata valutata nel tumore e in ciascun organo, inclusi cuore, stomaco, fegato, milza, polmoni, reni e vescica (Figura 27). Per un'interpretazione più coerente dei risultati della biodistribuzione, le analisi sono state eseguite sia in modo dipendente che indipendentemente dal punto temporale. In particolare, considerando i tumori WT e CCK2R, è stata rilevata un'elevata variazione statisticamente significativa (valore  $p < 0.05$ ) nella percentuale delle features nella vescica, nello stomaco, nella milza e nei reni a 2 ore (vedere barra blu nella Figura 27), invece una è stata rilevata una variazione elevata statisticamente significativa nella percentuale delle features del tumore a 30 minuti (vedere la barra rossa nella Figura 27). Al contrario, in modo completamente indipendente dal tempo (vedere la barra gialla nella Figura 27), è stata osservata una tendenza distinta nei tumori e nella vescica, con una variazione statisticamente significativa (valore  $p < 0.05$ ) più prominente nelle features radiomiche tra i gruppi WT e CCK2R. La tendenza osservata è probabilmente correlata alla biodistribuzione dei radiofarmaci. Nello specifico, nei tumori CCK2R è stato ipotizzato un accumulo precoce, che porta ad un successivo movimento del radiofarmaco verso la via di escrezione attraverso la vescica.

Inoltre, vale la pena notare che una variazione statisticamente significativa della percentuale delle features è stata rilevata nella vescica, nello stomaco, nella milza e nei reni a 2 ore rispetto a 30 minuti (vedere la barra verde nella Figura 27).



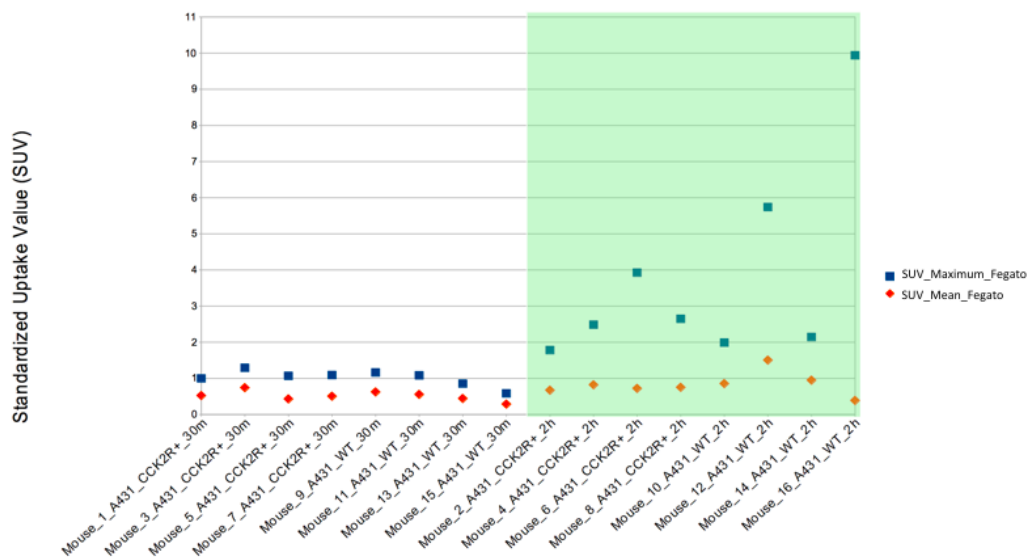
**Figura 27.** Differenze nelle features radiomiche tra i gruppi. Per l'estrazione delle features radiomiche sono stati presi in considerazione diversi organi, come cuore, stomaco, fegato, milza, polmoni, reni, vescica e tumori. L'analisi radiomica di 112 features della sequenza PET espressa come % di variazione tra i gruppi WT e CCK2R per ciascun organo/tumore è stata eseguita sia a 2 ore (blu) che a 30 minuti (rosso). Inoltre, la variazione delle features in % tra topi xenotrapiantati con cellule A431 WT e CCK2R per ciascun organo/tumore è stata analizzata indipendentemente dai punti temporali (giallo) ed è stata analizzata la variazione delle features in % tra 2 ore e 30 minuti per ciascun organo/tumore, indipendentemente dai gruppi WT e CCK2R (verde). Le differenze tra i gruppi sono considerate significative per  $p < 0.05$  (T-test non appaiato).

Questi risultati sono corroborati attraverso un'analisi mirata, sottolineando in particolare una feature radiomica specifica: il SUV. Il SUV è la misura quantitativa più utilizzata nell'imaging PET per valutare la concentrazione di un radiofarmaco all'interno di un particolare tessuto o lesione. Viene calcolato normalizzando la concentrazione di radioattività nel VOI alla dose iniettata del radiofarmaco e al peso corporeo del paziente. SUVmax e SUVmean sono i SUV più comunemente usati<sup>143</sup>. Nello specifico, SUVmax, essendo riferito a un solo voxel del tessuto o della lesione, è considerato più riproducibile di SUVmean e quindi più comunemente utilizzato come parametro PET<sup>144,145</sup>. Nel nostro studio, la valutazione SUVmax ha rivelato che i tumori CCK2R+ avevano un assorbimento radiofarmaceutico significativo rispetto ai tumori WT, che non presentano assorbimento in nessuno dei topi considerati con un valore  $p < 0.05$  (Figura 28). Questi dati risultano molto promettenti poiché confermano la biodistribuzione del radiofarmaco [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Z360 verso il sito di sovraespressione di CCK2R, come previsto.

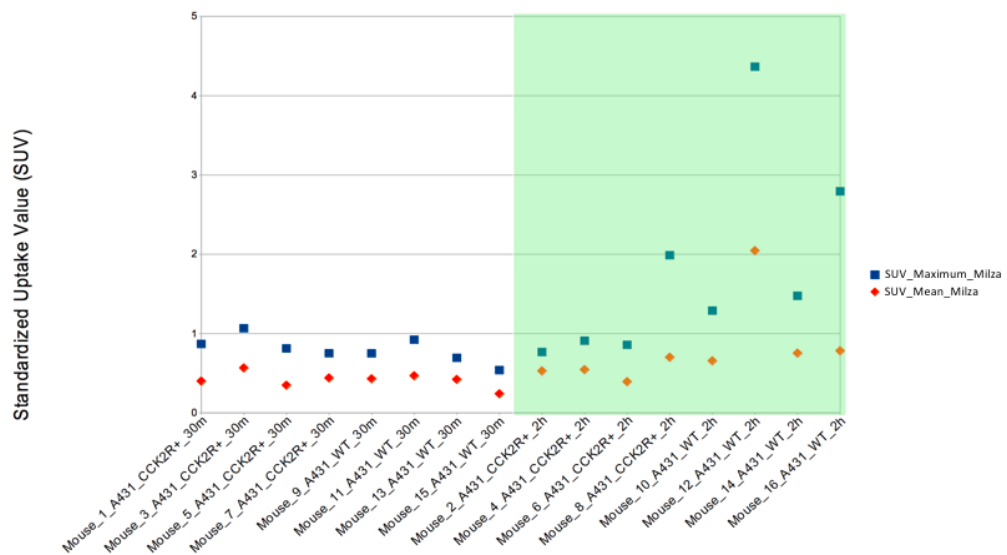


**Figura 28.** Il SUVmax medio e la deviazione standard nei tumori WT e CCK2R+. Le differenze tra tumori sono considerate significative per  $p < 0.05$  (T-test non appaiato).

Inoltre, il SUVmax è stato valutato negli altri distretti corporei, tra cui cuore, stomaco, fegato, milza, polmoni, reni e vescica. Tra questi, SUVmax ha mostrato variazioni significative tra i punti temporali di 2 ore e 30 minuti sia nel fegato che nella milza, illustrando un aumento progressivo dell'assorbimento nel tempo (Figura 29-30) poiché il radiotracciante ha avuto più tempo per accumularsi negli organi in osservazione. La differenza tra SUVmean e SUVmax potrebbe aumentare nel tempo perché SUVmean considera tutti i voxel all'interno del target, compresi quelli con un assorbimento radiofarmaceutico inferiore, mentre SUVmax si basa solo sul voxel con la massima intensità di assorbimento.



**Figura 29.** Valutazione SUVmax nel fegato. Il trend SUVmax è risultato significativamente più alto a 2 ore rispetto a 30 minuti dopo l'iniezione sia per i casi di xenotrapianto A431 CCK2R+ che per A431 WT. Le differenze sono considerate significative per  $p < 0.05$  (test T non appaiato).



**Figura 30.** Valutazione SUVmax nella milza. Il trend SUVmax è risultato significativamente più alto a 2 ore rispetto a 30 minuti dopo l'iniezione sia per i casi di xenotrapianto A431 CCK2R+ che per A431 WT. Le differenze sono considerate significative per  $p < 0.05$  (test T non appaiato).

## CAPITOLO 5

### 5 CONCLUSIONI

L'imaging è stato ampiamente utilizzato per monitorare lo sviluppo e la progressione del cancro utilizzando animali da laboratorio, la risposta del tumore agli interventi terapeutici, ma anche per lo sviluppo di nuovi agenti diagnostici e terapeutici.

I recenti progressi nella tecnologia applicata ai modelli di colture cellulari e modelli animali per studi in vitro e in vivo hanno contribuito a migliorare la comprensione dei meccanismi di uptake e biodistribuzione dei composti radioattivi progettati per terapie personalizzate attraverso l'imaging funzionale PET e SPECT associato ad analisi morfologica CT/MR.

In medicina nucleare già in ambito clinico la radiomica risulta un tipo di analisi quantitativa impiegata dai medici nucleari e dai ricercatori per la valutazione delle immagini dei pazienti oncologici pre- e post- trattamento <sup>131</sup>, con ricerca di nuovi biomarcatori da includere in radiogenomica <sup>146</sup> e a scopo predittivo <sup>100</sup>.

Ciò è molto promettente a livello investigativo prognostico e predittivo in quanto la ricerca in ambito medico è sempre più orientata allo sviluppo di strategie sempre meno invasive e sempre più discriminanti dal punto di vista della medicina di precisione e della stratificazione dei pazienti affetti dalle varie forme di cancro.

Tuttavia, considerando i trial preclinici propedeutici alle applicazioni cliniche dei radiofarmaci, uno dei challenge più discussi e più soggetti a variabilità operatore-dipendente è rappresentato dalla valutazione delle immagini tomografiche di PET e SPECT per la stima della biodistribuzione a livello degli organi e tessuti sui modelli animali, in particolare dei roditori (ratti e topi). Sebbene il lavoro multidisciplinare dei gruppi di ricerca sia composto da figure diverse e competenze complementari, la specializzazione e l'expertise nel campo dell'imaging preclinico non sono sempre presenti in un gruppo di ricerca.

Ciò è vero in quanto la segmentazione della PET è un compito arduo a causa della mancanza di coerenza nel contorno del tumore, bassa risoluzione dell'immagine e livello di rumore relativamente elevato e, spesso, eterogeneità dell'assorbimento dei vari radiofarmaci all'interno di una lesione. È fondamentale, ad oggi, ottimizzare sicuramente la fase di segmentazione della lesione/regione target di interesse radiobiologico, procedendo verso lo sviluppo di un workflow di analisi e quantificazione accurata dell'assorbimento di nuovi radiofarmaci a livello d'organo attraverso le immagini, che risultano ad oggi le metodiche meno invasive <sup>147</sup>. L'interpretazione visiva qualitativa è il più importante metodo comunemente utilizzato. Tuttavia, la quantificazione a livello valutativo è altrettanto fondamentale nell'imaging della regione target. Per identificare il target il metodo di segmentazione manuale dipende da l'esperienza del ricercatore nel caso preclinico (e del medico in ambito clinico) che limita la precisione della misurazione in quanto dipendente dall'operatore e dalla sua esperienza e, pertanto non riproducibile. Inoltre, richiede molto tempo ed è compromesso dalla variabilità inter e intra-osservatore che è dovuta

alla soggettività, e alla sensibilità delle impostazioni del livello della finestra di visualizzazione.

In questo progetto di dottorato sono stati creati e testati due flussi di lavoro basati su un approccio mini invasivo attraverso imaging microPET/CT e radiomica per un nuovo sistema di supporto alle decisioni nella valutazione della biodistribuzione di radiofarmaci nei modelli animali, rispettivamente in assenza e in presenza di tumore CCK2R+, e utilizzando composti diversi radiomarcati.

Il filone di ricerca ha avuto come oggetto di studio l'applicazione dell'analisi radiomica per la valutazione semi-automatica della biodistribuzione di un nuovo chelante marcato con  $^{64}\text{Cu}$  (primo studio) e un nuovo radiofarmaco marcato con  $^{68}\text{Ga}$  diretto al recettore CCK2R (secondo studio) presente in vari tipi di tumore. Questi studi per la quantificazione dell'assorbimento di radiofarmaci a livello di organi di modelli animali ha consentito di validare un nuovo metodo quantitativo per ottenere risultati ripetibili negli studi di imaging biomedico.

Nello studio preliminare, il nuovo chelante [ $^{64}\text{Cu}$ ] DO2A2S sviluppato per applicazioni teranostiche è stato testato su un modello murino e la valutazione post-iniezione è stata effettuata attraverso imaging microPET/CT. Considerata l'emivita del  $^{64}\text{Cu}$  (12.7 ore) sono state considerati 3 tempi di acquisizione, ovvero 1 ora, 4 ore e 24 ore dopo la somministrazione di [ $^{64}\text{Cu}$ ] DO2A2S nella vena della coda dei topi Balb/C nudo.

Nel secondo studio, il nuovo radiofarmaco [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-Z360 ottimizzato per il targeting dei tumori CCK2R+ è stato testato sul modello di topo nudo Balb/c xenotrapiantato con linee cellulari umane (A431) WT e sovraespressanti CCK2R. Dopo la crescita dei tumori, i topi sono stati analizzati mediante imaging microPET/CT. In questo esperimento sono stati considerati due tempi di acquisizione dell'imaging, rispettivamente 30 minuti e 2 ore, direttamente correlati alla breve emivita del  $^{68}\text{Ga}$  (67.7 minuti).

L'identificazione semiautomatica del volume di interesse è il primo passo di un'analisi radiomica poiché, se l'identificazione del target viene eseguita manualmente, le features estratte sono caratterizzate da un'elevata variabilità inter-operatore<sup>100</sup>.

Per la messa a punto di questo flusso di lavoro, le immagini PET/CT sono state coregistrate con un atlante murino. I nostri risultati hanno dimostrato la fattibilità e l'efficacia del nostro approccio, ottenendo una buona accuratezza della coregistrazione in termini di correlazione dell'intensità tra l'atlante deformato e le immagini CT<sup>33</sup>. Dopo questo passaggio, le maschere dell'Atlante sono state riportate nelle immagini PET per estrarre le features radiomiche dai diversi organi rispettivamente dalle immagini dei topi acquisite ai diversi tempi di scansione.

Nel primo studio con il chelante [ $^{64}\text{Cu}$ ] DO2A2S, 108 features radiomiche sono state estratte dai seguenti organi considerati: cuore, vescica, stomaco, fegato, milza, rene e polmone, rispettivamente dalle immagini dei topi acquisite a 1 ora, 4 ore e 24 ore dopo l'iniezione intravena del chelante radiomarcato.

Nel secondo studio con il radiofarmaco [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-Z360, sono state estratte 112 features radiomiche in ciascun diverso distretto corporeo e dai tumori. Gli organi

considerati per ciascun punto temporale sono i seguenti: cuore, stomaco, fegato, milza, polmoni, reni e vescica.

Il confronto dell'analisi radiomica delle immagini di microPET/CT a tre tempi con [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S ha consentito di indagare i possibili cambiamenti nel tempo nella biodistribuzione di questo chelante a livello di ciascun organo, evidenziando che nei distretti epatico e vescicale la biodistribuzione del [<sup>64</sup>Cu] DO2A2S ha mostrato elevate differenze quantitative nei tre diversi tempi di acquisizione, mentre l'accumulo del chelante in cuore, stomaco, milza, rene e polmone mostrava una percentuale molto bassa di features radiomiche, indicando che l'accumulo del chelante radiomarcato in questi organi rimaneva basso.

Il confronto dell'analisi radiomica delle immagini di microPET/CT a due tempi con [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-Z360 ha consentito di indagare i possibili cambiamenti nel tempo nella biodistribuzione di questo radiofarmaco a livello dei due tumori (WT e CCK2R+) e di ciascun organo, evidenziando che l'assorbimento del radiofarmaco era significativamente concentrato nei tumori che esprimevano CCK2R rispetto ai tumori WT, confermando l'efficace targeting dei radiofarmaci. Inoltre, solo il fegato e la milza hanno mostrato un cambiamento significativo nella percentuale di features a 2 ore rispetto a 30 minuti, dimostrando l'assenza di accumulo di radiofarmaco in altri organi.

In conclusione, questo metodo basato sulla radiomica si è rivelato efficace per gli studi preclinici di imaging microPET/CT per la quantificazione della biodistribuzione sia di un chelante radiomarcato con il radionuclide <sup>64</sup>Cu (avente un tempo di decadimento più lento) sia di un radiofarmaco marcato con <sup>68</sup>Ga (avente un tempo di decadimento più breve) diretto a tumori overesprimenti il recettore della colecistochinina 2. Avendo ottenuto dei risultati promettenti dal punto di vista della valutazione dell'uptake di nuovi radiofarmaci teranostici, questi lavori hanno aperto la strada all'applicazione della radiomica come nuovo approccio preclinico di analisi dell'imaging microPET/CT. Ciò conferma pertanto, non solo l'ambito applicativo predittivo di tale metodo di analisi dell'imaging in ambito clinico, ma valida la radiomica come nuovo supporto alle decisioni in ambito preclinico per la valutazione della biodistribuzione dei radiofarmaci.

## BIBLIOGRAFIA

1. Harris, W. J. *et al.* In vivo methods for imaging blood–brain barrier function and dysfunction. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **50**, 1051–1083 (2023).
2. G. Cheetham, A. *et al.* Targeting Tumors with Small Molecule Peptides. *Curr Cancer Drug Targets* **16**, 489–508 (2016).
3. Li, Z. *et al.* Application of Animal Models in Cancer Research: Recent Progress and Future Prospects. *Cancer Manag Res* **Volume 13**, 2455–2475 (2021).
4. Charbonneau, M. *et al.* The development of a rapid patient-derived xenograft model to predict chemotherapeutic drug sensitivity/resistance in malignant glial tumors. *Neuro Oncol* **25**, 1605–1616 (2023).
5. Benfante, V. *et al.* An Overview of In Vitro Assays of <sup>64</sup>Cu-, <sup>68</sup>Ga-, <sup>125</sup>I-, and <sup>99m</sup>Tc-Labelled Radiopharmaceuticals Using Radiometric Counters in the Era of Radiotheranostics. *Diagnostics* **13**, 1210 (2023).
6. Bavelaar, B. M., Lee, B. Q., Gill, M. R., Falzone, N. & Vallis, K. A. Subcellular Targeting of Theranostic Radionuclides. *Front Pharmacol* **9**, (2018).
7. Morris, Z. S., Wang, A. Z. & Knox, S. J. The Radiobiology of Radiopharmaceuticals. *Semin Radiat Oncol* **31**, 20–27 (2021).
8. Barca, C. *et al.* Expanding Theranostic Radiopharmaceuticals for Tumor Diagnosis and Therapy. *Pharmaceuticals* **15**, 13 (2021).
9. Yeong, C.-H., Cheng, M. & Ng, K.-H. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B* **15**, 845–863 (2014).
10. Roosenburg, S., Laverman, P., van Delft, F. L. & Boerman, O. C. Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors. *Amino Acids* **41**, 1049–1058 (2011).
11. Dockray, G. J. Cholecystokinin and gut–brain signalling. *Regul Pept* **155**, 6–10 (2009).
12. Okonkwo, O., Zezoff, D. & Adeyinka, A. *Biochemistry, Cholecystokinin*. (2024).
13. Liu, Q. *et al.* Ligand recognition and G-protein coupling selectivity of cholecystokinin A receptor. *Nat Chem Biol* **17**, 1238–1244 (2021).
14. Miller, L. J. & Gao, F. Structural basis of cholecystokinin receptor binding and regulation. *Pharmacol Ther* **119**, 83–95 (2008).
15. Bernard, A. *et al.* The Cholecystokinin Type 2 Receptor, a Pharmacological Target for Pain Management. *Pharmaceuticals* **14**, 1185 (2021).
16. Zeng, Q., Ou, L., Wang, W. & Guo, D.-Y. Gastrin, Cholecystokinin, Signaling, and Biological Activities in Cellular Processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, (2020).
17. Smith, J. P., Nadella, S. & Osborne, N. Gastrin and Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **4**, 75–83 (2017).
18. Kaloudi, A. *et al.* [<sup>99m</sup>Tc]Tc-DGA1, a Promising CCK<sub>2</sub> R-Antagonist-Based Tracer for Tumor Diagnosis with Single-Photon Emission Computed Tomography. *Mol Pharm* **17**, 3116–3128 (2020).
19. Vale, N. *et al.* Cell-penetrating peptides in oncologic pharmacotherapy: A review. *Pharmacol Res* **162**, 105231 (2020).

20. Verona, M. *et al.* Preliminary Study of a 1,5-Benzodiazepine-Derivative Labelled with Indium-111 for CCK-2 Receptor Targeting. *Molecules* **26**, 918 (2021).
21. Dorbala, S. *et al.* Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) Myocardial Perfusion Imaging Guidelines: Instrumentation, Acquisition, Processing, and Interpretation. *Journal of Nuclear Cardiology* **25**, 1784–1846 (2018).
22. Van Audenhaege, K. *et al.* Review of SPECT collimator selection, optimization, and fabrication for clinical and preclinical imaging. *Med Phys* **42**, 4796–4813 (2015).
23. Shukla, A. & Kumar, U. Positron emission tomography: An overview. *J Med Phys* **31**, 13 (2006).
24. Holik, H. A. *et al.* The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker. *Molecules* **27**, 3062 (2022).
25. Lee, B. Q., Kibédi, T., Stuchbery, A. E. & Robertson, K. A. Atomic Radiations in the Decay of Medical Radioisotopes: A Physics Perspective. *Comput Math Methods Med* **2012**, 1–14 (2012).
26. Crişan, G. *et al.* Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int J Mol Sci* **23**, 5023 (2022).
27. Gupta, A., Lee, M. S., Kim, J. H., Lee, D. S. & Lee, J. S. Preclinical Voxel-Based Dosimetry in Theranostics: a Review. *Nucl Med Mol Imaging* **54**, 86–97 (2020).
28. Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M. & Han, S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine* **Volume 16**, 1083–1102 (2021).
29. Wahl, R. L. & Sunderland, J. Radiopharmaceutical Dosimetry for Cancer Therapy: From Theory to Practice. *Journal of Nuclear Medicine* **62**, 1S-2S (2021).
30. Miele, E. *et al.* Positron Emission Tomography (PET) radiotracers in oncology – utility of 18F-Fluoro-deoxy-glucose (FDG)-PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **27**, 52 (2008).
31. Wong, K. K. L., Liao, J. Z. & Verheyen, E. M. A positive feedback loop between Myc and aerobic glycolysis sustains tumor growth in a Drosophila tumor model. *Elife* **8**, (2019).
32. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **41**, 211–218 (2016).
33. Benfante, V. *et al.* A New Preclinical Decision Support System Based on PET Radiomics: A Preliminary Study on the Evaluation of an Innovative 64Cu-Labeled Chelator in Mouse Models. *J Imaging* **8**, 92 (2022).
34. Sgouros, G. Radiopharmaceutical Therapy. *Health Phys* **116**, 175–178 (2019).
35. Herrero Álvarez, N., Bauer, D., Hernández-Gil, J. & Lewis, J. S. Recent Advances in Radiometals for Combined Imaging and Therapy in Cancer. *ChemMedChem* **16**, 2909–2941 (2021).
36. Man, F., Gawne, P. J. & T.M. de Rosales, R. Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev* **143**, 134–160 (2019).

37. Ugur, Ö. *et al.* Ga-66 labeled somatostatin analogue DOTA-DPhe 1 -Tyr 3 - octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostatin receptor positive tumors. *Nucl Med Biol* **29**, 147–157 (2002).
38. Cherry, S. R. Multimodality Imaging: Beyond PET/CT and SPECT/CT. *Semin Nucl Med* **39**, 348–353 (2009).
39. Bunka, M. *et al.* Imaging quality of <sup>44</sup>Sc in comparison with five other PET radionuclides using Derenzo phantoms and preclinical PET. *Applied Radiation and Isotopes* **110**, 129–133 (2016).
40. Gareev, K. G. & Shevtsov, M. Editorial: Radiotheranostics: From basic research to clinical application. *Front Med (Lausanne)* **10**, (2023).
41. Jönsson, L. *et al.* Quantitative analysis of phantom studies of <sup>111</sup>In and <sup>68</sup>Ga imaging of neuroendocrine tumours. *EJNMMI Phys* **5**, 5 (2018).
42. Banerjee, S., Pillai, M. R. A. & Knapp, F. F. (Russ). Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem Rev* **115**, 2934–2974 (2015).
43. Wright, C. L., Zhang, J., Tweedle, M. F., Knopp, M. V. & Hall, N. C. Theranostic Imaging of Yttrium-90. *Biomed Res Int* **2015**, 1–11 (2015).
44. Hassan, M., Bokhari, T. H., Lodhi, N. A., Khosa, M. K. & Usman, M. A review of recent advancements in Actinium-225 labeled compounds and biomolecules for therapeutic purposes. *Chem Biol Drug Des* **102**, 1276–1292 (2023).
45. Krasnovskaya, O. O. *et al.* Recent Advances in <sup>64</sup>Cu/<sup>67</sup>Cu-Based Radiopharmaceuticals. *Int J Mol Sci* **24**, 9154 (2023).
46. Owunwanne, A., Patel, M. & Sadek, S. Iodine radiopharmaceuticals. in *The Handbook of Radiopharmaceuticals* 106–119 (Springer US, Boston, MA, 1995). doi:10.1007/978-1-4757-0414-3\_8.
47. K. Nayak, T. & W. Brechbiel, M. <sup>86</sup>Y Based PET Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Biological Applications. *Med Chem (Los Angeles)* **7**, 380–388 (2011).
48. Naskar, N. & Lahiri, S. Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Front Med (Lausanne)* **8**, (2021).
49. Müller, C., Domnanich, K. A., Umbricht, C. A. & van der Meulen, N. P. Scandium and terbium radionuclides for radiotheranostics: current state of development towards clinical application. *Br J Radiol* **91**, 20180074 (2018).
50. Brady, D., O’Sullivan, J. M. & Prise, K. M. What is the Role of the Bystander Response in Radionuclide Therapies? *Front Oncol* **3**, (2013).
51. Lewellen, T. K. Recent developments in PET detector technology. *Phys Med Biol* **53**, R287–R317 (2008).
52. Zatcepin, A. & Ziegler, S. I. Detectors in positron emission tomography. *Z Med Phys* **33**, 4–12 (2023).
53. Enlow, E. & Abbaszadeh, S. State-of-the-art challenges and emerging technologies in radiation detection for nuclear medicine imaging: A review. *Front Phys* **11**, (2023).
54. Mosconi, L. *et al.* FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer’s disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**, 811–822 (2009).
55. Jones, T. & Townsend, D. History and future technical innovation in positron emission tomography. *Journal of Medical Imaging* **4**, 011013 (2017).

56. Zeng, G. L. Filtered backprojection algorithm can outperform iterative maximum likelihood expectation-maximization algorithm. *Int J Imaging Syst Technol* **22**, 114–120 (2012).
57. Clark, D. P. & Badea, C. T. Advances in micro-CT imaging of small animals. *Physica Medica* **88**, 175–192 (2021).
58. Iball, G. R., Moore, A. C. & Crawford, E. J. A routine quality assurance test for CT automatic exposure control systems. *J Appl Clin Med Phys* **17**, 291–306 (2016).
59. Jung, J. H., Choi, Y. & Im, K. C. PET/MRI: Technical Challenges and Recent Advances. *Nucl Med Mol Imaging* **50**, 3–12 (2016).
60. Panayides, A. S. *et al.* AI in Medical Imaging Informatics: Current Challenges and Future Directions. *IEEE J Biomed Health Inform* **24**, 1837–1857 (2020).
61. Townsend, D. W., Beyer, T. & Blodgett, T. M. PET/CT scanners: A hardware approach to image fusion. *Semin Nucl Med* **33**, 193–204 (2003).
62. Tsai, Y.-J. & Liu, C. Pitfalls on PET/CT Due to Artifacts and Instrumentation. *Semin Nucl Med* **51**, 646–656 (2021).
63. Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J. & Raz, A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *Am J Pathol* **170**, 793–804 (2007).
64. An, Z., Jiang, P., Wang, X., Moossa, A. R. & Hoffman, R. M. Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection. *Clin Exp Metastasis* **17**, 265–270 (1999).
65. Deshmukh, M. V. *et al.* NMR Studies Reveal Structural Differences between the Gallium and Yttrium Complexes of DOTA- <sup>d</sup>-Phe-Tyr<sup>3</sup> - octreotide. *J Med Chem* **48**, 1506–1514 (2005).
66. Maurin, M., Garnuszek, P., Baran, P., Pawlak, D. & Mikołajczak, R. The radiometal makes a difference. Synthesis and preliminary characterisation of DOTA-minigastrin analogue complexes with Ga, Lu and Y. *Nuclear Medicine Review* **18**, 51–55 (2015).
67. Schottelius, M. *et al.* Twins in spirit - episode I: comparative preclinical evaluation of [68Ga]DOTATATE and [68Ga]HA-DOTATATE. *EJNMMI Res* **5**, 22 (2015).
68. Awwad, H. K. Radiation Effects on Normal Tissues: General Principles. in *Radiation Oncology: Radiobiological and Physiological Perspectives* 109–127 (Springer Netherlands, Dordrecht, 1990). doi:10.1007/978-94-015-7865-3\_5.
69. Maurer, A. H. COMBINED IMAGING MODALITIES: PET/CT AND SPECT/CT. *Health Phys* **95**, 571–576 (2008).
70. Okoye, N. C., Baumeister, J. E., Najafi Khosroshahi, F., Hennkens, H. M. & Jurisson, S. S. Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications. *Radiochim Acta* **107**, 1087–1120 (2019).
71. Zhou, Y. *et al.* <sup>64</sup>Cu-based Radiopharmaceuticals in Molecular Imaging. *Technol Cancer Res Treat* **18**, 153303381983075 (2019).
72. Kręcis, P., Czarnecka, K., Królicki, L., Mikiciuk-Olasik, E. & Szymański, P. Radiolabeled Peptides and Antibodies in Medicine. *Bioconjug Chem* **32**, 25–42 (2021).

73. Tosato, M. *et al.* Copper Coordination Chemistry of Sulfur Pendant Cyclen Derivatives: An Attempt to Hinder the Reductive-Induced Demetalation in <sup>64/67</sup> Cu Radiopharmaceuticals. *Inorg Chem* **60**, 11530–11547 (2021).
74. Graham, M. M., Gu, X., Ginader, T., Breheny, P. & Sunderland, J. J. <sup>68</sup> Ga-DOTATOC Imaging of Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Metaanalysis. *Journal of Nuclear Medicine* **58**, 1452–1458 (2017).
75. Moon, S.-H. *et al.* Development of a Ga-68 labeled PET tracer with short linker for prostate-specific membrane antigen (PSMA) targeting. *Bioorg Med Chem* **26**, 2501–2507 (2018).
76. Mirzaei, A., R. Jalilian, A., Akhlaghi, M. & Beiki, D. Production of <sup>68</sup>Ga-citrate Based on a SnO<sub>2</sub> Generator for Short-Term Turpentine Oil-Induced Inflammation Imaging in Rats. *Curr Radiopharm* **9**, 208–214 (2016).
77. Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R. & Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem Rev* **110**, 2858–2902 (2010).
78. Saha, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. (Springer International Publishing, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-57580-3.
79. Belyaev, B. N. *et al.* Method for precision measurement of the masses of short-lived nuclides with application of stable isobars. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **70**, 464–468 (1992).
80. Hosny, T., Al-Anezi, E. & Khalil, M. M. Basic Radiation Physics. in *Basic Science of PET Imaging* 3–35 (Springer International Publishing, Cham, 2017). doi:10.1007/978-3-319-40070-9\_1.
81. Buchtela, K. RADIOCHEMICAL METHODS|Gamma-Ray Spectrometry☆. in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.11333-2.
82. Sivasankaran, B. R., Christas, M. A., Aarthi, K. V. & Larny, M. J. Alpha decay half-lives calculation of even-even nuclei in the range  $62 \leq Z \leq 118$  using Gamow's theory. *Nucl Phys A* **989**, 246–256 (2019).
83. Algora, A., Tain, J. L., Rubio, B., Fallot, M. & Gelletly, W. Beta-decay studies for applied and basic nuclear physics. *The European Physical Journal A* **57**, 85 (2021).
84. Gastaldo, L. *et al.* The electron capture in <sup>163</sup>Ho experiment – ECHo. *Eur Phys J Spec Top* **226**, 1623–1694 (2017).
85. Sergeev, V. O. An estimate of energy of isomeric transition in the decay of <sup>234m</sup>Pa. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics* **79**, 833–837 (2015).
86. Pleszczyński, M. Implementation of the computer tomography parallel algorithms with the incomplete set of data. *PeerJ Comput Sci* **7**, e339 (2021).
87. Marques, L., Vale, A. & Vaz, P. State-of-the-Art Mobile Radiation Detection Systems for Different Scenarios. *Sensors* **21**, 1051 (2021).
88. El Ali, H. H., Bodholdt, R. P., Jørgensen, J. T., Myschetzky, R. & Kjaer, A. Importance of Attenuation Correction (AC) for Small Animal PET Imaging. *Diagnostics* **2**, 42–51 (2012).
89. Zhang, Y.-D. *et al.* Advances in multimodal data fusion in neuroimaging: Overview, challenges, and novel orientation. *Information Fusion* **64**, 149–187 (2020).

90. Xu, M., Yoon, S., Fuentes, A. & Park, D. S. A Comprehensive Survey of Image Augmentation Techniques for Deep Learning. *Pattern Recognit* **137**, 109347 (2023).
91. Islam, K. T., Wijewickrema, S. & O’Leary, S. A deep learning based framework for the registration of three dimensional multi-modal medical images of the head. *Sci Rep* **11**, 1860 (2021).
92. Aston, J. A. D. *et al.* Positron Emission Tomography Partial Volume Correction: Estimation and Algorithms. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **22**, 1019–1034 (2002).
93. Zaidi, H. & Karakatsanis, N. Towards enhanced PET quantification in clinical oncology. *Br J Radiol* **91**, 20170508 (2018).
94. Vaquero, J. J. & Kinahan, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu Rev Biomed Eng* **17**, 385–414 (2015).
95. Meechai, T., Tepmongkol, S. & Pluempitiwiriyaewej, C. Partial-volume effect correction in positron emission tomography brain scan image using super-resolution image reconstruction. *Br J Radiol* **88**, 20140119 (2015).
96. Beattie, B. J., Akhurst, T. J., Augensen, F. & Humm, J. L. SUVfdg: A standard-uptake-value (SUV) body habitus normalizer specific to fluorodeoxyglucose (FDG) in humans. *PLoS One* **17**, e0266704 (2022).
97. Guo, A., Chen, Z., Li, F. & Luo, Q. Delineating regions of interest for mass spectrometry imaging by multimodally corroborated spatial segmentation. *Gigascience* **12**, (2022).
98. Mansoor, A. *et al.* Segmentation and Image Analysis of Abnormal Lungs at CT: Current Approaches, Challenges, and Future Trends. *RadioGraphics* **35**, 1056–1076 (2015).
99. Carmo, D. *et al.* A Systematic Review of Automated Segmentation Methods and Public Datasets for the Lung and its Lobes and Findings on Computed Tomography Images. *Yearb Med Inform* **31**, 277–295 (2022).
100. Comelli, A. *et al.* Radiomics: A New Biomedical Workflow to Create a Predictive Model. in 280–293 (2020). doi:10.1007/978-3-030-52791-4\_22.
101. Thawani, R. *et al.* Radiomics and radiogenomics in lung cancer: A review for the clinician. *Lung Cancer* **115**, 34–41 (2018).
102. Giambelluca, D. *et al.* PI-RADS 3 Lesions: Role of Prostate MRI Texture Analysis in the Identification of Prostate Cancer. *Curr Probl Diagn Radiol* **50**, 175–185 (2021).
103. Ugga, L. *et al.* Prediction of high proliferative index in pituitary macroadenomas using MRI-based radiomics and machine learning. *Neuroradiology* **61**, 1365–1373 (2019).
104. Stefano, A. *et al.* A preliminary PET radiomics study of brain metastases using a fully automatic segmentation method. *BMC Bioinformatics* **21**, 325 (2020).
105. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220–228 (2010).
106. van Griethuysen, J. J. M. *et al.* Computational Radiomics System to Decode the Radiographic Phenotype. *Cancer Res* **77**, e104–e107 (2017).
107. Fornaçon-Wood, I. *et al.* Reliability and prognostic value of radiomic features are highly dependent on choice of feature extraction platform. *Eur Radiol* **30**, 6241–6250 (2020).

108. Nioche, C. *et al.* LIFEx: A Freeware for Radiomic Feature Calculation in Multimodality Imaging to Accelerate Advances in the Characterization of Tumor Heterogeneity. *Cancer Res* **78**, 4786–4789 (2018).
109. Szczypiński, P. M., Strzelecki, M., Materka, A. & Klepaczko, A. MaZda—A software package for image texture analysis. *Comput Methods Programs Biomed* **94**, 66–76 (2009).
110. Fang, Y.-H. D. *et al.* Development and Evaluation of an Open-Source Software Package “CGITA” for Quantifying Tumor Heterogeneity with Molecular Images. *Biomed Res Int* **2014**, 1–9 (2014).
111. Barone, S. *et al.* Hybrid descriptive-inferential method for key feature selection in prostate cancer radiomics. *Appl Stoch Models Bus Ind* **37**, 961–972 (2021).
112. Cuocolo, R. *et al.* Machine learning applications in prostate cancer magnetic resonance imaging. *Eur Radiol Exp* **3**, 35 (2019).
113. Comelli, A. *et al.* A Kernel Support Vector Machine Based Technique for Crohn’s Disease Classification in Human Patients. in 262–273 (2018). doi:10.1007/978-3-319-61566-0\_25.
114. Chandra, S. S. *et al.* Patient Specific Prostate Segmentation in 3-D Magnetic Resonance Images. *IEEE Trans Med Imaging* **31**, 1955–1964 (2012).
115. Hagiwara, A., Fujita, S., Ohno, Y. & Aoki, S. Variability and Standardization of Quantitative Imaging. *Invest Radiol* **55**, 601–616 (2020).
116. Goeman, J. J. & Solari, A. Comparing Three Groups. *Am Stat* **76**, 168–176 (2022).
117. Shafiq-ul-Hassan, M. *et al.* Intrinsic dependencies of <sc>CT</sc> radiomic features on voxel size and number of gray levels. *Med Phys* **44**, 1050–1062 (2017).
118. Welvaert, M. & Rosseel, Y. On the Definition of Signal-To-Noise Ratio and Contrast-To-Noise Ratio for fMRI Data. *PLoS One* **8**, e77089 (2013).
119. Alongi, P. *et al.* Radiomics analysis of 18F-Choline PET/CT in the prediction of disease outcome in high-risk prostate cancer: an explorative study on machine learning feature classification in 94 patients. *Eur Radiol* **31**, 4595–4605 (2021).
120. Raccagni, I. *et al.* [18F]FDG and [18F]FLT PET for the evaluation of response to neo-adjuvant chemotherapy in a model of triple negative breast cancer. *PLoS One* **13**, e0197754 (2018).
121. Laudicella, R. *et al.* [68Ga]DOTATOC PET/CT Radiomics to Predict the Response in GEP-NETs Undergoing [177Lu]DOTATOC PRRT: The “Theragnostics” Concept. *Cancers (Basel)* **14**, 984 (2022).
122. Pavone, A. M. *et al.* Biodistribution Assessment of a Novel 68Ga-Labeled Radiopharmaceutical in a Cancer Overexpressing CCK2R Mouse Model: Conventional and Radiomics Methods for Analysis. *Life* **14**, 409 (2024).
123. Tosato, M. *et al.* Toward novel sulphur-containing derivatives of tetraazacyclododecane: synthesis, acid–base properties, spectroscopic characterization, DFT calculations, and cadmium( <sc>ii</sc> ) complex formation in aqueous solution. *New Journal of Chemistry* **44**, 8337–8350 (2020).
124. Sharma, G. & Martin, J. MATLAB®: A Language for Parallel Computing. *Int J Parallel Program* **37**, 3–36 (2009).

125. Dogdas, B., Stout, D., Chatziioannou, A. F. & Leahy, R. M. Digimouse: a 3D whole body mouse atlas from CT and cryosection data. *Phys Med Biol* **52**, 577–587 (2007).
126. Yushkevich, P. A., Gao, Y. & Gerig, G. ITK-SNAP: An interactive tool for semi-automatic segmentation of multi-modality biomedical images. in *2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* 3342–3345 (IEEE, 2016). doi:10.1109/EMBC.2016.7591443.
127. Klein, S., Staring, M., Murphy, K., Viergever, M. A. & Pluim, J. elastix: A Toolbox for Intensity-Based Medical Image Registration. *IEEE Trans Med Imaging* **29**, 196–205 (2010).
128. Fedorov, A. *et al.* 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging* **30**, 1323–1341 (2012).
129. Baiker, M., Staring, M., Löwik, C. W. G. M., Reiber, J. H. C. & Lelieveldt, B. P. F. Automated Registration of Whole-Body Follow-Up MicroCT Data of Mice. in 516–523 (2011). doi:10.1007/978-3-642-23629-7\_63.
130. Stefano, A. *et al.* A fully automatic method for biological target volume segmentation of brain metastases. *Int J Imaging Syst Technol* **26**, 29–37 (2016).
131. Comelli, A., Stefano, A., Benfante, V. & Russo, G. Normal and Abnormal Tissue Classification in Positron Emission Tomography Oncological Studies. *Pattern Recognition and Image Analysis* **28**, 106–113 (2018).
132. Kokoska, S. & Nevison, C. Critical Values For The Studentized Range Distribution. in 64–66 (1989). doi:10.1007/978-1-4613-9629-1\_12.
133. Novak, D. *et al.* Radiolabelled CCK<sub>2</sub> R Antagonists Containing PEG Linkers: Design, Synthesis and Evaluation. *ChemMedChem* **16**, 155–163 (2021).
134. Aloj, L. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of <sup>111</sup>In-DTPAGlu-G-CCK8 for cholecystinin-B receptor imaging. *J Nucl Med* **45**, 485–94 (2004).
135. Agnello, L., Comelli, A., Ardizzone, E. & Vitabile, S. Unsupervised tissue classification of brain MR images for voxel-based morphometry analysis. *Int J Imaging Syst Technol* **26**, 136–150 (2016).
136. Dirnagl, U., Duda, G. N., Grainger, D. W., Reinke, P. & Roubenoff, R. Reproducibility, relevance and reliability as barriers to efficient and credible biomedical technology translation. *Adv Drug Deliv Rev* **182**, 114118 (2022).
137. Zhao, B. Understanding Sources of Variation to Improve the Reproducibility of Radiomics. *Front Oncol* **11**, (2021).
138. Soret, M., Bacharach, S. L. & Buvat, I. Partial-Volume Effect in PET Tumor Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **48**, 932–945 (2007).
139. Banna, G. L. *et al.* Predictive and Prognostic Value of Early Disease Progression by PET Evaluation in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* **92**, 39–47 (2017).
140. Sauter, A. W. *et al.* Targeting of the Cholecystinin-2 Receptor with the Minigastrin Analog <sup>177</sup>Lu-DOTA-PP-F11N: Does the Use of Protease Inhibitors Further Improve In Vivo Distribution? *Journal of Nuclear Medicine* **60**, 393–399 (2019).
141. Krisnawan, V. E., Stanley, J. A., Schwarz, J. K. & DeNardo, D. G. Tumor Microenvironment as a Regulator of Radiation Therapy: New Insights into Stromal-Mediated Radioresistance. *Cancers (Basel)* **12**, 2916 (2020).

142. Giaccone, P. *et al.* PET Images Atlas-Based Segmentation Performed in Native and in Template Space: A Radiomics Repeatability Study in Mouse Models. in *Image Analysis and Processing. ICIAP 2022 Workshops: ICIAP International Workshops, Lecce, Italy, May 23–27, 2022, Revised Selected Papers, Part I* 351–361 (2022). doi:10.1007/978-3-031-13321-3\_31.
143. Nahmias, C. & Wahl, L. M. Reproducibility of Standardized Uptake Value Measurements Determined by <sup>18</sup>F-FDG PET in Malignant Tumors. *Journal of Nuclear Medicine* **49**, 1804–1808 (2008).
144. Kinahan, P. E. & Fletcher, J. W. Positron Emission Tomography-Computed Tomography Standardized Uptake Values in Clinical Practice and Assessing Response to Therapy. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* **31**, 496–505 (2010).
145. Vaz, S. C. *et al.* The current role of nuclear medicine in breast cancer. *Br J Radiol* **96**, (2023).
146. Bodalal, Z., Trebeschi, S., Nguyen-Kim, T. D. L., Schats, W. & Beets-Tan, R. Radiogenomics: bridging imaging and genomics. *Abdominal Radiology* **44**, 1960–1984 (2019).
147. Tamal, M. Intensity threshold based solid tumour segmentation method for Positron Emission Tomography (PET) images: A review. *Heliyon* **6**, e05267 (2020).