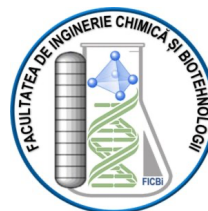




Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
Politehnica București
Școala Doctorală „Inginerie Chimică și Biotehnologii”
Domeniul de doctorat chimie



TEZĂ DE DOCTORAT

Metode de analiză a unor radiofarmaceutice

– *REZUMATUL EXTINS AL TEZEI DE DOCTORAT* –

Conducător de doctorat:

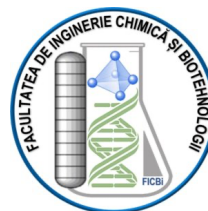
Prof. Dr. Ing. Alina Catrinel Ion

Doctorand:

Chim. Maria-Roxana CornoIU (Tudoroiu-CornoIU)



Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
Politehnica București
Școala Doctorală „Inginerie Chimică și Biotehnologii”
Domeniul de doctorat chimie



Nr. Decizie Senat.....din.....

TEZĂ DE DOCTORAT

Metode de analiză a unor radiofarmaceutice

– REZUMATUL EXTINS AL TEZEI DE DOCTORAT –

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Ing. Alina Catrinel Ion

Doctorand:

Chim. Maria-Roxana Cornoiu (Tudoroiu-Cornoiu)

COMISIA DE ÎNDRUMARE ȘI INTEGRITATE ACADEMICĂ

Conducător doctorat	Prof. Dr. Ing. Alina Catrinel Ion	U.N.S.T Politehnica București
Membru	Dr. CS III Dana Niculae	IFIN-HH, Măgurele
Membru	Prof. Dr. Doina Drăgănescu	U.M.F Carol Davila București
Membru	Ș.l.Dr. Ing. Ioana Diaconu	U.N.S.T Politehnica București

CUPRINS

INTRODUCERE.....	7
1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE CU PRIVIRE LA IMPORTANȚA UTILIZĂRII RADIOFARMACEUTICELOR ÎN MEDICINA NUCLEARĂ	9
2. METODE RADIO-CROMATOGRAFICE DE ANALIZĂ A COMPUȘILOR RADIOFARMACEUTICI	11
3. SINTEZA ȘI EVALUAREA COMPLECȘILOR DE ^{64}Cu : OBȚINEREA ȘI CONTROLUL DE CALITATE A RADIOFARMACEUTICELOR REZULTATE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR SOLIDE.....	13
3.1. EVALUAREA PARAMETRILOR DE SEPARARE CROMATOGRAFICĂ UTILIZAȚI PENTRU CONTROLUL DE CALITATE AL PEPTIDELOR MARCATE CU RADIOIZOTOPUL ^{64}Cu	13
3.1.1. Obținerea radioizotopului ^{64}Cu la ciclotronul TR-19 și procesarea radiochimică a soluției $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$	13
3.1.2. Procesul de radiomarcare a peptidelor utilizând radioizotopul ^{64}Cu	14
3.1.3. Controlul de calitate al peptidelor radiomarcate	14
3.1.4. Rezultate și discuții	14
3.1.4.1. Obținerea și utilizarea soluției de $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$	14
3.1.4.2. Dezvoltarea și optimizarea metodei cromatografice radio-HPLC	15
3.1.4.3. Analiza radio-TLC a radiofarmaceuticelor sintetizate. Influența fazei mobile în cromatografia de lichide	17
3.1.4.4. Controlul de calitate al neuropeptidelor radiomarcate $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NMN}$ și $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NT}(8-13)$	18
3.1.4.5. Studiu de stabilitate	18
3.2. OPTIMIZAREA ȘI VALIDAREA METODEI CROMATOGRAFICE GC-HS PENTRU IDENTIFICAREA SOLVENȚILOR REZIDUALI ÎN PRODUSE RADIOFARMACEUTICE...	19
3.2.1. Introducere	19
3.2.2. Metoda GC-HS	19
3.2.3. Rezultate și discuții	19
3.2.3.1. Optimizarea metodei GC-HS	19
3.2.3.2. Caracterizarea metodei	20
3.2.3.3. Testarea sistemului	20
4. SINTEZA ȘI EVALUAREA COMPLECȘILOR DE ^{89}Zr : OBȚINEREA ȘI CONTROLUL DE CALITATE A RADIOFARMACEUTICELOR REZULTATE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR SOLIDE.....	21
4.1. Producerea Zirconului-89 și procesarea radiochimică a țintei iradiată	21

4.2.	Reacția de conjugare a chelatorului p-SCN-Bz-DFO cu mAb	21
4.3.	Purificarea conjugării p-SCN-Bz-DFO-mAb	22
4.4.	Radiomarcarea cu ^{89}Zr a conjugării p-SCN-Bz-DFO-mAb	22
4.5.	Caracterizarea complexelor de $^{89}\text{Zr(IV)}$ sintetizați	22
4.6.	Rezultate și discuții	23
4.6.1.	Producția Zirconului-89, procesarea post-iradiere și caracterizarea fizico-chimică a soluției de ^{89}Zr -oxalat	23
4.6.2.	Adaptarea și optimizarea metodei radio-TLC pentru analiza compușilor radiomarcați cu ^{89}Zr	24
4.6.3.	Evaluarea radiomarcării imunoconjugatelor cu ^{89}Zr -oxalat	25
4.6.4.	Studiu de stabilitate	28
5.	EVALUAREA PROCESELOR DE RADIOMARCARE ȘI CARACTERIZARE A RADIOFARMACEUTICELOR PE BAZĂ DE ^{64}Cu ȘI ^{89}Zr, OBTINUTE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR LICHIDE	29
5.1.	Producerea radioizotopilor ^{64}Cu și ^{89}Zr din ținte lichide: procesare și caracterizare post-iradiere	29
5.2.	Radiomarcarea neuropeptidelor cu $^{64}\text{Cu(II)}$ rezultat prin iradierea LT	29
5.3.	Caracterizarea neuropeptidelor marcate utilizând soluția de ^{64}Cu - CuCl_2 obținută prin iradierea LT	30
5.4.	Marcarea vectorilor specifici receptorului HER2 cu radioizotopul ^{89}Zr obținut prin iradierea LT	30
5.5.	Caracterizarea complexelor de $^{89}\text{Zr(IV)}$ sintetizate prin iradierea LT	31
5.6.	Rezultate și discuții	31
5.6.1.	Producția și caracterizarea soluției de ^{64}Cu - CuCl_2	31
5.6.2.	Radiomarcarea neuropeptidelor cu ^{64}Cu - CuCl_2 obținută prin LT	32
5.6.3.	Producția și caracterizarea soluției de ^{89}Zr -oxalat	33
5.6.4.	Radiomarcarea vectorilor de țintire specifică Trastuzumab și affibody anti-HER2 cu ^{89}Zr -oxalat obținut prin iradierea LT	33
	CONCLUZII GENERALE	34
	CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR	35
	DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN CADRUL PREZENTEI TEZE DE DOCTORAT	39

INTRODUCERE

De-a lungul anilor, radiofarmaceuticele au constituit un pilon fundamental în dezvoltarea medicinei nucleare, devenind un instrument indispensabil în diagnosticarea, monitorizarea și tratamentul personalizat al afecțiunilor complexe, în special a celor oncologice și cardiovasculare.

^{64}Cu și ^{89}Zr sunt doi dintre radioizotopii medicali care s-au făcut remarcăți în cercetarea oncologică datorită proprietăților lor fizico-chimice favorabile. ^{64}Cu , având un timp de înjumătățire de 12.7 ore, este un radioizotop theranostic, care poate fi utilizat atât pentru diagnosticare (datorită emisiilor β^+), cât și pentru terapie (datorită emisiilor β^- și electronilor Auger), permițând monitorizarea în timp real a răspunsului pacientului la tratament și ajustarea acestuia. În schimb, ^{89}Zr datorită timpului de înjumătățire de 78.4 ore, este ideal pentru generarea de imagini de înaltă rezoluție pe perioade extinse, facilitând urmărirea proceselor biologice și patologice pe termen lung. Această caracteristică îl face deosebit de util în studii de biodistribuție și monitorizare detaliată a terapiei.

Pentru a asigura eficiența și siguranța administrării compușilor radiofarmaceutici, dezvoltarea unor metode analitice riguroase este crucială. Tehnicile cromatografice, precum radio-cromatografia de lichide de înaltă performanță (radio-HPLC) și radio-cromatografia de lichide în strat subțire (radio-TLC), sunt specifice analizării compușilor radiomarcați, asigurând separarea, identificarea și cuantificarea acestora într-un mod precis și fiabil.

Scopul acestei teze de doctorat constă în dezvoltarea și optimizarea metodelor de sinteză și analiză a radiofarmaceuticelor, cu un accent deosebit pe utilizarea radioizotopilor ^{64}Cu și ^{89}Zr . Obiectivele specifice ale cercetării includ: (I) investigarea caracteristicilor fundamentale și a etapelor de dezvoltare a radiofarmaceuticelor, (II) dezvoltarea și optimizarea metodelor cromatografice pentru analiza acestora, precum și (III) testarea metodelor analitice pentru a asigura reproductibilitatea și acuratețea rezultatelor. O contribuție originală a acestei lucrări constă în marcarea peptidelor, a anticorpilor monoclonali și fragmentelor de anticorpi cu radioizotopii ^{64}Cu și ^{89}Zr , urmată de evaluarea metodelor analitice optimizate care să asigure eficiența și siguranța lor în aplicațiile medicinei nucleare.

Teza este structurată în două părți principale: partea teoretică (două capitole) și partea experimentală (trei capitole), care include contribuțiile originale aduse prezentului studiu.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze nu doar că îmbunătățesc înțelegerea proceselor de radiomarcare și analiza compușilor radiomarcați, dar totodată deschid noi perspective pentru aplicarea radiofarmaceuticelor în diagnosticul și tratamentul bolilor oncologice.

1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE CU PRIVIRE LA IMPORTANȚA UTILIZĂRII RADIOFARMACEUTICELOR ÎN MEDICINA NUCLEARĂ

Radiofarmaceuticele (RFM) reprezintă o clasă specială de formulări farmaceutice în care un radioizotop atașat la un fragment farmaceutic este administrat prin inhalare, pe cale orală, intravenoasă sau interstițială pentru diagnosticarea și/sau terapia ținută a diferitelor boli. Un radiofarmaceutic este format în general, fie dintr-un radioizotop de sine stătător (^{131}I), fie dintr-un radioizotop legat de o moleculă biologic activă (anorganică sau organică) responsabilă de transportul acestuia la anumite organe, țesuturi sau celule țintă [1]. Selectarea radioizotopului depinde de mai mulți factori, printre care se numără tipul de radiații emise, energiile acestora, scopul pentru care este folosit, metodele de producție, timpul de înjumătățire, tipul și dimensiunea tumorii vizate, densitatea țintei, precum și eterogenitatea acesteia. Pentru diagnostic sunt necesari radioizotopi care emit direct radiații γ sau care emit indirect fotoni cu energie foarte mare, ca urmare a reacției de anihilare dintre un pozitron și un electron din vecinătate, în timp ce, pentru terapia ținută sunt aleși cu atenție radioizotopi emițători de radiații α , β^- sau electroni Auger care contribuie la deteriorarea și distrugerea în timp a celulelor tumorale [1]. Majoritatea radioizotopilor de uz medical sunt produși cu ajutorul reactoarelor nucleare sau acceleratoarelor de particule de tip ciclotron, însă există și alternativa de producere prin utilizarea generatorilor. În general, radioizotopii bogați în neutroni, cum ar fi $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{60}Co , ^{192}Ir , ^{131}I , ^{166}Ho , ^{177}Lu , sunt produși în reactoare fie prin procese de fisiune, fie prin captură de neutroni și au timpi de înjumătățire relativ mai lungi. Pe de altă parte, radioizotopii cu deficit de neutroni, cum ar fi ^{18}F , ^{201}Tl , ^{123}I , ^{67}Ga , ^{64}Cu sunt produși în mod obișnuit la ciclotron prin reacții nucleare de tip (p, n) și (p, α) și au timpi de înjumătățire relativ scurți [2].

○ Obținerea la ciclotron

Pentru această metodă de obținere, particulele încărcate (protonii, deuteronii și particulele α) sunt accelerate circular de un câmp electric oscilant de înaltă frecvență și ghidate de un câmp magnetic perpendicular. Sursa de ioni se află în centrul ciclotronului, mișcarea acestora desfășurându-se pe o traiectorie circulară din ce în ce mai mare, pe măsură ce energia lor crește, urmând o cale spiralată spre exterior. Când ionii accelerați

ating energia dorită, aceștia sunt îndreptați spre o fereastră de extragere, la o rază aferentă energiei necesare. Fasciculul extras este ulterior direcționat spre o țintă specifică, unde are loc reacția nucleară pentru obținerea radioizotopului de interes [3]. Radioizotopii emițători de pozitroni de interes medical sunt produși eficient prin bombardarea izotopilor stabili cu fascicule de protoni cu energii de până la 18-19MeV, care pot fi generate la un ciclotron de dimensiuni mici special proiectat pentru producerea de emițători de pozitroni pentru PET (*Positron Emission Tomography*). În prezent, toate ciclotroanele mici disponibile pentru producerea de izotopi sunt acceleratoare de ioni negativi care transformă H^- în protoni prin striparea ionilor [4].

Radioizotopul Cupru-64

Radioizotopul ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12.7$ ore) prezintă caracteristici de dezintegrare care permit utilizarea lui atât ca radiotrasor în imagistica PET (β^+), cât și ca agent terapeutic în radioterapia țintită a cancerului (β^- și electroni Auger) [5]. Cu^{2+} formează combinații complexe cu diferite tipuri de chelatori care pot fi legați de peptide, anticorpi, proteine sau nanoparticule [5]. Radiofarmaceuticele care conțin ^{64}Cu pot fi utilizate pentru diagnosticarea și tratarea diferitelor tipuri de cancer, precum prostată, glioblastom, melanom, cancere de sân și, de asemenea, pentru diverse boli printre care se numără arterioscleroza, boala Alzheimer etc.

Radioizotopul Zirconiu-89

Zirconiul-89 este un radioizotop cu un timp de înjumătățire de ~ 78.4 ore, care conform schemei de dezintegrare, prezintă un nivel scăzut de emisie de pozitroni (23% β^+), comparativ cu nivelul de captură de electroni (77%). De obicei, ^{89}Zr este produs folosind un ciclotron biomedical prin reacția $^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$ și este izolat și purificat utilizând rășini funcționalizate cu hidroxamat [5]. În sistemele biologice, Zirconiul-89 există în stare de oxidare +4 și poate forma complecși cu numere de coordinare de până la 8. Datorită timpului de înjumătățire favorabil este perfect compatibil cu timpul necesar obținerii unor imagini PET cu rezoluție spațială bună, utilizând anticorpi monoclonali (mAb) radiomarcați [5]. Cel mai utilizat chelator pentru marcarea mAb cu ^{89}Zr este deferroxamina (DFO), care coordonează Zr^{4+} în mod hexadentat, marcarea realizându-se printr-o legătură amidică.

PET este cunoscută drept una dintre cele mai utilizate tehnici de imagistică moleculară, care poate oferi imagini unice non-invazive și *in vivo* benefice pentru studiul procesului biologic și biochimic al subiecților în timpul experimentelor cu modele

animale [6]. Principiul de bază pentru PET presupune detectarea în coincidență a unei perechi de cuante gamma generate în urma procesului de anihilare a pozitronilor emiși de radiotrasorul injectat în corpul pacientului cu electronii din vecinătate.

2. METODE RADIO-CROMATOGRAFICE DE ANALIZĂ A COMPUȘILOR RADIOFARMACEUTICI

Metodele radio-cromatografice sunt esențiale pentru analiza compușilor radioactivi, oferind informații critice despre puritate, stabilitate și biodistribuție, fiind folosite în domenii diverse (monitorizarea poluanților din mediu, dezvoltarea de medicamente inovative, analize toxicologice detaliate și evaluarea siguranței chimice) [7]. Aceste metode presupun utilizarea unor tehnici, precum cromatografia de gaze (GC), cromatografia pe hârtie (PC), cromatografia în strat subțire (TLC) și cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), adaptate nevoilor speciale ale radiochimiei [8]. Optimizarea și validarea acestora este esențială pentru asigurarea calității produselor [9]. Detectorii utilizați sunt de mai multe tipuri, precum detectori cu ionizare (camere de ionizare, detectori proporționali, detectori Geiger-Müller), detectori cu scintilație, autoradiografia și detectori semiconductori [7], [10]. Aceștia asigură o sensibilitate și specificitate ridicate, contribuind la progresul științific și la protejarea sănătății publice și a mediului înconjurător [11].

o Radio-cromatografia de lichide de înaltă performanță (radio-HPLC)

Radio-HPLC este o tehnică analitică complexă, cu o sensibilitate ridicată, utilizată pentru separarea, identificarea și dozarea compușilor radiomarcați din diverse probe. Această tehnică combină principiile HPLC cu tehnicile de detecție specifice radiochimice, permițând determinarea atât a impurităților chimice, cât și radiochimice [12].

Pentru a analiza o probă radioactivă folosind un radio-HPLC, un volum mic din proba analizată este introdus în fuxul fazei mobile. Pompele de înaltă presiune împing faza mobilă prin coloană la un debit specificat (mL/min), transportând astfel proba. Pe măsură ce analitul trece prin coloana cromatografică, acesta este încetinit de prezența unor interacțiuni chimice și fizice cu faza staționară [13]. Sistemele radio-HPLC implică utilizarea a doi detectori legați în serie (I) un detector UV-Vis, electrochimic sau detector cu indice de refracție – folosit pentru identificarea speciilor chimice [13]; (II) un detector

radiochimic (cu scintilație lichidă/solidă sau semiconductor) – folosit pentru detectarea speciilor radioactive, precum sunt detectorii [7], [13].

- *Radio-cromatografia de lichide în strat subțire (radio-TLC)*

TLC (Thin-Layer Chromatography) este o tehnică analitică de bază, utilizată pe scară largă în diferite domenii pentru separarea și identificarea compușilor dintr-un amestec [14]. Varianta sa adaptată pentru detecția compușilor radioactivi, cunoscută sub numele de radio-TLC, reprezintă un instrument cheie în controlul calității produselor radiofarmaceutice. Această metodă se bazează pe separarea compușilor radiomarcați prin migrarea lor pe o placă TLC (fază staționară) sub influența unui solvent (fază mobilă), utilizând diferențele de polaritate și solubilitate dintre acești compuși [13]. De obicei, se ține seama de trei aspecte importante atunci când se alege faza mobilă, și anume: solubilitatea, afinitatea și rezoluția. Pentru citirea plăci TLC se utilizează un scanner echipat cu un detector specific, precum este cel cu scintilație (NaI(Tl)), ideal pentru radioizotopii emițători gamma, sau un detector beta, potrivit pentru particulele β . Detectorul captează semnalele radiațiilor ionizante și le transmite către un integrator electronic, care filtrează, amplifică și procesează datele, generând un profil cromatografic precis ce indică distribuția compușilor radiomarcați. Sistemul include un mecanism automat de scanare, care deplasează placa TLC vertical sub detector, asigurând analiza completă și detaliată a întregii suprafețe în timpul unei singure rulări [13], [15] Detectorul este prevăzut cu colimatoare interschimbabile, pentru diferite energii ale radiațiilor, având scopul de a minimiza radiațiile din regiunile adiacente. Datele obținute sunt procesate de un program software dedicate, care permite identificarea compușilor și cuantificarea radioactivității fiecăruia.

- *Cromatografia de gaze (GC)*

GC (Gas Chromatography) a fost una dintre primele tehnici de separare cromatografică dezvoltată de Martin și James în 1952, ocupând în prezent un loc preferențial în ceea ce privește identificarea și separarea analiților dintr-o probă. Această tehnică prezintă o serie de avantaje ce o fac atât de populară în domeniul chimiei analitice, printre care se numără sensibilitatea, selectivitatea și rezoluția foarte ridicate, precum și o bună acuratețe și precizie, facilitând o gamă largă de concentrații la care se poate lucra [16].

Probele analizate prin cromatografie de gaze pot fi în stare lichidă sau gazoasă. În cazul unei probe lichide, aceasta este introdusă în cromatograf cu ajutorul sistemului de

injecție și transportată prin coloana cromatografică încălzită, unde este vaporizată și componentele sunt reținute selectiv de către faza staționară. Pentru eluarea acestora de pe coloană este necesară trecerea unui gaz inert (N_2 , He) prin aceasta. Solubilitatea componentelor din probă trebuie să fie diferită pentru a avea loc separarea. În cazul în care componentele nu sunt suficient de volatile, este necesară scăderea temperaturii lor de fierbere prin derivatizarea grupelor chimice. În ceea ce privește alimentarea cromatografului cu gaz inert, natura acestui gaz trebuie aleasă în funcție de tipul de detector utilizat, care la rândul lui depinde de clasa de compuși analizați. Depozitarea gazelor de înaltă puritate se face în butelii speciale care sunt prevăzute cu reductoare de presiune. Acest reductor are rolul de a asigura un nivel de presiune cuprins între 1.5-3 atm. Pe traseul gazului inert către cromatograf este prezentă o sită moleculară pentru a se putea evita pătrunderea vaporilor de apă și a eventualelor impurități în sistem [17].

3. SINTEZA ȘI EVALUAREA COMPLECȘILOR DE ^{64}Cu : OBTINEREA ȘI CONTROLUL DE CALITATE A RADIOFARMACEUTICELOR REZULTATE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR SOLIDE

3.1. EVALUAREA PARAMETRILOR DE SEPARARE

CROMATOGRAFICĂ UTILIZAȚI PENTRU CONTROLUL DE CALITATE AL PEPTIDELOR MARCATE CU RADIOIZOTOPUL ^{64}Cu

3.1.1. Obținerea radioizotopului ^{64}Cu la ciclotronul TR-19 și procesarea radiochimică a soluției $^{64}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$

Producerea radioizotopului ^{64}Cu prin reacția nucleară $^{64}\text{Ni} (p, n) ^{64}\text{Cu}$, a fost efectuată în cadrul Centrului de Cercetare Radiofarmaceutică folosind ciclotronul TR-19 (ACSI, Canada) și un sistem automat de post-procesare a țintelor solide (Alceo 3.0 COMECER, Italia). Procesul a implicat iradierea cu protoni a unei ținte solide (ST), de ^{64}Ni îmbogățit electrodepusă, urmată imediat de un proces automatizat de dizolvare și purificare. Au fost folosite diferite concentrații de HCl pentru a separa ionii de cupru de impuritățile de ^{64}Ni și cobalt (^{56}Co , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{61}Co), utilizând rășina schimbătoare de ioni AG1-X8. Soluția finală de $^{64}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$ a fost obținută prin eluare cu HCl 0.5M [18].

3.1.2. Procesul de radiomarcare a peptidelor utilizând radioizotopul ^{64}Cu

Radiomarcarea peptidelor a fost efectuată într-un vas de reacție la temperatura de 95°C . 1 mL soluție de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ cu o concentrație radioactivă cuprinsă între 250-1500 MBq/mL și $\text{pH}=3.8-4.0$ (tamponat cu acetat de amoniu), a fost adăugat peste 20 nmoli de peptidă dizolvată anterior în 50 μL apă ultrapură. Reacția a avut loc pe baie de apă timp de 25 minute sub agitare continuă la 200 rpm [19]. După finalizarea reacției de marcăre, soluția a fost purificată utilizând cartușul StrataTM-X 33 μm RP. Peptida marcată radioactiv a fost eluată de pe cartuș cu 1 mL de etanol de calitate analitică. Ulterior, pentru îndepărtarea excesului de etanol, soluția rezultată a fost evaporată la 80°C până aproape de sec. După evaporare, peptida radiomarcată a fost recuperată cu 1 mL soluție salină (0.9% NaCl), iar pH -ul a fost verificat și ajustat cu NaOH 1M (dacă este necesar) pentru a avea valoarea cuprinsă între 7.0-7.4 [18], [19].

3.1.3. Controlul de calitate al peptidelor radiomarcate

Parametrii urmăriți în controlul de calitate al preparatelor radiofarmaceutice sunt: aspectul probei, puritatea radiochimică (PRC) și radionuclidică (PRN), timpul de înjumătățire, pH -ul, sterilitatea, pirogenitatea și analiza solvenților reziduali. Toți parametrii menționați au fost evaluați în conformitate cu Farmacopeea Europeană, deoarece radiofarmaceuticele sintetizate și descrise în această lucrare sunt destinate aplicațiilor de imagistică PET cu administrare parenterală [18].

3.1.4. Rezultate și discuții

3.1.4.1. Obținerea și utilizarea soluției de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$

În urma iradierii țintei solide de ^{64}Ni îmbogățit și a procesării post-iradiere a acesteia, a fost obținută o soluție apoasă sub formă de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ cu o activitate cuprinsă între 10-16 GBq, activitate corectată la EOB (sfârșitul iradierii) [20]. Această soluție a fost supusă unui control riguros al calității în scopul asigurării compatibilității acesteia în aplicații biologice și radiobiologice. Caracterizarea detaliată a soluției de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a oferit informații clare și concise cu privire la următoarele specificații: puritate radiochimică de 100%, puritate radionuclidică de peste 99.99% și un timp de înjumătățire de 12.43 ± 0.2 h. Pe baza acestor verificări, soluția de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a fost utilizată în studii *in vitro*, pentru a putea evalua comportamentul ^{64}Cu la nivelul diferitelor linii celulare,

precum și în experimente de radiomarcare cu peptide, anticorpi monoclonali și nanobody, care au inclus studii de stabilitate atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

Procesul de radiomarcare al conjugării DOTA-peptidă cu radioizotopul ^{64}Cu

Soluția de ^{64}Cu]CuCl₂ a fost utilizată pentru radiomarcarea a șase peptide derivatizate cu chelatorul DOTA, și anume DOTA-NMN, DOTA-NT(8-13), DOTA-PEG(4)-BBN(7-14), DOTA-NOC, DOTA-NMB și DOTA-cRGDmon. Pentru DOTA-NMN și DOTA-NT(8-13), soluția de ^{64}Cu]CuCl₂ utilizată a avut o concentrație ≥ 750 MBq/mL [19], în timp ce pentru restul peptidelor aceasta a variat între 250-1500 MBq/mL. Parametrii de marcăre, incluzând volumul soluției de ^{64}Cu]CuCl₂, temperatura, pH-ul, cantitatea de peptidă utilizată și timpul de reacție, au fost menținute constanți pentru toate peptidele, iar detaliile specifice pentru DOTA-NMN și DOTA-NT(8-13) sunt prezentate în Tabelul 1.

Este de precizat faptul că dintre cele șase peptide utilizate în procesul de radiomarcare, doar două (DOTA-NMN și DOTA-NT(8-13)) au fost utilizate pentru studii suplimentare ce includ controlul de calitate și studii de stabilitate *in vitro*.

Tabel 1. Parametrii de radiomarcare pentru experimentele ST [19]

Parametrii	Peptidă marcată	
	DOTA-NMN	DOTA-NT(8-13)
Cantitate peptidă (nmoli)	20	
pH marcăre	3.9 ± 0.1	
Volum soluție ^{64}Cu]CuCl ₂ (mL)	1.00 ± 0.2	
Activitatea ^{64}Cu]CuCl ₂ (MBq)	1340.4 ± 70.1	
Temperatură (°C)	95	
Timp de reacție (min)	25	
Randament marcăre (%)	78.15 ± 3.12	67.04 ± 2.68

3.1.4.2. Dezvoltarea și optimizarea metodei cromatografice radio-HPLC

Au fost comparate două coloane cromatografice SunFire C18 (150 × 4.6 mm, 3.5 μm, 100 Å, 16% C) și Hypersil GOLD (150 × 4.6 mm, 5 μm, 175 Å, 12% C). Faza mobilă utilizată a fost formată dintr-un amestec binar de solvenți: solvent A – apă cu 0.1% TFA și solvent B – acetonitril cu 0.1% TFA. Gradientul optim aplicat a fost: 0.01 min/ 95% A/ 5% B, 2 min/ 99% A/ 1% B, 15 min/ 30% A/ 70% B, 20 min/ 99% A/ 1% B, 25 min/ 95% A/ 5% B. Acest gradient a asigurat eliberarea treptată și controlată a eluentului prin

coloană, asigurând astfel o rezoluție adecvată între componentele strâns eluate [18]. Pentru optimizarea metodei, au fost ajustați parametri, precum temperatura coloanei și debitul. Analiza utilizând coloana SunFire C18 a fost realizată la debite ale fazei mobile de 0.5 și 1.0 mL/min și temperaturi ale coloanei de 30°C și 35°C (Figura 1) [18].

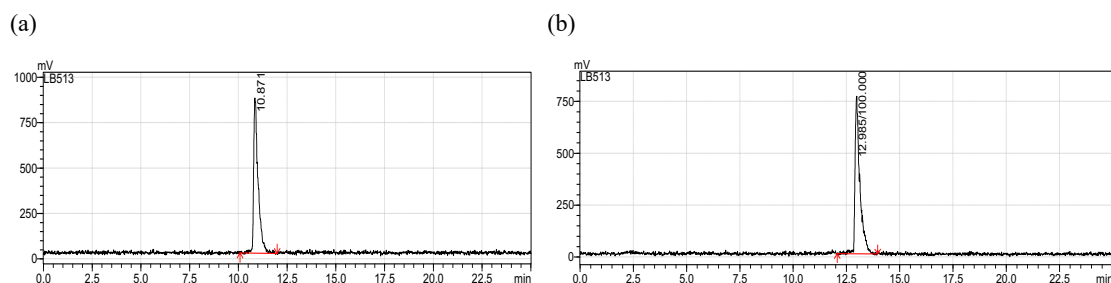


Figura 1. Evaluarea influenței debitului asupra formei peak-ului, simetriei și timpului de retenție: (a) debit de 1 mL/min și (b) debit de 0.5 mL/min, cu temperatura menținută constantă la 35 °C

În urma modificării temperaturii coloanei, diferența între valorile timpilor de retenție obținute la 35 °C și cele obținute la 30 °C a fost mai mică de 1% (Figurile 1 și 2). Această mică variație sugerează că metoda propusă este robustă, demonstrând stabilitatea și rezistența la schimbări de temperatură. Metoda asigură rezultate fiabile și precise. Timpul total de analiză pentru metoda utilizată a fost de 25 minute, ceea ce permite evaluarea probelor într-un interval de timp scurt și bine definit [18].

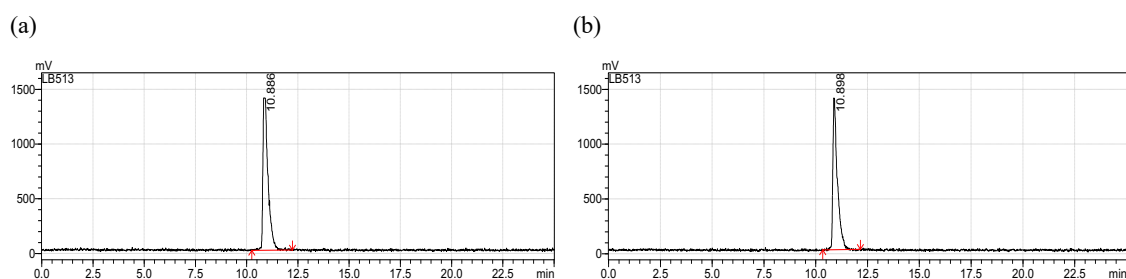


Figura 1. Evaluarea influenței temperaturii coloanei cromatografice asupra analizei: (a) 35 °C și (b) 30 °C, menținând debitul constant la 1 mL/min

Pentru a evalua performanța metodei, au fost selectate și analizate patru peptide radiomarcate ([⁶⁴Cu]Cu-DOTA-NMB, [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14), [⁶⁴Cu]-DOTA-NOC și [⁶⁴Cu]-DOTA-cRGDmonomer), conform metodei descrise anterior. În Tabelul 2, sunt prezentate valorile purității radiochimice acestea.

Tabel 2. Valorile PRC ale peptidelor radiomarcate, determinate prin radio-HPLC

Peptidă radiomarcată	Puritate radiochimică (%)
[⁶⁴ Cu]Cu-DOTA-NMB	100%
[⁶⁴ Cu]Cu-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)	99.99%

[⁶⁴ Cu]Cu-DOTA-NOC	95.94%
[⁶⁴ Cu]Cu-DOTA-cRGDmonomer	92.67%

3.1.4.3. Analiza radio-TLC a radiofarmaceuticelor sintetizate. Influența fazei mobile în cromatografia de lichide

Au fost comparate două faze mobile cu compoziții și caracteristici chimice semnificativ diferite pentru analiza [⁶⁴Cu]CuCl₂, [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-NMB și [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14). Analizele radio-TLC au fost efectuate utilizând drept fază staționară plăcuțe de silicagel pe suport de aluminiu. Aceste plăcuțe au fost scanate cu ajutorul unui detector de germanat de bismut (BGO), prevăzut cu colimatori interschimbabili, adecvați pentru diferite intervale de energie. Modificările valorilor R_f au fost monitorizate cu atenție pentru optimizarea procesului de separare și identificarea speciilor chimice. Faza mobilă F1 (timp migrare 30 minute) a constatat într-un amestec de solvenți format din metanol și acetat de amoniu (concentrație de 1 M), în raport de 7:3 (vol/vol). În timp ce, faza mobilă F2 (timp migrare 15 minute) a fost formată dintr-o soluție de citrat de sodiu 0.1 M. Cromatogramele și rapoartele generate în urma scanărilor radio-TLC sunt prezentate în Figura 3.

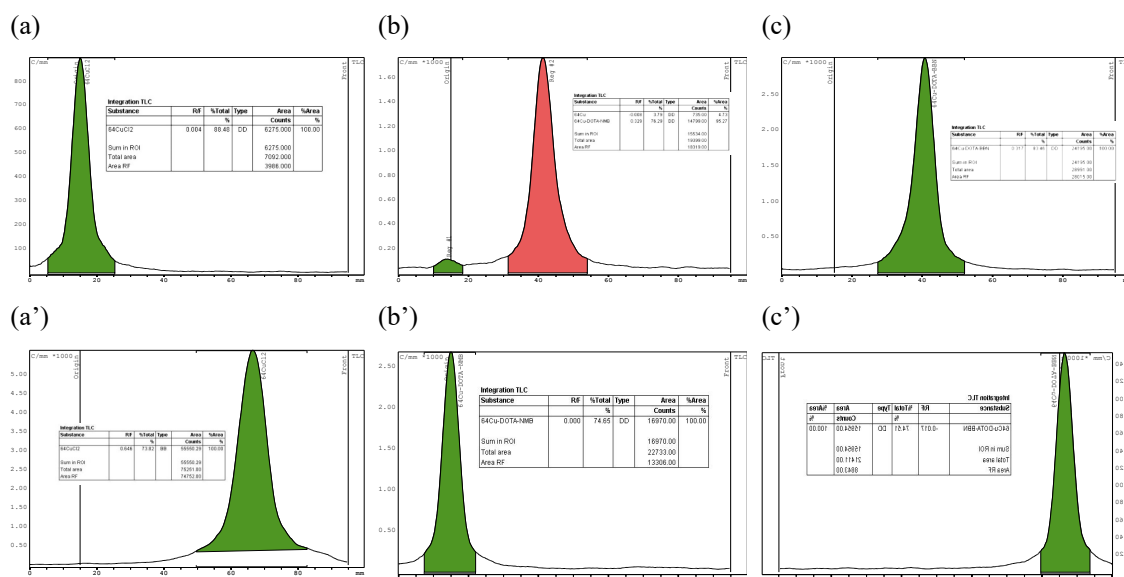


Figura 3. Cromatogramele radio-TLC pentru (a) [⁶⁴Cu]CuCl₂, (b) [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-NMB și (c) [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) în F1 și (a'), (b'), (c') în F2

Peptidele radiomarcate au prezentat o afinitate crescută pentru faza staționară atunci când a fost utilizată faza mobilă F2. Analizele radio-TLC au demonstrat că

puritatea radiochimică a compușilor analizați a fost mai mare de 95%, rezultat confirmat și de radio-HPLC. Acest lucru subliniază consistența și acuratețea metodelor dezvoltate.

3.1.4.4. Controlul de calitate al neuropeptidelor radiomarcate [^{64}Cu]Cu-DOTA-NMN și [^{64}Cu]Cu-DOTA-NT(8-13)

În cadrul acestui studiu, a fost realizată o evaluare detaliată a calității compușilor [^{64}Cu]Cu-DOTA-NMN și [^{64}Cu]Cu-DOTA-NT(8-13), cu scopul de a testa și compara conformitatea acestora cu standardele stricte prevăzute de Farmacopeea Europeană, pentru radiofarmaceuticele administrate sub formă de soluții injectabile (Tabel 3) [18].

Tabel 3. Rezultatele controlului de calitate a compușilor radiomarcați cu ^{64}Cu [18]

Test	Criterii de acceptare	[^{64}Cu]Cu-DOTA-NMN	[^{64}Cu]Cu-DOTA-NT(8-13)
Aspect	Clară, incoloră	☑	☑
pH	4.0-8.0	7.5	7.5
Identitate radionuclidică ($T_{1/2}$)	$T_{1/2} = 12.7$ h ($\pm 10\%$), 24h EOB	12.43 h	12.81 h
Identitate radionuclidică	511 $\pm$ 1 keV	☑	☑
Puritate radionuclidică	> 99.99 % (spectru γ) 24h EOB	☑	☑
Puritate radiochimică	$\geq 95\%$ (radio-TLC)	100 %	100 %
	$\geq 95\%$ (radio-HPLC)	100 %	100 %
Solvenți reziduali	Etanol ≤ 2.5 g/adm.	☑	☑
Endotoxine	≤ 175 EU/mL	☑	☑

3.1.4.5. Studiu de stabilitate

Stabilitatea peptidelor a fost evaluată prin radio-HPLC pe o perioadă de timp de 72 ore după finalizarea proceselor de radiomarcare și purificare. Pentru a evalua stabilitatea purității radiochimice în timp, au fost prelevate patru probe din aceeași fiolă (soluție finală), fiecare fiind injectată la intervale diferite de timp din momentul finalizării sintezei (Figura 4) [18].

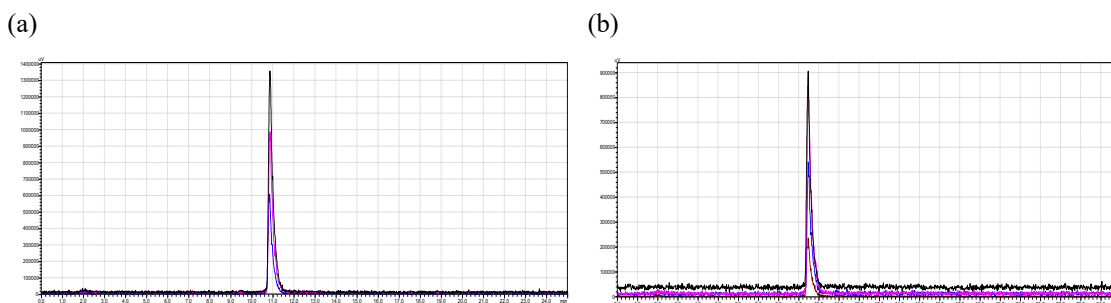


Figura 4. Studiul de stabilitate al radiofarmaceuticelor (a) $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NMN}$ și (b) $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NT(8-13)}$

3.2. OPTIMIZAREA ȘI VALIDAREA METODEI CROMATOGRAFICE GC-HS PENTRU IDENTIFICAREA SOLVENȚILOR REZIDUALI ÎN PRODUSE RADIOFARMACEUTICE

3.2.1. Introducere

Acest studiu își propune să optimizeze și să valideze o metodă analitică îmbunătățită de cromatografie de gaze ce utilizează un detector cu ionizare în flacără (FID) și un sistem de injecție de tip Headspace (HS), pentru cuantificarea nivelului de solvenți reziduali utilizați frecvent în sinteza radiofarmaceuticelor, și anume: metanol, etanol, izopropanol, acetonitril și acetonă [21].

3.2.2. Metoda GC-HS

Evaluarea solvenților reziduali din complexii de ^{64}Cu , a fost efectuată utilizând un cromatograf de gaze, GC Agilent 7890A echipat cu un detector FID, un sistem de injecție Headspace 7697A și un autosampler ALS G4513A. Pentru separarea cromatografică, a fost utilizată o coloană capilară de silice topită (6% poli[(cianopropil)-(fenil)] siloxan și 94% poli(dimetil) siloxan) cu dimensiunile de $30\text{ m} \times 0.53\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$ (Agilent J&W DB-624) [22]. Software-ul OpenLab CDS (Agilent Technologies Inc., SUA) a fost folosit pentru a efectua controlul sistemului, achiziția și procesarea datelor [23].

3.2.3. Rezultate și discuții

3.2.3.1. Optimizarea metodei GC-HS

Analiza solvenților reziduali și implicit caracterizarea metodei descrise în acest studiu au fost realizate în urma adaptării și optimizării anumitor parametri ai metodei în

concordanță cu necesitățile actuale, pornind de la munca noastră raportată anterior și condițiile prevăzute de Ph.Eur (Tabel 4) [23].

Tabel 4. Parametrii metodei GC-HS utilizați pentru analiza solvenților reziduali [23]

	Parametrii setați	Ph.Eur. [24]	Inițiali [22], [25]	Optimizați
GC	Gaz purtător	He		
	Raport de scindare	5:1	15:1	20:1
	Debit de gaz (mL/min)	-	48	33
	Presiune (psi)	-	2.27	7.95
	Temperatură cuptor (°C)	40-240	40-100	35-85
	Temperatură FID (°C)	250	250	300
	Timp de analiză (min)	35	7	7
HS	Temperatura echilibrare(°C)	80 -105	105	100
	Timp echilibrare (min)	45-60	2	3
	Temperatura transfer (°C)	80-110	110	100
	Durata injectării (min)	-	0.2	0.5

3.2.3.2. Caracterizarea metodei

Metoda propusă oferă o soluție rapidă pentru determinarea solvenților, cu un timp de analiză de doar 7 minute. Toate seriile de radiofarmaceutice testate au respectat standardele de acceptare, iar conținutul de solvenți reziduali a fost mai mic decât limitele admise, confirmând aplicabilitatea și fiabilitatea metodei. Această optimizare este extrem de importantă pentru aplicațiile în domeniul radiofarmaceutic, unde rapiditatea și acuratețea metodei sunt cruciale. Prin urmare, în cadrul acest studiu a fost optimizată, validată și implementată o metodă simplă, fiabilă și eficientă de GC-HS pentru determinarea simultană a cinci solvenți reziduali (metanol, etanol, acetonă, izopropanol și acetonitril) din produsele radiofarmaceutice [23].

3.2.3.3. Testarea sistemului

În cadrul testării sistemului, aceasta a fost utilizată pentru identificarea și cuantificarea solvenților reziduali din proba de [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-NT, cu etanol ca solvent de interes. Comparativ cu metoda anterioară, această abordare permite observarea mai

devreme a peak-urilor de solvenți, conducând la o eficiență mai bună a întregului proces, fără ca precizia metodei să fie afectată [23].

4. SINTEZA ȘI EVALUAREA COMPLECȘILOR DE ^{89}Zr : OBȚINEREA ȘI CONTROLUL DE CALITATE A RADIOFARMACEUTICELOR REZULTATE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR SOLIDE

4.1. Producerea Zirconului-89 și procesarea radiochimică a țintei iradiată

Radioizotopul ^{89}Zr a fost produs la ciclotronul TR-19 prin bombardarea unei ținte de ^{nat}Y cu protoni, în urma reacției nucleare $^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$. După iradiere, ținta a fost dizolvată folosind HCl 2M și 4 M la 100°C, întreg procesul durând aproximativ 50 minute. Soluția rezultată, de $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$, a fost purificată utilizând un cartuș specific pentru Zr. Impuritățile din soluție au fost îndepărtate cu HCl 2M și apă. În final, ^{89}Zr a fost eluat de pe cartuș cu acid oxalic 0.1 M și 0.5 M sub formă de $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$.

4.2. Reacția de conjugare a chelatorului p-SCN-Bz-DFO cu mAb

○ p-SCN-Bz-DFO – anti-HER2

Pentru realizarea reacției de conjugare anti-HER2/ErbB2 cu p-SCN-Bz-DFO a fost utilizat un raport masic de 1 la 4 (mAb : chelator). Peste un volum de 50 μL , respectiv 150 μL de soluție de anti-HER2/ErbB2 ($0.49 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$) a fost adăugat un volum de 5 μL , respectiv 15 μL din soluția stoc de p-SCN-Bz-DFO. pH-ul soluție de conjugare a fost ajustat la 9.20 ± 0.2 cu soluție tampon de Na_2CO_3 0.1M. Amestecul rezultat a fost incubat timp de 30 minute într-un Thermoshaker (300 rpm) la 37 °C [26].

○ p-SCN-Bz-DFO – affibody anti-HER2

Conjugarea p-SCN-Bz-DFO – affibody anti-HER2 a fost realizată conform procedurii descrise anterior, cu modificări minore privind concentrația fragmentului de anticorp și timpul de reacție. Au fost comparate două concentrații diferite de affibody anti-HER2 (0.3 mg/mL și 0.5 mg/mL), iar timpul de reacție a fost mărit de la 30 la 60 de minute pentru ambele concentrații. Un volum de 10 μL , respectiv 12 μL de p-SCN-Bz-DFO din soluția stoc a fost adăugat peste 100 μL (0.5 mg/mL), respectiv 200 μL (0.3 mg/mL) de soluție de affibody anti-HER2, menținându-se un raport masic între mAb și chelator de 1 : 4. Reacțiile de conjugare au avut loc într-un Thermoshaker (300 rpm) la

37 °C și pH 9.20 ± 0.2 . Evaluarea raportului de conjugare a chelator : affibody anti-HER2 a fost realizată prin spectrometrie de masă.

4.3. Purificarea conjugării p-SCN-Bz-DFO-mAb

După un timp de 30, respectiv 60 de minute, chelatorul neconjugat a fost îndepărtat prin cromatografie de excluziune sterică, utilizând o coloană PD-10 și soluție salină de NaCl (0.9%) [27]. Soluțiile conjugate au fost diluate cu NaCl 0.9% până la un volum final de 1 mL, după care eluate pe coloană. Chelatorul nelegat a fost îndepărtat prin spălare cu 1.5 mL NaCl 0.9%, în timp ce conjugarea chelator – mAb reținută pe coloană a fost eluată cu 2.5 mL NaCl 0.9%.

4.4. Radiomarcarea cu ^{89}Zr a conjugării p-SCN-Bz-DFO-mAb

Studiul de față s-a concentrat pe marcarea cu radioizotopul ^{89}Zr a două tipuri de imunoglobuline, anti-HER2/ErbB2 și affibody anti-HER2. Aceste imunoglobuline au fost inițial conjugate cu chelatorul bifuncțional p-SCN-Bz-DFO-mAb și apoi radiomarcate la 37 °C, folosind un Thermoshaker setat la 550 rpm, timp de 60 minute, cu o soluție de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$. Soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ a fost neutralizată cu Na_2CO_3 2M la un pH fiziologic de 7.20 ± 0.2 și apoi adăugată peste conjugate [28]. Pentru radiomarcarea imunoconjugatelor p-SCN-Bz-DFO – anti-HER2 și p-SCN-Bz-DFO – affibody anti-HER2, a fost utilizat un volum de 0.5-1.0 mL de soluție de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$. Pentru optimizarea reacției și pentru a evalua influența pH-ului asupra marcării, acesta a fost variat între 7.0-9.2. După un timp de reacție de 60 de minute, soluțiile au fost lăsate la temperatura camerei să se răcească și ulterior purificate pe coloana PD-10.

4.5. Caracterizarea complexilor de $^{89}\text{Zr(IV)}$ sintetizați

Asemenea oricărui alt radiofarmaceutic utilizat în aplicațiile de imagistică moleculară și descris în Farmacopeea Europeană, este necesar să se efectueze un control riguros al calității produsului. În cadrul acestui studiu, au fost monitorizați următorii parametri ai controlului de calitate: aspect, pH, puritate radiochimică, puritate și identitate radionuclidică, stabilitate, precum și randament de reacție.

Puritatea radiochimică și radionuclidică

Determinarea purității radiochimice a fost efectuată utilizând plăci de TLC din silicagel pe suport de plastic și citrat de sodiu 0.1M ca fază mobilă. De asemenea, pentru

soluțiile de $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$ și $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ au fost testate ambele tipuri de faze staționare (celuloză vs. silicagel) utilizând patru faze mobile diferite.

Puritatea și identitatea radionuclidică au fost evaluate prin determinarea timpului de înjumătățire al radioizotopului ^{89}Zr , utilizând un calibrator de doză. Acesta a fost determinat în urma a trei măsurători consecutive a activității probei de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$, efectuate pe parcursul a 24 de ore. De asemenea, a fost identificat peak-ul caracteristic ^{89}Zr la 909 keV, folosind un spectrometru de radiații gamma echipat cu un detector HPGe.

Studii de stabilitate ale complexilor de $^{89}\text{Zr(IV)}$ în ser fiziologic, uman și de șobolan

Stabilitatea complexilor de $^{89}\text{Zr (IV)}$ a fost evaluată atât ser fiziologic, cât și în ser uman și de șobolan. Pentru prepararea probelor a fost utilizată o activitate cuprinsă între 5.5-10 MBq de compus radioactiv peste care s-au adăugat 200 μL ser. Probele au fost incubate la 37 °C cu agitare ocazională timp de până la 140 ore. Stabilitatea probelor a fost monitorizată utilizând un sistem radio-TLC.

4.6. Rezultate și discuții

4.6.1. Producția Zirconului-89, procesarea post-iradiere și caracterizarea fizico-chimică a soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$

În urma iradierii țintei de $^{\text{nat}}\text{Y}$ la ciclotronul TR-19, s-a obținut o activitate medie de 2.67 ± 0.81 GBq/serie. Soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$ rezultată în urma dizolvării țintei cu HCl a fost trecută printr-o rășină schimbătoare de ioni, pre-încărcată cu un derivat al acidului fenamic (R-CO-NH-OH). Pentru îndepărtarea impurităților metalice, coloana a fost spălată succesiv cu HCl 2 M și apă. În final, ^{89}Zr a fost eluat sub formă de oxalat, utilizând acid oxalic cu concentrații de 0.1 M și 0.5 M. După procesul de dizolvare și purificare a țintei iradiată, s-a obținut o activitate a soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ de 1.95 ± 0.7 GBq, corectată la EOB.

Spectrul gamma generat (Figura 5) a identificat prezența exclusivă a peak-urilor caracteristice ^{89}Zr (909 keV și 511 keV), fără alți radioizotopi contaminați. Aceste rezultate confirmă o PRN a soluției $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat} \geq 99.9\%$.

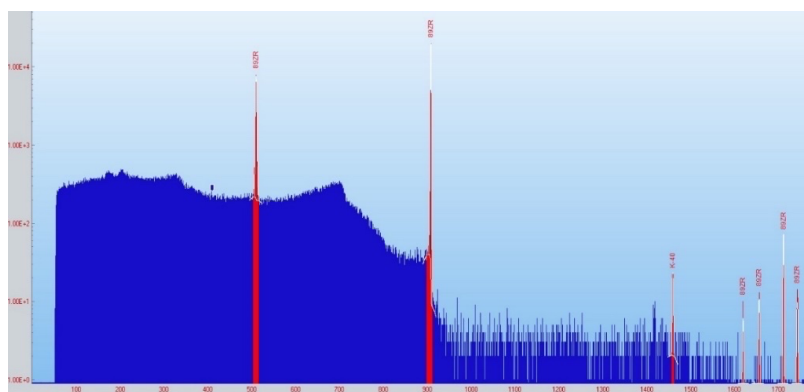


Figura 5. Spectrul gamma al soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$

Puritatea radiochimică a soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ a fost evaluată pe parcursul întregului proces de purificare și în timpul ajustării pH-ului, utilizând metoda radio-TLC/citrat de sodiu 0.1M/silicagel. Soluția finală de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$, cu un pH de 7.2 ± 0.2 , folosită în procesul de marcarea, a demonstrat o puritatea radiochimică $\geq 95\%$.

4.6.2. Adaptarea și optimizarea metodei radio-TLC pentru analiza compuşilor radiomarcați cu ^{89}Zr

Scopul acestui studiu a constat în încercarea de a descoperi o metodă adecvată, rapidă și eficientă pentru identificarea și separarea diferiților compuși complexați cu ^{89}Zr . În această încercare au fost comparate patru faze mobile distincte utilizând două tipuri de faze staționare (silicagel și celuloză). Fazele mobile comparate în cadrul studiului au fost: (Metoda 1) citrat de sodiu 0.1 M, (Metoda 2) un amestec de metanol și acetat de amoniu 1 M aflat în raport molar 7:3 (vol/vol), (Metoda 3) acid citric 20 mM tamponat cu Na_2CO_3 2M la o valoare a pH-ului de 5.0 și (Metoda 4) un amestec de metanol și apă acidulată cu 4% TFA aflate în raport molar 1:1 (vol/vol). Volumul de probă spotat pentru toate analizele radio-TLC a fost de 3 μL .

Pe baza tuturor rezultatelor obținute, s-a demonstrat că *Metoda 1*, ce presupune utilizarea fazei mobile de citrat de sodiu 0.1 M și a fazei staționare de silicagel, a oferit cea mai eficientă și reproductibilă separare a complexșilor de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr(IV)}$. Această metoda a generat peak-uri clare și bine delimitate, evidențiind o migrare a probelor bine controlată. Prin urmare, această fază mobilă a fost folosită în toate studiile ulterioare având un timp de migrare a solventului pe plăcuță de aproximativ 15 minute.

4.6.3. Evaluarea radiomarcării imunoconjugatelor cu [⁸⁹Zr]Zr-oxalat

○ [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO - anti-HER2

Pentru radiomarcarea anticorpului monoclonal anti-HER2/ErbB2 au fost utilizate două soluții de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat cu concentrații radioactive diferite (0.23 și 0.43 MBq/μL). Eficiența reacției de radiomarcare a fost evaluată prin radio-TLC. În primul experiment s-a utilizat un volum de 1 mL de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat (0.43MBq/μL) pentru marcarea unei cantități de 0.181 nmoli de anticorp, obținându-se un randament de 2.16%. Pentru a îmbunătăți acest randament, au fost ajustate atât cantitatea de anticorp, cât și activitatea soluției de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat. În al doilea experiment, creșterea cantității de anticorp la 0.543 nmoli și reducerea activității de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat la 0.23 MBq/μL au condus la o creștere semnificativă a randamentului de reacție până la 12.73%. Soluțiile de [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-anti-HER2 au prezentat un aspect limpede, incolor, cu o puritate radionuclidică (PRN) ≥ 99.9% și o puritate radiochimică (PRC) variind între 3.41 și 42.51%. Evaluarea PRC a compușilor a fost efectuată atât înainte, cât și după etapa de purificare pe coloana PD-10.

○ [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO- affibody anti-HER2

În cadrul acestor experimente, au fost utilizate volume diferite de soluție de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat (0.5-1.1 mL), pentru radiomarcarea diferitelor cantități de affibody anti-HER2 (6.89 și 8.25 nmoli), păstrând constante temperatura (37°C) și timpul de reacție (1 oră) și ajustând pH-ul de marcarea în intervalul 7.0-9.0 (Tabel 5). Această abordare a permis evaluarea eficienței radiomarcării în diferite condiții, esențiale pentru optimizarea întregului proces.

Tabel 5. Parametrii utilizați în procesul de radiomarcare a moleculei transportoare affibody anti-HER2 cu ⁸⁹Zr

Parametrii marcarea	[⁸⁹ Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2					
	Exp.1	Exp. 2	Exp.3			
Cantitate affibody (nmoli)	6.89	8.25	8.25			
Cantitate p-SCN-Bz-DFO (nmoli)	265	318.8	318.8			
pH marcarea	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.0-7.5	7.5-8.0	8.0-8.5	9.0
Volum [⁸⁹ Zr]Zr-oxalat (μL)	1040 ± 106.1	1050	500 ± 0.2			
Activitate [⁸⁹ Zr]Zr-oxalat (MBq)	265.5 ± 91.2	460	112.1 ± 8.2			
Temperatură reacție (°C)	37	37	37			
Timp reacție (min)	60	60	60			

Randament (%)	75.09 ± 7.2	33.83	78.41	45.45	14.59	11.96
Activitate specifică (MBq/nmoli)	26.5 ± 4.4	18.86	11.45	5.97	2.07	1.49
Puritatea radiochimică (%)	97.96	42.05	87.96	50.99	16.35	13.41

Primul experiment a avut ca scop evaluarea procesului de radiomarcare a imunoconjugatului p-SCN-Bz-DFO – affibody anti-HER2, folosind o cantitate mică, de numai 6.89 nmoli de affibody anti-HER2 și o concentrație radioactivă a soluției de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat de aproximativ 0.25 ± 0.06 MBq/μL. Experimentul acesta a fost unul de referință pentru stabilirea condițiilor de bază necesare pentru procesul de marcăre, având în vedere parametrii ajustați în experimentele 2 și 3. Randamentul de marcăre a fost de aproximativ 75%, ceea ce sugerează o eficiență relativ bună în condițiile experimentale stabilite. În ceea ce privește puritatea radiochimică obținută atât înainte, cât și după etapa de purificare, aceasta a prezentat valori peste 97% pentru ambele cazuri (Figura 6).

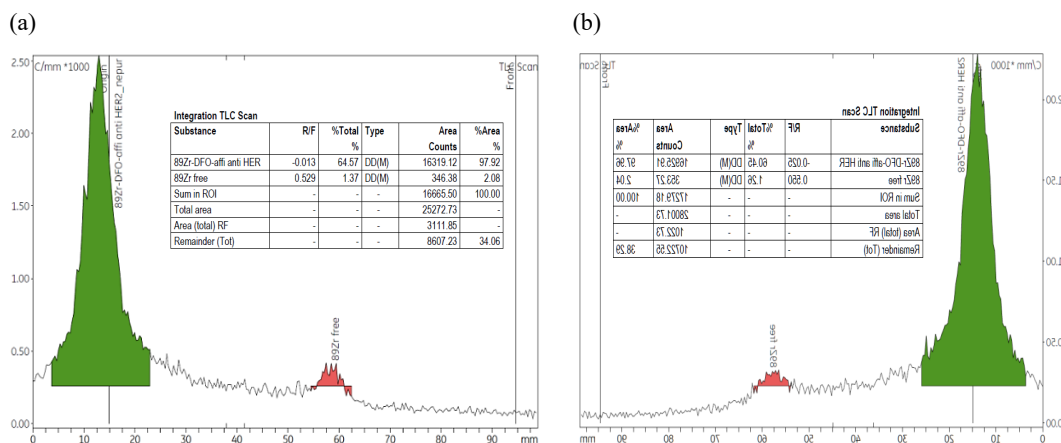


Figura 6. Cromatogramele radio-TLC pentru complexul [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2 (Experiment 1): (a) înainte de purificare și (b) după purificare

În cadrul experimentului 2, pentru radiomarcarea unei cantități de 8.25 nmoli de affibody anti-HER2 a fost utilizată o concentrație radioactivă a soluției de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat de 0.44 MBq/μL. Randamentul de marcăre obținut în cazul experimentului 2, după 12 ore de la inițierea reacției de marcăre a crescut de la 34% până la aproximativ 68%, ceea ce a indicat o valoare comparabilă cu rezultatele obținute în experimentul 1, sugerând însă în continuare o eficiență a reacției de marcăre mai scăzută. Puritatea radiochimică a compusului [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2, a prezentat modificări majore față de valoarea obținută inițial, acesta crescând de la 42% la 84.62% (Figura 7).

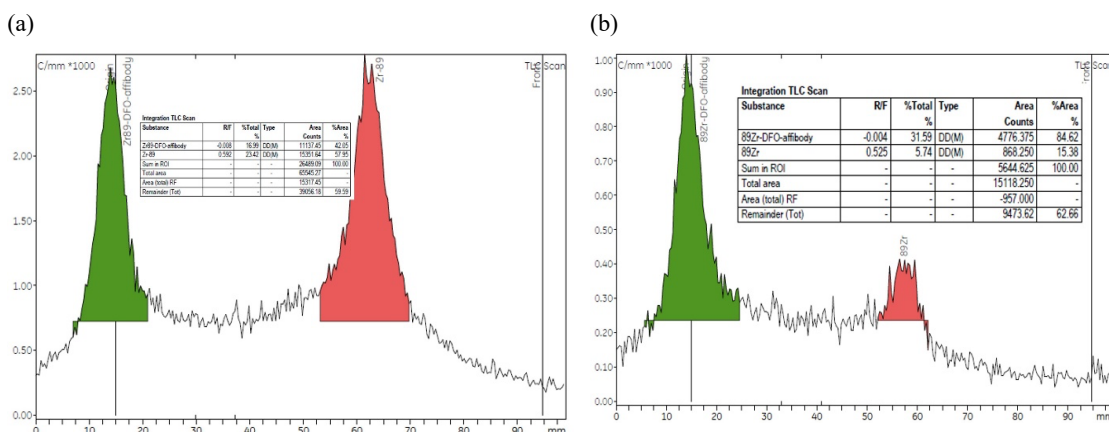


Figura 7. Cromatograma radio-TLC rezultată în urma analizei soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody}$ anti-HER2 din cadrul Experimentului 2 după (a) 1 oră de la inițierea reacției și (b) peste noapte la 37°C

Pe baza constatărilor din experimentul 2, am introdus în cadrul experimentului 3, patru niveluri diferite de pH (7.0-9.0) menținând constantă cantitatea de affibody anti-HER2 (8.25 nmoli) și cantitatea de chelator (318.8 nmoli). Monitorizarea evoluției reacțiilor de marcarea a fost realizată prin radio-TLC la intervale de 1, 2 și 12 ore de la inițiere. Rezultatele obținute au indicat o creștere continuă a purității radiochimice după 2 ore, sugerând că acestea nu au atins un punct de saturație și continuă să evolueze (Figura 8).

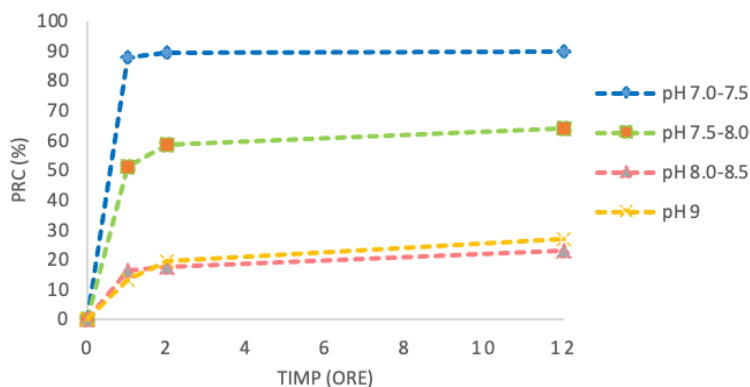


Figura 8. Dependența purității radiochimice de pH-ul de marcarea la diferite intervale de timp de la inițierea reacției

Reacția de marcarea desfășurată la un pH de 7.0 - 7.5 a prezentat o puritatea radiochimică ridicată încă după 1 oră de la inițierea procesului, cu valori de peste 85% și o creștere constantă a acesteia în timp. Aceste rezultate confirmă că acest interval de pH este favorabil atât pentru realizarea reacției de radiomarcare, cât și pentru menținerea stabilității compusului pe o perioadă de timp mai îndelungată.

4.6.4. Studiu de stabilitate

Studiul de stabilitate a complexelor de $^{89}\text{Zr(IV)}$ a fost realizat atât în soluție salină (0.9% NaCl), cât și în medii biologice, precum serul uman și serul de șobolan. În soluție salină fragmentul de anticorp radiomarcant a prezentat o scădere de 7.1% a PRC după 140 ore de incubare, în timp ce în ser uman a ajuns la 53.42%, respectiv 35.63% în ser de șobolan (Figura 9). Aceste rezultate sugerează că, deși fragmentul de anticorp marcat are un timp de înjumătățire plasmatic scurt, stabilitatea acestuia în serul uman și de șobolan poate fi optimizată pentru scopuri de imagistică PET.

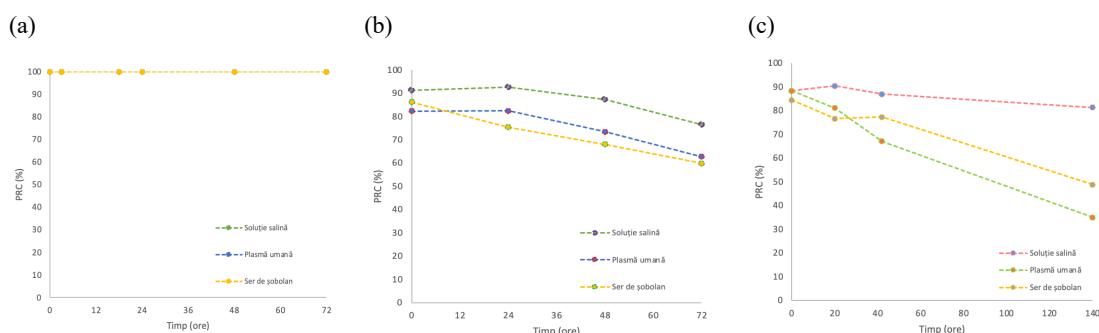


Figura 9. Studiu de stabilitate a compuşilor (a) $[^{89}\text{Zr}]Zr\text{-oxalat}$, (b) $[^{89}\text{Zr}]Zr\text{-p-SCN-Bz-DFO}$ și (c) $[^{89}\text{Zr}]Zr\text{-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2}$ în soluție salină, ser uman și ser de șobolan

Alte aplicații

Au fost realizate studii *in vitro* pe linii celulare tumorale de sân (MCF-7 și BT-474) pentru a evalua absorbția și retenția compusului $[^{89}\text{Zr}]Zr\text{-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2}$ la nivelul acestora. Rezultatele au indicat o absorbție a compusului pe toate liniile celulare analizate, cu o retenție semnificativ mai accentuată pe liniile celulare HER2-pozitive, ceea ce sugerează o afinitate sporită a compusului pentru acest tip de celule. Acest comportament subliniază potențialul compusului ca agent de imagistică moleculară pentru tumorile HER2-pozitive, permițând o identificare mai precisă a acestora.

5. EVALUAREA PROCESELOR DE RADIOMARCARE ȘI CARACTERIZARE A RADIOFARMACEUTICELOR PE BAZĂ DE ^{64}Cu ȘI ^{89}Zr , OBȚINUTE ÎN URMA IRADIERII ȚINTELOR LICHIDE

5.1. Producerea radioizotopilor ^{64}Cu și ^{89}Zr din ținte lichide: procesare și caracterizare post-iradiere

Experimentele pentru obținerea radioizotopilor medicali ^{64}Cu și ^{89}Zr au fost realizate la ciclotronul KIUBE (IBA, Louvain-la-Neuve, Belgia), instalat în cadrul Institutului de Științe Nucleare Aplicate Sănătății (ICNAS) din Coimbra, Portugalia. Producția ^{64}Cu a presupus iradierea unei ținte lichide (LT) de nichel-64 dizolvat [19], în timp ce pentru obținerea ^{89}Zr s-a utilizat o soluție de azotat de ytriu.

o Caracterizarea soluțiilor $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ și $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$

Controlul de calitate a fost realizat imediat după finalizarea etapei de purificare. Parametrii urmăriți pentru fiecare probă analizată au fost: aspectul probei, pH-ul, identitatea radionuclidică, puritatea radiochimică și radionuclidică [19]. Puritatea și identitatea radionuclidică a soluțiilor de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ și $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ au fost investigate prin măsurarea timpilor de înjumătățire ai celor doi radioizotopi, utilizând un calibrator de doză, precum și prin spectrometrie cu radiații gamma, metodă similară celei aplicate în cazul țințelor solide [19]. În plus, puritatea radiochimică a fost evaluată prin radio-TLC, folosind citrat de sodiu 0.1 M ca fază mobilă.

5.2. Radiomarcarea neuropeptidelor cu $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ rezultat prin iradierea LT

Legarea radiotrasorului ^{64}Cu la peptidele DOTA-NMN și DOTA-NT(8-13) a fost realizată menținându-se aceleași condiții de temperatură și timp de reacție ca în cazul experimentelor cu ținte solide. Cu toate acestea, pentru fiecare 20 nmoli de peptidă a fost utilizat un volum dublu, de aproximativ 2 mL soluție de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (pH 3.8-4.0), cu o activitate radioactivă de $861.8 \pm 17.3 \text{ MBq/mL}$ [19]. În urma procesului de radiomarcare, soluția a fost purificată folosind cartușul SPE Cartridge, Oasis HLB Plus Extraktion. Ulterior, peptida marcată a fost eluată de pe cartuș cu 1 mL de etanol și evaporată până

aproape de sec la 80 °C. După evaporare, aceasta a fost recuperată într-un 1 mL ser fiziologic, iar pH-ul a fost ajustat, dacă a fost necesar, în intervalul 7.0-7.5 [19].

5.3. Caracterizarea neuropeptidelor marcate utilizând soluția de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ obținută prin iradierea LT

Puritatea radiochimică a peptidelor radiomarcate, $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NMN}$ și $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-NT}(8-13)$, a fost evaluată cu ajutorul unui sistem radio-HPLC Agilent 1260 Infinity II, echipat cu detector UV-VIS și detector de radiații gamma ELYSIA Raytest. Coloană cromatografică utilizată a fost Agilent Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm . Faza mobilă a fost compusă din apă acidulată cu TFA (solvent A) și acetonitril (solvent B). Analiza a fost realizată în gradient liniar, cu un debit de 3.5 mL/min, timpul de analiză fiind de 5 minute [19].

5.4. Marcarea vectorilor specifici receptorului HER2 cu radioizotopul ^{89}Zr obținut prin iradierea LT

○ *Conjugarea chelatorului la biomolecula transportoare*

Conjugarea chelatorului p-SCN-Bz-DFO cu agenții biologici a fost realizată pe baza unui protocol bine definit, având ca scop maximizarea randamentului reacției de marcarea. Astfel, pentru Trastuzumab, a fost utilizată o cantitate de 188 $\mu\text{g}/47 \mu\text{L}$ (concentrație 4 mg/mL), care a fost incubată timp de 90 minute într-un Thermoshaker la 37 °C, împreună cu 9.4 mg/10 μL p-SCN-Bz-DFO, stabilindu-se astfel un raport 1: 50 între cele două. Reacția s-a desfășurat într-un volum total de 530 μL , care includea 453 μL NaCl 0.9% și 20 μL Na_2CO_3 0.1M. În paralel, pentru affibody anti-HER2, s-a folosit o cantitate de 141 $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$ (concentrație 0.5 mg/mL), la care s-a adăugat 600 $\mu\text{g}/30 \mu\text{L}$ p-SCN-Bz-DFO, rezultând un raport de 1:4 (chelator: biomoleculă). pH-ul soluției a fost ajustat la valoarea 9.0 cu 50 μL Na_2CO_3 0.1 M., iar soluția astfel preparată a fost incubată timp de 30 minute. Ulterior, imunoconjugatele au fost purificate utilizând coloana preparativă PD-10, pentru a îndepărta excesul de chelator necuplat.

○ *Marcarea anticorpului Trastuzumab cu soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$*

Pentru marcarea s-a utilizat un volum de 950 μL soluție $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ (33.29 MBq), al cărui pH a fost ajustat la 7.00 cu 315 μL soluție tampon de Na_2CO_3 0.1 M. Peste soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ s-au adăugat 500 μL de soluție HEPES 0.5M (pH 6.8) și 500 μL soluție p-SCN-Bz-DFO-Trastuzumab. Reacția a fost incubată timp de 1 oră într-un

Thermoshaker la 37°C. După acest timp, soluția rezultată a fost purificată utilizând coloana PD-10.

○ *Marcarea affibody anti-HER2 cu soluția de [⁸⁹Zr]Zr-oxalat*

Un volum de 3 mL soluție [⁸⁹Zr]Zr-oxalat (98.09 MBq), al cărui pH a fost ajustat la 7.5 cu Na₂CO₃ 0.1M, a fost adăugat peste 2.5 mL soluție p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2 purificată. Reacția a fost incubată timp de 3 ore într-un Thermoshaker la 37°C și ulterior purificată folosind coloana PD-10. Parametrii implicați în procesul de marcarea au fost adaptați condițiilor experimentale necesare țintelor lichide, metoda respectând etapele principale descrise în cadrul experimentelor pe ținte solide.

5.5. Caracterizarea complexelor de ⁸⁹Zr(IV) sintetizate prin iradierea LT

Analiza radio-TLC a fost efectuată pe plăcuțe de celuloză (15 x 1.5 cm), utilizând ca fază mobilă o soluție de citrat de sodiu 0.1M, pH 5.0. Un volum de 10 μL de probă a fost spotat pe fiecare plăcuță, iar timpul de analiză a fost de 5 minute.

Analiza radio-HPLC a complexului [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-Trastuzumab a fost realizată pe același sistem utilizat în cadrul experimentelor pe neuropeptide marcate, însă utilizând o coloană Superdex 200 10/300 GL. Faza mobilă pentru analiza acestei probe a constat într-un amestec de 13.8 g dihidrogenofosfat de sodiu, 14.2 g fosfat acid disodic, 17.4 g clorură de sodiu și 1.3 g azidă de sodiu, toate dizolvate în 2 L de apă, cu un pH cuprins între 6.2 și 7.0. Debitul fazei mobile a fost de 0.5 mL/minut, iar coloana a fost menținută la o temperatură de 26 °C. Volumul de probă injectat a fost de 20 μL, în timp ce durata unei analize a fost de 1 oră.

5.6. Rezultate și discuții

5.6.1. Producția și caracterizarea soluției de [⁶⁴Cu]CuCl₂

În urma producției radioizotopului medical ⁶⁴Cu la ciclotronul Kiube, din cadrul Institutului ICNAS din Portugalia și a procesării post-iradiere, s-a obținut o activitate radioactivă medie de 3.7 ± 0.2 GBq, corectată la momentul finalizării iradierii (EOB), valoare considerabil mai mică comparativ cu 16.2 ± 0.8 GBq obținută prin iradierea țintelor solide [19]. Soluția de [⁶⁴Cu]CuCl₂ rezultată a prezentat, în timpul controlului de calitate un aspect limpede, incolor, o puritate radiochimică de 100% (determinată prin radio-HPLC și radio-TLC), o puritate radionuclidică de peste 99.99% (determinată prin

spectrometrie gamma) și un timp de înjumătățire de 12.4 ± 0.2 ore, măsurat la calibratorul de doză [19].

5.6.2. Radiomarcarea neuropeptidelor cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ obținută prin LT

Soluțiile de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ rezultate în urma procesării post-iradiere prin fiecare dintre cele două metode (ST și LT) au fost supuse unor proceduri similare de radiomarcare, care au presupus înainte de toate concentrarea prin evaporare și ajustarea pH-ului la 3.8-4.0 cu acetat de amoniu [19]. În funcție de metoda de producție, au fost utilizate volume diferite de soluție de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ pentru radiomarcarea aceleiași cantități de neuropeptidă (20 nmoli). În comparație cu concentrația radioactivă și volumul utilizat pentru experimentele ST (1340.4 ± 70.1 MBq/mL, volum 1 mL), în cazul LT concentrația radioactivă a soluției de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ a fost de 492.5 ± 9.8 MBq/mL, volumul utilizat pentru radiomarcare fiind de 1.75 mL [19]. Parametrii de radiomarcare pentru experimentele LT sunt prezentați în tabelul de mai jos.

Tabel 6. Parametrii de radiomarcare utilizați în experimentele pe ținte lichide (LT) [19]

Parametrii	Peptidă marcată	
	DOTA-NMN	DOTA-NT(8-13)
Cantitate peptidă (nmoli)	20	
pH marcarea	3.9 ± 0.1	
Volum soluție $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (mL)	1.75 ± 0.25	
Activitatea $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (MBq)	861.8 ± 17.3	
Temperatură (°C)	95	
Timp de reacție (min)	15	
Randament marcarea (%)	61.22 ± 2.45	63.24 ± 2.53

Reacțiile de radiomarcare a neuropeptidelor DOTA-NMN și DOTA-NT(8-13) cu radioizotopul ^{64}Cu au decurs cu succes, rezultând în ambele cazuri purități radiochimice ridicate de peste 99% și activități molare de 27.2 și 26.4 GBq/ μmol pentru experimentele LT, comparativ cu 45 și 52 GBq/ μmol pentru cele ST. Pentru ambele experimente a fost testată specificitatea radiofarmaceuticelor sintetizate pe diferite linii celulare tumorale de cancer de colon și prostată prin metoda Ligand Tracer. În urma evaluării acestui studiu *in vitro* a fost observată o interacțiune puternică între $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -DOTA-NT(8-13) și liniile tumorale de cancer de colon (HT29 și HCT116).

5.6.3. Producția și caracterizarea soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$

Producția de zirconiu-89 prin iradierea țintelor lichide la ciclotronul IBA Kiube a condus la obținerea unei activități radioactive de aproximativ 200 MBq corectată la EOB (după 5 ore de iradiere). După iradiere, soluția a fost purificată folosind un cartuş produs *in house* (cu o rășină similară cu cea utilizată în experimentele ST) pentru a îndepărta impuritățile metalice prezente. Soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ a fost eluat de pe coloană cu acid oxalic 1 M. Puritatea radiochimică a soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ a fost evaluată atât prin radio-TLC, precum și prin radio-HPLC. La finalul purificării, PRC a fost de peste 99.9%.

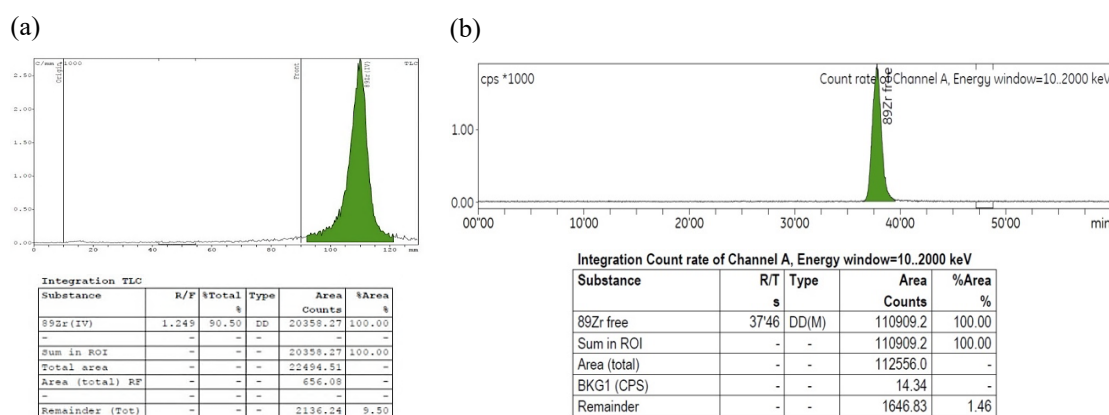


Figura 10. Cromatogramele (a) radio-TLC și (b) radio-HPLC ale soluției de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ rezultată prin iradierea LT

5.6.4. Radiomarcarea vectorilor de țintire specifică Trastuzumab și affibody anti-HER2 cu $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ obținut prin iradierea LT

Radiomarcarea imunoconjugatelor p-SCN-Bz-DFO-Trastuzumab și p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2 cu soluția de $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-oxalat}$ a condus la randamente de peste 60% pentru experimentele LT, comparativ cu 12% ($[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-SCN-Bz-DFO-anti-HER2}$) și de peste 65% ($[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2}$) pentru experimentele ST, utilizând condiții similare (temperatură marcăre și pH marcăre). Evaluarea purităților radiochimice a compușilor radiomarcați a fost evaluată folosind metodele radio-TLC și radio-HPLC. PRC a fost $\geq 85\%$ pentru affibody anti-HER2 (LT și ST) și Trastuzumab (LT), în timp ce pentru anti-HER2 (ST) a fost de aproximativ 44%.

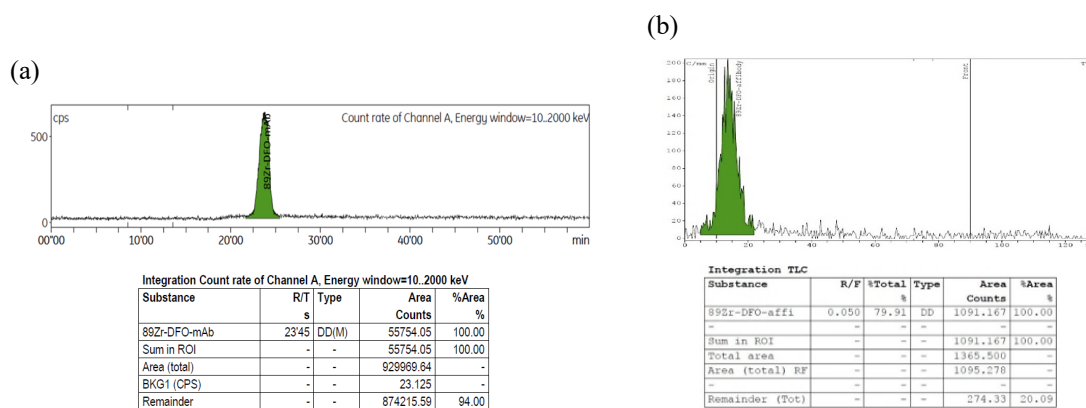


Figura 11. Cromatograma (a) radio-HPLC generată pentru soluția de [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-Trastuzumab și (b) radio-TLC pentru soluția de [⁸⁹Zr]Zr-p-SCN-Bz-DFO-affibody anti-HER2, după purificare

CONCLUZII GENERALE

Cercetările prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au avut ca scop dezvoltarea și caracterizarea radiofarmaceuticelor cu țintire specifică, utilizând radioizotopii ⁶⁴Cu și ⁸⁹Zr. Au fost dezvoltate, optimizate și validate metode analitice pentru controlul calității, conform standardelor Farmacopeei Europene, asigurând eficiența și calitatea acestora în aplicații preclinice și clinice. De asemenea, au fost comparate procesele de obținere a celor doi radioizotopi prin iradierea țintelor solide și lichide, iar rezultatele au permis optimizarea proceselor de marcarea biomoleculelor, pentru a obține randamente și PRC ridicate și stabilitate pe termen lung.

Capitolul 1 din cadrul tezei a avut ca prim obiectiv obținerea ⁶⁴Cu prin iradierea ST la ciclotronul TR-19 și evaluarea procesului de radiomarcare al peptidelor cu acesta. Soluția de [⁶⁴Cu]CuCl₂ a respectat toate cerințele prevăzute de Farmacopeea Europeană, demonstrând o PRN >99.99% și PRC >95%, și stabilitate excelentă. Radiomarcarea peptidelor a condus la randamente de peste 65% și o PRC >95%, evidențiind eficiența procesului. De asemenea, au fost dezvoltate și optimizate trei metode cromatografice (radio-HPLC, radio-TLC și GC-HS), care s-au dovedit a fii precise, reproductibile și sensibile, asigurând o analiză rapidă și detaliată a compușilor radiomarcați. Aceste rezultate demonstrează fezabilitatea utilizării ⁶⁴Cu pentru radiomarcare și utilizarea acestuia în imagistica PET.

Capitolul 2 s-a concentrat pe evaluarea și optimizarea proceselor de radiomarcare a vectorilor de țintire anti-HER2 și affibody anti-HER2 cu ⁸⁹Zr, având ca scop

identificarea condițiilor optime pentru obținerea unor radiofarmaceutice de înaltă calitate destinate imagisticii cancerului de sân HER2+. Studiile au arătat că, deși marcarea mAb a avut randamente reduse, marcarea affibody-ului anti-HER2 a fost optimizată cu succes, obținându-se randamente >75% și PRC >80%. În plus, metoda radio-TLC utilizând citrat de sodiu 0.1 M/silicagel s-a dovedit a fi cea mai eficientă pentru separarea speciilor de [^{89}Zr]Zr(IV), asigurând o analiză rapidă și reproductibilă. Studiile *in vitro* realizate pe liniile celulele de cancer de sân (BT-474 și MCF-7) au evidențiat un potențial promițător al compusului radiomarcant pentru țintirea specifică a celulelor HER2+, susținând aplicabilitatea acestuia în imagistica PET.

Ultimul capitol experimental din cadrul prezentei teze a demonstrat fezabilitatea utilizării țințelor lichide pentru producerea radioizotopilor ^{64}Cu și ^{89}Zr , evidențiind atât avantajele, cât și limitările acestei metode în comparație cu iradierea țințelor solide. Deși activitățile specifice obținute au fost mai mici, soluțiile sintetizate au respectat cerințele Farmacopeei Europene, permițând radiomarcarea eficientă a biomoleculelor de interes. Adaptarea condițiilor de reacție în funcție de radioizotop și molecula transportoare a fost esențială pentru optimizarea randamentelor și purităților radiochimice, demonstrând aplicabilitatea ambelor metode în dezvoltarea radiofarmaceuticelor pentru imagistica PET.

În concluzie, această teză contribuie semnificativ la înțelegerea și îmbunătățirea cunoștințelor cu privire la optimizarea proceselor de sinteză și analiza radiofarmaceuticelor, oferind un fundament solid pentru cercetările viitoare în acest domeniu. Rezultatele obținute aduc noi perspective asupra utilizării radioizotopilor medicali ^{64}Cu și ^{89}Zr în imagistica moleculară și terapia personalizată, precum și contribuții la dezvoltarea tehnicilor de radiomarcare și analiză cromatografică în medicina nucleară.

CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat reprezintă contribuțiile originale obținute în urma cercetării desfășurate în timpul studiilor de doctorat. Studiul realizat se axează pe dezvoltarea, optimizarea și caracterizarea unor compuși biologici activi marcați cu radioizotopii ^{64}Cu și ^{89}Zr , cu aplicabilitate în imagistica moleculară de

tip PET și terapia țintită. Contribuțiile personale regăsite atât în procesul de sinteză, cât și în caracterizarea radiofarmaceuticelor sunt detaliate mai jos:

- ✓ Dezvoltarea și optimizarea proceselor de sinteză a biomoleculelor cu specificitate ridicată (peptide, anticorpi monoclonali și fragmente de anticorp), utilizând radioizotopii medicali ^{64}Cu și ^{89}Zr , ce vizează țintirea precisă a receptorilor supraexprimați în cancerul de colon, prostată și sân (HER2+);
- ✓ Implementarea unor metodologii eficiente și reproductibile de radiomarcare, asigurând obținerea unor compuși de înaltă calitate și stabilitate pe termen lung în medii biologice;
- ✓ Dezvoltarea, optimizarea și implementarea unor tehnici avansate de control al calității (radio-HPLC, radio-TLC, GC) pentru evaluarea purității radiochimice, precum și pentru determinarea stabilității compușilor în diferite medii similare sistemului uman (soluție salină, ser uman și ser de șobolan);
- ✓ Validarea metodelor de control al calității conform standardelor internaționale;
- ✓ Compararea metodologiei propuse cu abordările existente, evidențiind avantajele utilizării acesteia;
- ✓ Evaluarea potențialului *in vitro* a radiofarmaceuticelor pe linii celulare specifice tumorilor de colon, prostată și sân.

Perspective de viitor

Teza a adus contribuții semnificative la optimizarea proceselor de radiomarcare a biomoleculelor cu radioizotopi medicali ^{64}Cu și ^{89}Zr , oferind soluții pentru îmbunătățirea eficienței și siguranței radiofarmaceuticelor utilizate în imagistica PET. În viitor, optimizarea suplimentară a metodologiei experimentale și extinderea studiilor preclinice vor facilita integrarea acestor radiofarmaceutice în practica medicală. Acești compuși ar putea conduce la localizarea precisă a tumorilor și monitorizarea evoluției acestora pe termen lung. De asemenea, studiile viitoare s-ar putea axa pe analiza stabilității *in vivo*, evaluând cantitatea de ^{64}Cu și ^{89}Zr eliberată în sistemul sanguin sub influența factorilor biologici. Utilizarea metodelor cromatografice riguroase în controlul de calitate va asigura rezultate reproductibile și precise, esențiale pentru dezvoltarea acestui domeniu.

BIBLIOGRAFIE

- [1] D. Kaushik et al., “Radiopharmaceuticals: An insight into the latest advances in medical uses and regulatory perspectives”, *Journal of Biosciences*, vol. 46, no. 1, p. 27, Dec. 2021, doi: 10.1007/s12038-021-00147-5.
- [2] V. N. Starovoitova, L. Tchelidze, and D. P. Wells, “Production of medical radioisotopes with linear accelerators”, *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 85, pp. 39–44, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.apradiso.2013.11.122.
- [3] M. M. Khalil, Ed., Basic Sciences of Nuclear Medicine. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*, 2011. doi: 10.1007/978-3-540-85962-8.
- [4] J. J. P. de Lima, “Radioisotopes in medicine”, *European Journal of Physics*, vol. 19, no. 6, pp. 485–497, Nov. 1998, doi: 10.1088/0143-0807/19/6/003.
- [5] J. S. Lewis, A. D. Windhorst, and B. M. Zeglis, Eds., Radiopharmaceutical Chemistry. Cham: *Springer International Publishing*, 2019. doi: 10.1007/978-3-319-98947-1.
- [6] W. Jiang, Y. Chalich, M.J. Deen, “Sensors for Positron Emission Tomography Applications”, *Sensors*, vol. 19, no. 22, p. 5019, Nov. 2019, doi: 10.3390/s19225019.
- [7] A. C. Veltkamp, “Radiochromatography in pharmaceutical and biomedical analysis”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 531, pp. 101–129, Oct. 1990, doi: 10.1016/S0378-4347(00)82282-3.
- [8] T. S. Laferriere-Holloway, A. Rios, Y. Lu, C. C. Okoro, and R. M. van Dam, “A rapid and systematic approach for the optimization of radio thin-layer chromatography resolution,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1687, pp. 463656, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463656.
- [9] M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, “Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1232, pp. 101–109, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.050.
- [10] R. E. Farrell, “Principles of Detection”, *RNA Methodologies*, Elsevier, 2010, pp. 301–320. doi: 10.1016/B978-0-12-374727-3.00014-0.
- [11] Y. Teng, H. Yang, and Y. Tian, “The Development and Application of Tritium-Labeled Compounds in Biomedical Research”, *Molecules*, vol. 29, no. 17, p. 4109, Aug. 2024, doi: 10.3390/molecules29174109.
- [12] I. Daruwati, A. K. Gwiharto, H. Wongso, T. H. Achmad, M. Syaifudin, and M. Muchtaridi, “Method development, validation, and impurity measurement of β -estradiol from radiolabeled [^{131}I] β -estradiol using radio-high-performance liquid chromatography

for radioligand of saturation binding assay”, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 14, no. 2, pp. 105–112, Apr. 2023, doi: 10.4103/japtr.japtr_624_22.

[13] “Quality Control in the Production of Radiopharmaceuticals”, *IAEA TECDOC SERIES- 1856*, Vienna, 2018, pp. 1–133.

[14] V. Berezkin and T. Dzido, “The discovery of thin-layer chromatography by N.A. Izmailov and M.S. Shraiber”, *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, vol. 21, no. 6, pp. 399–403, Dec. 2008, doi: 10.1556/JPC.21.2008.6.1.

[15] T.R. Roberts, *Radiochromatography: The Chromatography and Electrophoresis Radiolabelled Compounds*, vol. 14. 2011.

[16] F. J. Santos and M. T. Galceran, “The application of gas chromatography to environmental analysis”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, no. 9–10, pp. 672–685, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00813-0.

[17] K. D. Bartle and P. Myers, “History of gas chromatography”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, no. 9–10, pp. 547–557, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00806-3.

[18] M.-R. Tudoroiu-Cornoiu et al., “Assessment of chromatography separation parameters in the quality control of copper-64-labeled neurotensin-like peptides”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 333, no. 11, pp. 5531–5543, Nov. 2024, doi: 10.1007/s10967-024-09694-1.

[19] D. Cocioabă et al., “Neurotensin (8-13) and Neuromedin N Neuropeptides Radiolabelling with Copper-64 Produced on Solid or Liquid Targets”, *Molecules*, vol. 29, no. 6, p. 1390, Mar. 2024, doi: 10.3390/molecules29061390.

[20] R. M. Serban et al., “Modifications in cellular viability, DNA damage and stress responses inflicted in cancer cells by copper-64 ions”, *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, vol. 10, Jun. 2023, doi: 10.3389/fmed.2023.1197846.

[21] M. A. Channing, B. X. Huang, and W. C. Eckelman, “Analysis of residual solvents in 2-^[18F]FDG by GC”, *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 28, no. 4, pp. 469–471, May 2001, doi: 10.1016/S0969-8051(00)00213-4.

[22] M. Mihon, C. Tuta, R. Leonte, A. C. Ion, V. Lavric, and D. Niculae, “An improved methodology for determination of radiochemical and chemical impurities in the synthesis process of ¹⁸F-FDG (2-^[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose),” *Environmental Engineering and Management Journal*, vol. 14, no. 2, pp. 289–296, 2015, doi: 10.30638/eemj.2015.028.

- [23] M.-R. Tudoroiu-Cornoiu, E. L. Chilug, I. Ion, and D. Niculae, “Validation of a headspace gas chromatography method for volatile residual solvents identification in radiopharmaceuticals”, *University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin, Series B*, vol. 86, no. 4, pp. 1–12, 2024.
- [24] EDQM, “European Pharmacopoeia. 8.0, Methods of analysis: Identification and control of residual solvents, European Directorate for the Quality of the Medicines”, *European Pharmacopoeia 11.0*, vol. 1, 2022, pp. 162–166.
- [25] M. Mihon, C. S. Tuta, A. C. Ion, D. Niculae, and V. Lavric, “Fast Method for the Determination of Residual Solvents in Radiopharmaceutical Products”, *Revista de Chimie*, vol. 68, no. 4, pp. 666–670, May 2017, doi: 10.37358/RC.17.4.5526.
- [26] M. J. W. D. Vosjan et al., “Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine”, *Nature Protocols*, vol. 5, no. 4, pp. 739–743, Apr. 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.13.
- [27] L. R. Perk et al., “p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 37, no. 2, pp. 250–259, Feb. 2010, doi: 10.1007/s00259-009-1263-1.
- [28] A. Larenkov, V. Bubenschikov, A. Makichyan, M. Zhukova, A. Krasnoperova, G. Kodina, “Preparation of Zirconium-89 Solutions for Radiopharmaceutical Purposes: Interrelation Between Formulation, Radiochemical Purity, Stability and Biodistribution”, *Molecules*, vol. 24, no. 8, p. 1534, Apr. 2019, doi: 10.3390/molecules24081534.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE ÎN CADRUL PREZENTEI TEZE DE DOCTORAT

I. Lucrări publicate în reviste cotate și indexate ISI Clarivate Analytics Web of Science (după AIS) care conțin rezultatele din teză

1. **M.R. Tudoroiu-Cornoiu**, E. L. Chilug, D. Cocioaba, S. Baruta, R. Șerban, A. C. Ion and D. Niculae (2024), “Assessment of chromatography separation parameters in the quality control of copper-64-labeled neurotensin-like peptides”,

Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 333 (9), 1-13
(AIS = 0.24, IF = 1.5, SRI = 0.723, Q3).

<https://doi.org/10.1007/s10967-024-09694-1>

2. **M.R. Tudoroiu-Cornoiu**, E. L. Chilug, D. Niculae, A. C. Ion (2024), “Validation of a headspace gas chromatography method for volatile residual solvents identification in radioactive drugs”, University Politehnica of Bucharest Scientific bulletin series B-chemistry and materials science, 86(4) (AIS = 0.043, IF = 0.3, SRI = 0.105, Q4)
3. D. Cocioabă, A.I. Fonseca, R. Leonte, I. Hrynychak, **R. Tudoroiu-Cornoiu**, S.J.C. do Carmo, B. Burghelea, S. Băruță, A.R. Almeida, R. Șerban, A. Dinischiotu, A.J. Abrunhosa & D.Niculae (2024), “Neurotensin (8-13) and Neuromedin N Neuropeptides Radiolabelling with Copper-64 Produced on Solid or Liquid Targets”, Molecules, 29(6), 1390. (AIS = 0.676, IF = 4.2, SRI = 1.653, Q2).
<https://doi.org/10.3390/molecules2961390>
4. R.M. Serban, D. Niculae, G. Manda, I. Neagoe, M. Dobre, D.A. Niculae, M. Temelie, C. Mustăciosu, R.A. Leonte, L.E. Chilug, **M.R. Cornoiu**, D. Cocioabă, M. Stan, A. Dinischiotu, (2023), “Modifications in cellular viability, DNA damage and stress responses inflicted in cancer cells by copper-64 ions”, Frontiers in Medicine, 10, 1197846. (AIS = 0.860, IF = 3.1, SRI = 2.606, Q2).
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1197846>
5. I. Hrynychak, D. Cocioabă, A.I. Fonseca, R. Leonte, S.J. do Carmo, **R. Cornoiu**, A. Falcão, D. Niculae & A.J. Abrunhosa, (2023), “Antibody and Nanobody Radiolabeling with Copper-64: Solid vs. Liquid Target Approach”, Molecules, 28(12), 4670. (AIS = 0.676, IF = 4.2, SRI = 1.653, Q2).
<https://doi.org/10.3390/molecules28124670>

TOTAL PUNCTAJ = 2.495 AIS_{cumulat} și 13.3 IF_{cumulat} (SRI = 6.74)

II. Lucrări trimise către publicare în reviste cotate și indexate ISI Clarivate Analytics Web of Science (după AIS) care conțin rezultatele din teză

1. D. Cocioabă, S. Băruță, L. Crăciun, R. Leonte, A. Necșoiu, **M.-R. Tudoroiu-Cornoiu**, A. Jipa and D. Niculae, (2025), “Optimized production of ⁸⁹Zr as a

medical radioisotope on a variable energy cyclotron and external beam-line”, EJNMMI Physics. (AIS = 1.008, IF = 3.0, SRI = 1.744, Q1).

III. Lucrări prezentate la conferințe internaționale (2021-2024)

1. Diana Cocioabă, Radu Leonte, **Roxana Tudoroiu-Cornoiu**, Bogdan Burghilea, Radu Șerban, Dragoș-Andrei Niculae, Simona Băruță, Andrei Necșoiu și Dana Niculae (2024), “ ^{64}Cu and ^{89}Zr – emerging radioisotopes produced at Radiopharmaceutical Research Centre @IFIN-HH”, The 6th Romanian Congress of Nuclear Medicine together with the 2nd edition of International Conference of Applying Radionuclides in Therapy (ART), 21 – 23 Martie, Brașov, România (*prezentare tip poster*).
2. Andrei Necșoiu, Diana Cocioabă, Simona Băruță, **Roxana Tudoroiu-Cornoiu**, Radu Leonte, Dana Niculae (2024), “Production, characterization and translation of radioisotopes of medical interest at the Radiopharmaceuticals Research Center (IFIN-HH, CCR)”, The 6th Romanian Congress of Nuclear Medicine together with the 2nd edition of International Conference of Applying Radionuclides in Therapy (ART), 21 – 23 Martie, Brașov, România (*prezentare tip poster*).
3. Dana Niculae, Radu Șerban, Livia Chilug, Dragoș Andrei Niculae, Diana Cocioabă, **Maria-Roxana Cornoiu**, Anca Dinischiotu, Ionela Neagoe, Gina Manda (2023), “Investigation of therapeutic effect, associated hypoxia and antioxidant signaling induced by copper-64 in colon carcinoma”, 25th iSRS, 22-26 Mai, Honolulu, Hawaii (*prezentare orală*).
4. Ivanna Hrynychak, Diana Cocioabă, Radu Leonte, Magda Silva, **Roxana Cornoiu**, Dana Niculae, Antero Abrunhosa (2023), “GMP Production of Copper-64 for antibody and nanobody radiolabeling: liquid vs solid target”, 25th iSRS, 22-26 Mai, Honolulu, Hawaii (*prezentare tip poster*).
5. Diana Cocioabă, Radu Leonte, Bogdan Burghilea, **Roxana Cornoiu**, Radu Șerban, Alina Raicu, Simona Băruță, Andrei Necșoiu, Dana Niculae (2023), “Pharmaceutical grade processing of ^{89}Zr and ^{64}Cu medical radioisotopes”, 10th Balkan Congress of Nuclear Medicine together with 5th Romanian Congress of Nuclear Medicine, 15 – 18 Martie, București, România (*prezentare tip poster + prezentare orală*).
6. Radu Șerban, Dragos Niculae, Ionela Neagoe, **Roxana Cornoiu**, Diana Cocioabă, Mihaela Temelie, Gina Manda, Anca Dinischiotu, Dana Niculae (2023), “*In vitro*

- assessment of cellular response to the internal radiotherapy delivered by Auger-electron and beta emissions of Copper-64”, 10th Balkan Congress of Nuclear Medicine together with 5th Romanian Congress of Nuclear Medicine, 15 – 18 Martie, București, România (*prezentare tip poster + prezentare orală*).
7. **Roxana Cornoiu**, Livia Chilug, Radu Șerban, Radu Leonte, Diana Cocioabă, Bogdan Burghilea, Alina Raicu, Dana Niculae (2023), “Radiolabeling of peptides with copper-64 as part of drug development process”, 10th Balkan Congress of Nuclear Medicine together with 5th Romanian Congress of Nuclear Medicine, 15 – 18 Martie, București, România (*prezentare tip poster + prezentare orală*).
 8. Diana Cocioabă, **Roxana Cornoiu**, Radu Leonte, Bogdan Burghilea, Dana Niculae (2022), “Optimization of the cyclotron radioisotopes production and purification process using an automated solid targets irradiation system”, European Nuclear Physics Conference (EuNPC), 24 – 28 Octombrie, Santiago de Compostela, Spania (*prezentare tip poster*).
 9. Diana Cocioabă, Radu Leonte, Alexandra Fonseca, Bogdan Burghilea, **Roxana Cornoiu**, Livia Chilug, Antero Abruñosa and Dana Niculae (2022), “Comparative study on ^{64}Cu production on variable energy cyclotrons TR-19 (ACSI) /KIUBE (IBA) using solid and liquid targets”, European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (*prezentare orală*).
 10. Livia Chilug, Dana Niculae, Radu Leonte, Gina Manda, Radu Serban, **Maria-Roxana Cornoiu** (2022), “Preclinical assessment of nanoparticles conjugated with ^{64}Cu ”, 24th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 29 Mai - 2 Iunie, Nantes, Franța (*prezentare tip poster*).
 11. Radu Serban, Dana Niculae, Gina Manda, Ionela Neagoe, **Roxana Cornoiu**, Dragos Niculae, Mihaela Temelie, Anca Dinischiotu (2021), “Assessment of cellular response to internal radiotherapy delivery by Auger-electrons emissions of Cu-64”, Adaptation of the tumour and its ecosystem to radiotherapies, 22-25 Septembrie, Le Bono, Vestul Franței (*prezentare orală*).
 12. Radu A. Leonte, Diana S. Cocioabă, Ramona D. Dusman, Bogdan G. Burghilea, Simona I. Baruta, **Roxana M. Cornoiu**, Liviu S. Craciun, Dana Niculae (2021), “Production of Cu-64 on an automated irradiation and processing system – Process validation”, Ninth International Conference on Radiation in Various Fields of Research (RAD), 14-18 Iunie, Herceg Novi, Muntenegru (*prezentare orală*).

IV. Lucrări acceptate pentru prezentarea la conferințe internaționale (2025)

1. Dana Niculae, **Maria-Roxana Tudoroiu-Cornoiu**, Adina Gabriela Puiu, Radu Anton Leonte, Diana Cocioabă, Radu Șerban, Dragoș Andrei Niculae, Alina Catrinel Ion (2025), “⁸⁹Zr-radiolabeling of p-NCS-Bz-DFO-anti-HER2 affibody immunoconjugate and *in vitro* assessment of its potential in HER2+ breast cancer imaging ”, 26th iSRS, 11-15 Mai, Australia (*prezentare orală*).