



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	101999900764524
Data Deposito	03/06/1999
Data Pubblicazione	03/12/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

SINTESI ED UTILIZZO DI BIOTINA2-DTPA-GADOLINIO 157, 159 PER RADIO-TERAPIA

TS 99 A 0000009



Descrizione del brevetto per Invenzione Industriale avente per titolo: Sintesi ed utilizzo di biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 per Radio-Terapia.

Richiedente ed Inventore: Dott. NACCI GIUSEPPE, residente in 34125 TRIESTE (TS) - Via San Zaccaria, 6 - Codice Fiscale NCC GPP 64B26 L424O.

5 Rappresentato dal Mandatario: STUDIO TECNICO S.A.I. S.a.s., avente sede in 34122 Trieste - Via Imbriani 2, Codice Fiscale e Partita IVA 00829000322, nella persona del Dott. BOSCHIN ADRIANO - Consulente in Proprietà Industriale - iscritto all'Albo dei Mandatari presso l'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi al N° BM 501.

10 Domanda di Brevetto depositata il: 03 GIU. 1999
con Verbale N°

O ----- O ----- O

Sintesi ed utilizzo di biotina₂-DTPA Gadolinio-157,159 per Radio-Terapia.

STATO DELLA TECNICA

- 15 La diagnostica per immagini basata in passato sulla sola radiologia convenzionale, si è successivamente ampliata alla Scintigrafia planare o tomografica. Quest'ultima è basata sull'iniezione endovenosa di isotopi radioattivi *gamma*-emittenti, quali mezzi di contrasto (MDC), e sull'acquisizione quindi delle immagini tramite particolari tomografi, detti Gamma-Camere (G.C.).
- 20 In base al radionuclide impiegato, può essere eseguita una Tomografia ad Emissione di Fotone Singolo, S.P.E.T., (utilizzando dell'Indio 111, dello Iodio 131 o del Tecnezio 99^m) oppure una Tomografia ad Emissione di Positrone, P.E.T., (utilizzando del Fluoro 18).

Grazie a tale tecnica è possibile rilevare i tre momenti fondamentali della
25 diagnostica oncologica:

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



- 1) localizzazione della lesione sospetta;
- 2) accertamento, se possibile, della sua natura tumorale maligna;
- 3) stadiazione (*staging*).

Le radiazioni *gamma* emesse dai radionuclidi impiegati, a differenza di quelle
5 *beta* o *alfa*, hanno un effetto tossico sull'organismo molto basso, e pertanto quasi trascurabile.

La Scintigrafia ha però un importante limite intrinseco nella bassa Risoluzione Spaziale (R.S.) delle immagini ottenute. D'altra parte è in grado di captare concentrazioni estremamente basse di sostanza radioattiva *gamma*-emittente (1 E'
10 ^{10, -12} moli / grammo di tessuto biologico).

Per tentare di risolvere questi problemi è stata introdotta la Eco-Tomografia (E.T.), la quale opera in assenza di radiazioni ed è di facile esecuzione. Essa si è ampiamente diffusa, dato il suo basso costo di utilizzo ed ha aperto alla diagnostica nuove prospettive nel campo dello *screening* dei pazienti e del
15 *follow-up* delle patologie riscontrate, quali ad esempio il monitoraggio ecografico del fegato per la localizzazione di noduli neoplastici da trattare con alcolizzazione eco-guidata, neoplasie del tubo digerente o mammarie (Ecografia duttulo-radiale) e, in ultimo, il recente impiego della stessa E.T. con velocimetria *color-doppler*, per la valutazione della vascolarizzazione di neoplasie solide.
20 Recentemente, la E.T. ha cominciato ad avvalersi anche dell'impiego di mezzo di contrasto (MDC), sostanzialmente microbolle d'aria, con risultati iniziali di buona visualizzazione.

Un altro metodo diagnostico è la Tomografia Computerizzata a raggi X (T.C.X.), basata sull'impiego di radiazioni X che, dopo il loro passaggio attraverso sezioni
25 progressive dei tessuti corporei del paziente, vengono dettati da cristalli

Dott. Adriano BOSCHIN



scintillatori, accoppiati a fotodiodi per essere quindi analizzate dal computer. Essa è stata una evoluzione della precedente Tomografia a raggi X (T.X.), ideata negli anni '30 da Vallebona, evoluzione basata sull'impiego del computer, e che ha sostanzialmente rivoluzionato la moderna diagnostica per immagini.

5 L'esame T.C.X. è panoramico, standardizzabile, non operatore-dipendente, e ripetibile. Elevata è la risoluzione di contrasto e spaziale, che ha così colmato le lacune della Scintigrafia e dell'E.T., consentendo alla moderna Medicina di attuare protocolli diagnostici e di stadiazione per neoplasie quasi unicamente su base T.C.X.

10 Tramite iniezione di Iodio 127 (MDC), la T.C.X. è oggi in grado di fornire dati ancora più precisi e dettagliati del tumore e delle sue eventuali metastasi.

E' stato successivamente all'introduzione della T.C.X. che è apparsa la Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare, T.R.M.N.; essa è definita in letteratura come "quella tecnica che, in assenza di radiazioni ionizzanti, utilizza il
15 fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare (R.M.N.) con la finalità di formare immagini di sezioni corporee, quindi propriamente immagini tomografiche".

Le immagini ottenute con la T.R.M.N. sono sostanzialmente dipendenti dalle diverse proprietà locali dei nuclei atomici misurati in vivo, nel paziente: la
20 densità dei nuclei, la costante del tempo di rilassamento longitudinale (T1) e la costante del tempo di rilassamento perpendicolare (T2, o T2 stella).

La R.M.N. è pertanto una tecnica particolarmente attraente poiché è possibile modificare, tramite la scelta di misurazione voluta, il ruolo particolare di ciascuna delle tre proprietà indicate sopra, ricercando la combinazione empirica capace di
25 portare al maggior contrasto di visualizzazione per la patologia ricercata.

Dott. Adriano BOSCHIN



Le nuove sequenze di segnale, definite veloci e ultraveloci, risolvono inoltre l'importante questione di come visualizzare gli aspetti dinamici e funzionali di organi e apparati in movimento, in sede toracica e addominale, nonché di ridurre i tempi di acquisizione per esami estesi a grandi masse volumetriche, con tempi minimi, teoricamente di pochi minuti per un esame completo del paziente (total body).

Dott. Adriano BOSCHIN

Inoltre, tale indagine strumentale prevede la possibilità di iniettare nel circolo ematico particolari sostanze, che possono essere impiegate come mezzi di contrasto, allo scopo di ben evidenziare particolari molecole o tessuti. Queste sostanze sono paramagnetiche, o ferromagnetiche, poichè inducono alterazione dell'omogeneità del campo magnetico locale. Fra esse, particolare importanza è stata assunta dal Gadolinio 157.

Tali sostanze di contrasto, esplicano la loro azione nei confronti delle molecole d'acqua: in particolare, interagiscono con i protoni idrogeno che risuonano modificandone i tempi di rilassamento, con conseguente variazione del naturale contrasto intrinseco.

L'elemento paramagnetico o ferromagnetico, agendo da accettore di energia, rende più veloce la transizione energetica *spin-reticolo*, e accorcia il T1 del tessuto dove è disperso.

Fin qui i sistemi diagnostici più usati per la ricerca e stadiazione di neoplasie.

Per quanto riguarda invece la cura dei tumori in stadio avanzato, cioè con metastatizzazione a distanza, attualmente essa viene eseguita generalmente con Radio-Terapia Esterna (R.T.E.) a medio-grande campo, detta anche R.T.E. su Volume Bersaglio Clinico (*Clinical Bersaglio Volume* o C.T.V.), associata a Chemio-Terapia sistemica (CH.T.), ove la R.T.E. è finalizzata alla sterilizzazione

TS 99 A 000009



sia della massa tumorale visibile alla T.C.X., o alla T.R.M.N. (la Scintigrafia e la E.T. non lo consentono, soprattutto per scarsa risoluzione spaziale), sia del volume tissutale ove è presupponibile o parzialmente evidenziabile la presenza di localizzazione maligna microscopica (Volume Bersaglio Clinico), mista a tessuto
5 biologico normale, costituito da parenchima d'organo, vasi sanguigni, fasci nervosi, connettivo, tessuto linfonodale.

Dott. Adriano BOSCHIN

La CH.T. sistemica, eseguita tramite iniezione endovenosa della stessa, è invece diretta alla distribuzione della sostanza tossica in tutto l'organismo, poichè mirata alla sterilizzazione di tutte le cellule in accrescimento, comprese quindi anche
10 quelle neoplastiche.

I danni ai tessuti sani dovuti alla R.T.E. a medio-grande campo rendono però molto spesso impossibile il raggiungimento della dose tossica al tumore a livelli terapeuticamente efficaci, a causa della relativa resistenza alle radiazioni delle cellule tumorali rispetto ai tessuti sani, resistenza che, se misurata in termini di
15 CDE (Crono-Dose-Eritema) fornisce valori differenziali notevoli, con dose terapeutica necessaria di 2-3 CDE per i linfomi, di 6-7 CDE per i carcinomi e di 9 CDE per i melanomi, rispetto alle dosi massime tollerabili per i tessuti sani (0,21-1,5 CDE).

Analogamente alla R.T.E. a medio-grande campo, anche la CH.T. spesso non
20 raggiunge la dose tossica al tumore a livelli terapeuticamente efficaci, a causa soprattutto dei gravi effetti sul midollo osseo, ove la dose massima tollerabile (in termini CDE se paragonata alla R.T.E.) non può superare il valore limite di 0,21-0,23 CDE.

D'altra parte, le cellule tumorali presentano sulla loro superficie particolari
25 antigeni, o più propriamente degli epitopi, che non vengono espressi dalle cellule

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



sane, o lo sono in misura molto bassa.

Verso la fine degli anni '80, sia per questioni legate alla diagnostica per immagini della neoplasia, sia per questioni legate ad una sua possibile terapia, si iniziò lo sviluppo di nuove metodiche, dirette alla captazione specifica ed esclusiva, in vivo nell'uomo, di ammassi cellulari ben definiti come le neoplasie, primitive o metastatiche.

Ciò utilizzando particolari molecole, dette Anticorpi Monoclonali, (MoAbs), essendo capaci di riconoscere gli epitopi suddetti, veicolandosi pertanto su di essi, e quindi sulle sole cellule tumorali, restando poi agganciati alle stesse fino ad un massimo di circa 48-72 ore.

Si pensò infatti che, legando a tali MoAbs particolari molecole marcatrici, si potevano migliorare almeno due delle quattro modalità di rilevazione esterna per diagnosi oncologica indicate sopra:

1). La Scintigrafia tomografica con radionuclidi a sola emissione gamma (S.P.E.T e P.E.T.) che, se attuata con ausilio di MoAbs, prende oggi il nome di Immuno-Scintigrafia (I.S.).

2). La Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare (T.R.M.N.), eseguita tramite traccianti paramagnetici o ferromagnetici, fondamentalmente riconducibili a Gadolinio 157 e Magnetite (Fe_2O_3) che, se attuata con ausilio di MoAbs, prende oggi il nome di Immuno-Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare (I.T.-R.M.N.).

Sul versante terapeutico, l'impiego dei MoAbs risultò particolarmente utile, poichè a questi ultimi potevano anche essere legate delle sostanze tossiche radioattive cioè ad emissione beta come l'Ittrio 90 (Radio-Immuno-Terapia, R.I.T.), oppure sostanze tossiche non radioattive, impiegate in Chemio-Terapia

Dot. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



(Chemio-Immuno-Terapia, C.I.T.) o, infine, sostanze adiuvanti le difese immunitarie, come il Fattore di Necrosi Tumorale, T.N.F. (TNF-Immuno-Terapia, TNF-I.T.).

5 Negli ultimi 15 anni, circa 300 tipi di MoAbs sono stati impiegati in ricerca, in diagnostica ed in terapia.

Si può sostanzialmente affermare che la maggior parte di essi hanno dimostrato di conservare buone capacità di accumulo in sede tumorale, ma purtroppo con lunga permanenza nel circolo ematico e inoltre con notevole accumulo a livello del fegato, della milza e soprattutto del midollo osseo (Sistema Reticolo
10 Endoteliale, S.R.E.).

Incide inoltre la bassa percentuale di accumulo al tumore degli anticorpi iniettati, pari a circa lo 0,01% della dose totale somministrata, e la bassa diffusibilità dei MoAbs all'interno dei tumori, per ragioni legate alla elevata pressione interstiziale delle neoplasie.

15 Per ridurre il problema di accumulo aspecifico e quello di una prolungata permanenza in circolo dei MoAbs, si sono allora ricercati altri sistemi per ottenere indici di miglioramento nella localizzazione tumorale, tali da consentire una maggiore sensibilità diagnostica in vista di applicazioni terapeutiche.

Idealmente, l'alta specificità dei MoAbs si sarebbe potuta sfruttare al meglio
20 somministrando la sostanza marcatrice solo quando l'anticorpo, non legato al tumore, fosse stato completamente eliminato dal circolo ematico e dal S.R.E., restando quindi solo l'anticorpo legato alle cellule tumorali della neoplasia primitiva e delle metastasi.

Per ottenere questo risultato, la sostanza desiderata avrebbe dovuto dimostrare la
25 capacità di una sua rapida diffusione attraverso i tessuti, per essere poi catturata

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



dall'anticorpo già legato alle cellule tumorali.

Tali considerazioni condussero pertanto al concetto di pre-targeting tumorale, metodica in cui i MoAbs e la sostanza marcatrice vengono somministrati separatamente.

- 5 In vivo, un buon strumento per convogliare tale sostanza sull'anticorpo già presente sul tumore si è dimostrato essere il sistema avidina-streptoavidina-biotina: in tale metodica viene sfruttata l'alta affinità di legame della biotina (legata a MoAbs) per l'avidina e per la streptoavidina, e di queste ultime con ulteriore biotina, a sua volta complessata tramite chelanti, come il DTPA, il
- 10 DOTA, o il PDTA a queste particolari molecole marcatrici R, dove R = agente di segnale fisico per rilevazione esterna (I.S. in SPET, I.S. in PET, I.T.-R.M.N.), oppure sostanza adatta per terapia (R.I.T., C.I.T., TNF-IT.).

Il sistema, recentemente provato con biotina₂-DTPA-R, ha dimostrato di essere privo di tossicità per i tessuti e gli organi sani del paziente, di avere una buona

15 sensibilità, in relazione anche alle dimensioni della neoplasia e, se impiegato con buoni MoAbs, un'ottima specificità per il tumore stesso.

Il sistema di pre-targeting si caratterizza per i seguenti passaggi:

1) i MoAbs biotinilati vengono iniettati nel paziente e si aspetta che una certa parte di essi venga captata dagli antigeni tumore-associati delle cellule

20 neoplastiche;

2) ventiquattro ore dopo l'infusione dei MoAbs biotinilati si inocula nel paziente l'avidina e la streptoavidina (a 30 minuti di distanza l'una dall'altra). L'avidina ha fondamentalmente il ruolo di lavaggio dei MoAbs biotinilati ancora circolanti, dato che questi ultimi tenderebbero a restare in circolo per molti giorni. Il

25 complesso MoAbs biotinilati-avidina viene rapidamente precipitato e

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



internalizzato dal S.R.E., soprattutto a livello epatico. La streptoavidina, iniettata 30 minuti dopo l'avidina, comincia a complessarsi con i MoAbs biotinilati, legati a loro volta gli antigeni di superficie delle cellule tumorali;

3) si aspetta ancora un giorno, poi si inietta albumina biotinilata e, 30 minuti dopo, la biotina₂-DTPA-R (o altro chelante: biotina-LC-DOTA-R, biotina-PDTA-R, etc.). L'albumina biotinilata elimina dal circolo la streptoavidina ancora circolante, poiché a 24 ore di distanza la quantità di streptoavidina presente in circolo è stimata di circa il 25% della quota di streptoavidina inizialmente infusa.

10 La biotina₂-DTPA-R si lega alla streptoavidina, quest'ultima complessata ai MoAbs biotinilati, e già adesi al tumore, consentendo così di legare la sostanza R al tumore.

Nel caso di R = Indio 111 (I.S.), il complesso biotina₂-DTPA-Indio 111 ha dimostrato un tempo di dimezzamento molto rapido: dopo 2 ore, il 50-60% della biotina₂-DTPA-Indio 111 è nelle urine e solo il 10% è ancora circolante. Solo il 15 3% della biotina₂-DTPA-Indio 111 è localizzato al fegato ed il 2% si concentra ai reni.

Nell'uomo, la percentuale di accumulo al tumore degli anticorpi iniettati, e quindi della biotina₂-DTPA, resta comunque molto bassa, pari a circa lo 0,01% della dose totale iniettata, per grammo di tumore, pari cioè a circa $5 \cdot 10^{-10}$ moli / grammo di tessuto biologico nel caso di I.S. con -biotina₂-DTPA- Indio 111.

Fra le diverse sostanze tossiche proposte in letteratura, e attualmente usate nei Centri che si occupano di terapia dei tumori con impiego di MoAbs, quelle radioattive (possibilmente ad emissione sia beta che gamma) sono quelle preferite rispetto alle sostanze tossiche non radioattive poiché, emettendo

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



contemporaneamente radiazioni ionizzanti sia di tipo beta che di tipo gamma, presentano i seguenti vantaggi:

- 1) azione terapeutica dovuta alle radiazioni beta; queste, avendo un raggio di portata di circa un millimetro, possono infliggere gravi danni al tessuto neoplastico se in quantità sufficiente; questa azione terapeutica è misurabile poichè rapportabile con precisione all'emissione di radiazioni gamma, rilevabili dall'esterno. In base alle diverse CDE richieste per ciascun tipo di neoplasia, si stima necessario raggiungere concentrazioni di radioattività variabili da 20 a 90 microCurie (0,74-3,3 Rutherford o MegaBequerel) di radioisotopo per grammo di tumore, purchè per un tempo di permanenza totale dello stesso sulla cellula tumorale con intensità di dose sopramenzionate pari ad almeno il tempo di dimezzamento fisico del radionuclide, a fronte di una dose totale iniettabile massima di 80-120 milliCurie (2,9-4,4 KiloRutherford o GigaBequerel) di radioattivo, beta-emittente, e purchè legato alla biotina-chelante (biotina₂-DTPA, biotina-LC-DOTA, biotina-PDTA), allo scopo di evitare il suo accumulo preferenziale sul midollo osseo, sul fegato e sulla milza (S.R.E). Il tempo di dimezzamento fisico del radioisotopo dev'essere superiore ad almeno 10 ore ed inferiore alle 72 ore, ciò allo scopo di evitare da un lato i rischi di danno indiretto da radiazione al midollo osseo, anche se il radioisotopo è legato alla biotina (essendo transitoriamente presente nel circolo ematico per 2-3 ore), e dall'altra parte non deve avere un tempo di dimezzamento fisico troppo lungo, a causa del tempo medio di permanenza dei complessi molecolari di MoAbs biotinilati-streptoavidina-biotina radioattiva sul tumore, in genere non superiori alle 72 ore circa.
- 2) Azione di radio-localizzazione, dovuta alle stesse radiazioni gamma detettabili

Dott. Adriano BOSCHIN



all'esterno del corpo del paziente, tramite Gamma-Camere, consentendo così ai medici di vedere la localizzazione della radioattività sul tumore. Estremamente importante considerare che l'individuazione precisa del cercone neoplastico periferico e delle sue diramazioni esterne, con le localizzazioni metastatiche
5 satelliti, renderebbe inutile la R.T.E. a medio-grande campo su Volume Bersaglio Clinico (*Clinical Bersaglio Volume* o C.T.V.), ove la R.T.E. è finalizzata alla sterilizzazione sia della massa tumorale visibile alla T.C.X., o alla T.R.M.N., sia del volume tessutale ove è presupponibile o parzialmente evidenziabile la presenza di localizzazione maligna microscopica (Volume Bersaglio Clinico),
10 mista a tessuto biologico normale.

L'azione di radio-localizzazione, consentita teoricamente dalle radiazioni gamma, detettabili all'esterno del corpo, consentirebbe invece una R.T.E. selettiva e mirata sulle sole zone neoplastiche, senza più obbligo di R.T.E. estesa a grandi volumi di tessuto sano.

15 Idealmente, se fosse possibile misurare, ad esempio in termini CDE, la quantità di radio-farmaco accumulatosi sul tumore, quantificando poi il danno inflitto da questo sul tumore, e si sommasse tale danno a quello della R.T.E., selettiva e mirata sulle sole zone neoplastiche, allora sarebbe possibile ottenere la stima di danno complessivo raggiunto sul tumore primitivo e sulle sue metastasi, tentando
20 così di raggiungere i livelli di dose terapeutici indicati in letteratura medica come livelli di dose ottimale, o curativi, prima menzionati: con tali dosaggi terapeutici è stato documentato, in 30 anni di lavori scientifici, la piena capacità di remissione della malattia per molti anni (20-30), in una percentuale di pazienti molto elevata (90%).

25 Sarebbe così possibile teorizzare una R.T.E. successiva alla R.I.T., quest'ultima

Dott. Adriano BOSCHIN



eseguita per via sistemica, in pre-targeting, attraverso l'infusione nel paziente di sostanze radioattive caratterizzate da elevato accumulo sul tumore primitivo e sulle sue metastasi, grazie ai MoAbs iniettati precedentemente.

5 Tali questioni condussero pertanto a sviluppare, ancora prima dell'avvento dei MoAbs per la diagnostica e della terapia dei tumori, sistemi di produzione di sostanze radioattive a costo contenuto, presso Centri di ricerca di Fisica, tali da permettere il loro utilizzo su vasta scala, anche in ospedali lontani, in reparti clinici o diagnostici adattati allo scopo.

10 Attualmente, i processi di produzione di radioisotopi sono eseguiti mediante acceleratori di vario tipo, quali il Tandem Van de Graaf, il LINAC, sincrotroni, sicrociclotroni o ciclotroni commerciali, tutti in grado di accelerare fasci di protoni, deuteroni ed elioni, in un range di energia variabile da alcuni MeV ad alcune decine di Mev, dirigendoli poi verso particolari bersagli, costituiti dalla sostanza che si vuole trasformare in molecola radioattiva.

15 Le installazioni destinate alla produzione del radioisotopo prescelto devono essere inoltre dotate delle necessarie attrezzature per il processamento dello stesso, con sua estrazione dagli altri sottoprodotti della reazione nucleare, e quindi per la sua complessazione con chelanti e altre sostanze, per la sua trasformazione nel radiofarmaco desiderato.

20 Queste attrezzature sono sostanzialmente basate su un Modulo Automatico di Sintesi Chimica (M.A.S.C.), dotato di diversi sottosistemi quali una Cella di Sintesi Chimica (C.S.C) e sistemi di misurazione della sostanza prodotta.

Il M.A.S.C. può essere programmato per effettuare un certo numero di processi chimici organici ed inorganici (con controllo a distanza oppure in modo
25 completamente automatico), sotto il controllo di un computer. La flessibilità del

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



programma hardware e software, permette di effettuare le operazioni chimiche richieste, quali l'addizione dei reagenti e dei solventi, il trasferimento dei reagenti e dei prodotti tramite Vials; la cromatografia e purificazione attraverso una successione di singoli passaggi dei quali viene prefissato il tempo.

- 5 La sostanza chimica da trasformare in molecola radioattiva, presente generalmente sotto forma liquida di cloruro, scorrendo in idonee tubature raggiunge il pozzo d'irradiazione dell'Acceleratore di particelle, dove un sistema automatico provvede ad irradiarlo nella maniera più opportuna per avere la massima resa di radioattività. Terminata l'irradiazione ed ottenuta così la mistura
- 10 liquida radioattiva desiderata, essa è automaticamente portata nella C.S.C., ove avverrà la manipolazione vera e propria. In questo luogo si eseguiranno tutte le operazioni (automatiche o manuali), ritenute idonee per legare l'isotopo alla sostanza farmaceutica desiderata. Vengono utilizzati dei sistemi di regolazione di flusso, di pressione, oltre che di monitoraggio della produzione, al fine di
- 15 ottimizzarne le rese.

Il M.A.S.C. è costituito da diverse componenti fondamentali:

- computer di controllo (in automatico e in manuale);
- connessione del computer con l'Acceleratore di particelle;
- sistema pneumatico di trasporto gas al pozzo d'irradiazione e alla C.S.C.;
- 20 - pozzo d'irradiazione dell'acceleratore di particelle;
- tubatura in acciaio per il trasporto della mistura radioattiva liquida, mista al bersaglio, anch'esso in forma liquida, dal pozzo d'irradiazione alla C.S.C.;
- STD Bus;
- modulo di controllo (relays);
- 25 - Cella per la Sintesi Chimica (C.S.C.).

Dott. Adriano BOSCHIN



TS 99 A 000009

Fin qui i progressi raggiunti dalla tecnologia per la messa a disposizione della Medicina di sostanze radioattive da impiegare nell'uomo, per diagnostica o per terapia dei tumori.

La via terapeutica basata sulla R.I.T., in associazione a successiva R.T.E. mirata e
5 selettiva, sfruttando l'I.S. (SPET o PET) consentita dallo stesso radioisotopo
come ad esempio lo Iodio 131, (beta emittente e gamma-emittente), non ha però
apportato sinora i risultati sperati per l'oggettiva difficoltà a visualizzare il
tumore radioattivato per via della cattiva risoluzione spaziale delle immagini
ottenute (rendendo impossibile un'accurata R.T.E.), pur sfruttando i tomografi
10 scintigrafici della Medicina Nucleare (Gamma-Camere).

Viceversa, la I.T.-R.M.N. ha dimostrato, rispetto alla I.S., di poter visualizzare
con estrema nitidezza sezioni corporee umane molto piccole (risoluzione spaziale
inferiore al millimetro), e con capacità di detezione di quantità estremamente
minime di sostanze paramagnetiche o ferromagnetiche legate a MoAbs ed
15 inoculate nel paziente come mezzo di contrasto (I.T.-R.M.N.), anche se in
concentrazioni minime ($\cong 1 \text{ E}^{-10}$ moli / grammo di tessuto), quantità
sorprendentemente simili alle concentrazioni limite ottenibili dalla scintigrafia e,
più propriamente, dalla I.S., tradizionalmente indicata come la più sensibile fra
tutte le tecniche diagnostiche per captare concentrazioni così basse di radioattivo
20 gamma-emittente (MDC), ma purtroppo caratterizzata, la stessa I.S., da scarsa
risoluzione spaziale (ordine di qualche centimetro per organi profondi).

Recenti lavori come quelli di Go del 1994, di Weisslender del 1994, di Harika del
1995, e di Nunn del 1997, hanno infatti dimostrato la possibilità di detettare
quantità estremamente minime di Gadolinio 157 o di Magnetite, se legate a
25 macromolecole lentamente ruotanti, poichè essendo molecole di elevato

Dott. Adriano BOSCHIN



ingombro sterico come MoAbs, streptoavidina, albumina, catene glucosilate e dendrimeri, facilitano notevolmente la cessione di energia da parte del protone risonante, con ulteriore accorciamento dei tempi di rilassamento spin-reticolo, tutto ciò in dipendenza dell'intensità del campo magnetico applicato e soprattutto
5 della sequenza di segnale prescelta. In particolare, sotto l'aspetto dell'incremento di segnale indotto da macromolecole con ausilio di particolari sequenze di segnale, è esemplificativo il lavoro di Harika del 1995, che ha dimostrato buona capacità di segnale, in sequenze *Gradient Echo* in 3-D con molecole di Gadolinio 157-DTPA-glucosio, giungendo a valori limite di 2-5 nanomoli / grammo di
10 tessuto biologico contro i valori generalmente 1.000 volte più alti del Gadolinio 157 che bisogna avere, se quest'ultimo viene impiegato con il solo chelante (DTPA-Gadolinio 157).

E' estremamente importante aggiungere che queste sostanze paramagnetiche o ferromagnetiche, se legate a buoni MoAbs (I.T.-R.M.N.), consentono inoltre una
15 elevatissima specificità di localizzazione di lesioni particolari, come gli epitopi tumorali, rispetto alla normale T.R.M.N., anche se eseguita con mezzo di contrasto ferromagnetico o paramagnetico, e con macromolecole ad elevato ingombro sterico, ma senza MoAbs per la veicolazione specifica delle sostanze di contrasto (Gadolinio o Magnetite) sulla sola area patologica.

20 SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione degli utilizzatori una sostanza che abbia buone capacità radio-terapeutiche (R.I.T.) e contemporaneamente sufficienti caratteristiche di localizzazione in Immuno-Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare (I.T.-R.M.N.), per dosimetria in
25 vivo e quindi per successiva R.T.E. mirata a piccolo campo, quest'ultima

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



accuratamente calcolata in base alle informazioni acquisite dalla I.T.-R.M.N. stessa.

Tale scopo viene raggiunto dal radiofarmaco biotina₂-DTPA-Gadolinio 157-159, con tracce di DTPA-Gadolinio 157-159, prodotto in un Modulo Automatico di Sintesi Chimica (M.A.S.C.) da cloruro di Gadolinio 157, in HCl 0,04 N, con sua
5 complessazione con biotina₂-DTPA, e DTPA, nella formulazione finale di radiofarmaco sterile e apirogeno, adatto per inoculo endovenoso nell'uomo.

Questo radiofarmaco è l'ultima componente di una metodica di pretargeting caratterizzata dalla somministrazione parenterale sequenziata delle seguenti
10 componenti:

- 1) MoAbs biotinilati;
- 2) avidina;
- 3) streptoavidina;
- 4) albumina biotinilata,
- 15 5) biotina₂-DTPA-R.

Per la produzione del radiofarmaco biotina₂-DTPA-Gadolinio sono necessari i seguenti materiali:

Biotina₂-DTPA (*Diethylenetriaminepentaacetic acid α ω -bis (biocytinamide)*, FW 1102.3; (2,5 micromoli / mL, pari a circa 2,5 mg /mL) in volume di 1 mL.

20 Colonna di resina Dowen-50, oppure amalgama di sodio;

Colonna di resina Sephadex G-25;

Sodio citrato, pH 3,4; 0,05 M. (1,5 mL)

Sodio citrato pH 5; 0,2 M, (0,5 mL).

cloruro di Gadolinio 157 (500 nanomoli / 0,5 mL)

25 DTPA, 1 mg, disciolto in 0,5 mL di sodio citrato (pH 5; 0,1 M).

Dott. Adriano BOSCHIN



Acqua sterile fisiologica (2 mL).

Cloruro di Gadolinio 159 (radioattivo)

I requisiti richiesti per il Gadolinio cloruro ($^{159}\text{GdCl}_3$) sono elencati nella sotto riportata tabella:

Dosaggio per paziente:	60 mCi / metro quadrato di superficie corporea
^{159}Gd :	$T_{1/2} = 18,5 \text{ hr}$
Concentrazione radioattiva	usualmente > 100 milliCurie / mL ($> 4 \text{ GBq / mL}$)
Attività specifica:	1 Ci / microgrammo
Purezza radiochimica:	$\geq 97 \%$ come $^{159}\text{GdCl}_3$
Purezza radionuclidica:	$\geq 99\%$ come ^{159}Gd ($^{158}\text{Gd} \leq 10\text{E}-2 \%$)
Purezza chimica:	La concentrazione delle singole impurità, al momento della calibrazione dosimetrica, dev'essere: per Fe, Sr, Al, Zn, Ba $< 5 \text{ ppm}$, e degli altri metalli $< 2 \text{ ppm}$.
pH:	< 2 (o se in acetato, o citrato: pH 6)
Stoccaggio:	A temperatura ambiente ($15-25^\circ \text{ Celsius}$)
Scadenza:	8-10 ore dopo la data di calibrazione
Soluzione:	0,04 N di acido cloridrico oppure 0,5 N di tampone acetato.
Contenitore preferito:	Vial conica dal volume di 7 mL con tappo in <i>teflon</i> ,
<i>Massima attività teorica di Gadolinio 159 :</i>	
$\ln 2 \times \frac{\text{N. di Avogadro}}{T_{1/2}} \times \frac{1 \text{ Curie}}{\text{g. atomi } ^{159}\text{Gd}} = 3,7 \text{ E} + 10 \text{ DPS}$	
Dove:	
$\ln 2$	$= 0,6931$
$T_{1/2} \text{ } ^{159}\text{Gd}$ (in secondi)	$= 66.816$
DPS	$= \text{disintegrazioni per secondo}$
N. di Avogadro	$= 6,23 \text{ E}+23$
g. atomi ^{159}Gd	$= 159$
Quindi la massima attività teorica di Gadolinio 159 puro è:	
$\frac{0,6931}{66.816} \times \frac{6,023 \text{ E}+23}{159} \times 2,7 \text{ E}-11 = 1,07 \text{ MCi / g}$	

Dott. Adriano BOSCHIN



TS 99 A 0 0 0 0 0 9

I vantaggi derivanti dall'impiego in clinica oncologica del Gadolinio 159 sono sostanzialmente le buone caratteristiche dosimetriche (radiazioni beta con raggio di portata inferiore al millimetro) e nella buona capacità di localizzazione di tale sostanza nel paziente sotto T.R.M.N., essendo il Gadolinio 159 sovrapponibile al
5 Gadolinio 157 (non radioattivo), come capacità di segnale R.M.N.

Essendo legabile a biotina, il Gadolinio 157,159 consente una elevatissima sensibilità di segnale tramite I.T.-R.M.N., e un'elevatissima specificità di segnale dal sistema di pretargeting (MoAbs, avidina, streptoavidina, albumina biotinilata, biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159.

10 L'impiego di questo radioisotopo consente di ottenere immagini di bio-distribuzione della sostanza radioattiva estremamente nitide sia per risoluzione spaziale che per contrasto, e ciò permette di eseguire, successivamente all'inoculo del Gadolinio radioattivo (con aggiunta anche di quello non radioattivo, per incrementare il segnale di R.M.N.), accurate sedute di
15 Radioterapia Esterna (R.T.E.) stereotassica (StereO² in *Stereotactic Body Frame*) mirate unicamente alla regione più interna del tumore, precedentemente localizzata in I.T.-R.M.N., abbandonando così definitivamente il concetto della R.T.E. a medio-grande campo.

Inoltre, sempre tramite I.T.-R.M.N., è ottenibile uno studio preciso della
20 distribuzione del Gadolinio radioattivo e di quello non radioattivo nella compagine neoplastica o nelle sue adiacenze, e pertanto consentire una stima estremamente accurata e precisa della dose di radiazioni beta del Gadolinio 159 somministrate sulla neoplasia e quindi della dose di radiazioni esterne (R.T.E.) che può ancora essere somministrata senza danneggiare i tessuti sani circostanti
25 al tumore, potendo così pianificare dei precisi piani di R.T.E., diretti allo scopo di

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009

colmare il gap dosimetrico nella parte più interna del tumore (non raggiunta dal biotina₂-DTPA- Gadolinio 157,159 complessato alla streptoavidina e ai MoAbs biotinilati) con un sistema di calcolo radio-biodosimetrico unificato, come ad esempio la CDE, sia per radionuclidi beta-emittenti, quale appunto il Gadolinio
5 159, sia per sistemi avanzati di R.T.E. come quelli esistenti. (StereO²).

Ulteriori vantaggi nell'utilizzo del Gadolinio sono dati dalla sua chimica: il Gadolinio 157, non radioattivo, è attualmente impiegato in R.M.N., dimostrando buone capacità di legame chimico con svariate molecole biologiche, ultime nate dalla Ricerca scientifica, con scarsissimo accumulo al midollo osseo in caso di
10 distacco accidentale da tali molecole biologiche, molte delle quali si prestano per la veicolazione sui tumori precedentemente targhettati da MoAbs e da streptoavidina, come la biotina₂-DTPA-Gadolinio, chimicamente sovrapponibile alla biotina₂-DTPA-Indio e alla biotina₂-DTPA-Ittrio, radionuclidi già abbondantemente impiegati in Medicina Nucleare, rispettivamente per I.S. e
15 R.I.T.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno maggiormente dalla descrizione di una forma di esecuzione, preferita ma non esclusiva, della sintesi di Cloruro di Gadolinio 157,159 e sua marcatura nel complesso biotina₂-DTPA-^{157,159}Gd cloruro, illustrata a titolo indicativo e non limitativo nell'unito
20 disegno, in cui:

- la figura 1 mostra uno schema del M.A.S.C. utilizzato per la sintesi del radiofarmaco.

Per ottenere il cloruro di Gadolinio 159 si utilizza un Acceleratore di particelle ed un M.A.S.C.

25 Nel pozzo di irradiazione dell'acceleratore di particelle scorre, nelle apposite

Dott. Adriano BOSCHIN



IS 99 A 000009



tubature, cloruro di Gadolinio 157 in HCl 0,04 N. Questo materiale viene irradiato con trizio dando la seguente reazione: $^{157}\text{Gd} (t,p) = ^{159}\text{Gd}$

Viene utilizzato il Gadolinio 157, anziché il Gadolinio 158 o 160 come comunemente riportato in letteratura, in quanto, oltre ad ottenere il radionuclide desiderato (Gadolinio 159), il Gadolinio 157 impiegato come bersaglio non richiede separazione dal prodotto finale, poichè è esso stesso parte del prodotto radio-farmaceutico desiderato (biotina₂-DTPA-Gadolinio 157, 159).

La sintesi del radiofarmaco finale biotina₂-DTPA-Gadolinio 157, 159, (con tracce di DTPA-Gadolinio 157,159) dalla miscela iniziale di Europio e Gadolinio radioattivi, avviene attraverso i passaggi successivi nella C.S.C. del M.A.S.C.

In dettaglio, un sistema di pompaggio provvede a trasferire, tramite un tubo 1, la miscela di Gadolinio 157, 159 ed altri radionuclidi (sottoprodotti) in una prima Vessel 2 posta all'interno della Cella di Sintesi Chimica (C.S.C.) del M.A.S.C., con volume finale di arrivo di 1 mL netto (cioè con esclusione del materiale perso lungo tale tubo di trasporto).

Dentro la C.S.C. trovano posto oltre alla succitata Vessel 2, una seconda Vessel 3, due colonne cromatografiche 4, 5 e sei Vial 6, 7, 8, 9, 10, 11. Sopra queste due Vessels 2, 3 devono essere posti dei tappi di silicone, attraversati da tubi di teflon e acciaio per connettere le Vessels tra di loro, con il sistema di erogazione del gas, e con le sei Vial previste, le quali contengono i reagenti ed i solventi sotto specificati:

Vial 6: Sodio citrato, pH 3,4; 0,05 M. (1,5 mL)

Vial 7: Sodio citrato pH 5; 0,2 M, in volume di 0,5 mL.

Vial 8: Biotina₂-DTPA (2,5 micromoli / mL, pari a circa 2,5 mg /mL) in volume di 1 mL.

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



Vial 9: cloruro di Gadolinio 157 (500 nanomoli / 0,5 mL), con sodio citrato pH 5; 0,2 M, in volume di 0,5 mL.

Vial 10: DTPA in quantità di 1 mg, disciolto in 0,5 mL di sodio citrato (pH 5; 0,1 M).

5 Vial 11: Acqua sterile fisiologica (2 mL).

Queste Vial devono essere montate sul pannello frontale.

Le Vials 6, 7, 8, 9, 10, 11 contenenti i reagenti vengono chiuse mediante tappi metallici con interposti setti di silicone perforati. In ciascun tappo vengono inseriti due tubi di teflon. Il primo tubo serve per il passaggio del gas, contenuto
10 in un contenitore 12, che riempiendo le Vial spinge all'esterno i reagenti. Il secondo tubo serve per il passaggio dei reagenti. Quest'ultimo deve raggiungere il fondo della Vial, affinché tutto il liquido venga aspirato.

Invece i tappi delle Vessel devono essere realizzati in silicone e vengono attraversati da tubi di teflon o di acciaio.

15 La preparazione delle biotina₂-DTPA avviene nel modo seguente.

La biotina₂-DTPA, in polvere viene diluita in PBS 1 x (*Phosphate Buffered Saline*) a pH 7,4 allo scopo di arrivare ad una concentrazione di 2,5 mg/mL (2,5 micromoli/mL). Viene quindi ottenuta la sterilità e la apirogenicità con impiego di Millex-GV4 (*MILLIPORE*) da 0,22 micrometri, prima di essere introdotta nella
20 pertinente Vial 8.

In dettaglio, un primo tubo 1, di acciaio inox, attraversa il tappo che ricopre la Vessel 2. Il tubo 1 trasporta il materiale radioattivo appena prodotto, misto a bersaglio (Europio 158, Gadolinio 157, Gadolinio 159) proveniente dal pozzo d'irradiazione. Il materiale con cui è realizzato il tubo 1 serve per schermare il
25 più possibile l'ambiente dalle radiazioni gamma (363 KeV da ¹⁵⁹Gd, 898 KeV e

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



944 KeV da ^{158}Eu). Il tubo 1 deve estendersi per almeno cinque centimetri dalla base del tappo, andando infine ad inserirsi al centro della Vessel 2. Esso funge anche da supporto sia per il tubo 13 in teflon che collega la Vial 6 con la Vessel 2 sia per il tubo 14 di uscita, fatto in teflon.

- 5 Quest'ultimo tubo 14, lungo venti centimetri circa, parte dal fondo della Vessel 2, attraversa il tappo e si connette con la colonna cromatografica 4, idonea per la purificazione del Gadolinio 159 dall'Europio 158. Dalla colonna 4 esce un tubo 15 che termina nella Vessel 3. In realtà, il prodotto che fuoriesce dalla colonna 4, prima di giungere alla Vessel 3, viene trasportato ad un contenitore 16, schermato
- 10 e separato dalla Cella, nel quale viene effettuato un conteggio quantitativo del radionuclide prodotto (conta della radioattività in milliCurie, MegaBequerel, o KiloRutherford). La taratura energetica del sistema (conversione KeV/canale), utilizza sorgenti calibrate di Bario 133 (4 spettri di emissione) e di Europio 152 (4 spettri di emissione) su uno spettro totale compreso fra 52 KeV e 1.112 KeV.
- 15 La conversione ottenuta è di 0,35 KeV/canale, di conseguenza il massimo range energetico esplorabile sarà di 0 - 1.200 KeV.

L'attività minima desiderata è: 0,264 $\mu\text{g/mL}$ (1 nanomole), pari a 270 mCi di $^{159}\text{GdCl}_3$. Tale attività (1 nanomole di $^{159}\text{GdCl}_3$) è mista a Gadolinio 157 (bersaglio), quest'ultimo ancora presente in quantità più elevata (circa 500

20 nanomoli), in un volume complessivo di 2,5 mL (1 mL di cloruro di Gadolinio 157, 158, 159 + 1,5 mL di sodio citrato proveniente dalla Vial 6).

Da ciascuna delle restanti cinque Vial 7, 8, 9, 10, 11 partono i cinque tubi 17, 18, 19, 20 e 21 per la Vessel 3; i tubi di trasporto dei reagenti, lunghi almeno trentacinque centimetri, devono essere in teflon. Un secondo tappo ricopre la

25 Vessel 3 e viene attraversato, oltre che dai tubi 17, 18, 19, 20 e 21, sopra

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



menzionati, anche dal tubo 22 sotto specificato.

Il tubo 22 di uscita, lungo almeno cinquanta centimetri, trasporta la miscela di reazione alla colonna di purificazione 3 (Sephadex G 25), per cromatografia ad esclusione.

- 5 Un ultimo tubo 23 collega la colonna di purificazione 3 con un flacone 24, posto all'esterno della Cella di Sintesi Chimica, nel quale si raccoglie il prodotto finale.

Le due colonne di purificazione 4, 5 devono essere montate sui pannelli laterali.

La procedura di sintesi della biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 presenta le seguenti fasi:

- 10 1) Irradiazione sotto trizio di cloruro di Gadolinio 157, con successiva produzione di Europio 158, Gadolinio 159 e Gadolinio 158, in miscela di altri nuclidi residui, fra cui lo stesso cloruro di Gadolinio 157 (sostanza bersaglio). La quantità di Gadolinio 157 cloruro, utilizzata come bersaglio, dev'essere tale da consentire la trasmutazione di circa 1 nanomole di Gadolinio 157 in Gadolinio
15 159 pari a circa 270 milliCurie di attività finale (pari anche a 7,4 GigaBequerel, o 7,4 KiloRutherford), da un quantitativo totale non superiore a 500 nanomoli di Gadolinio 157 irradiati, per un volume complessivo di cloruro di Gadolinio 157 di alcuni mL.

- 2) il tubo 1 provvede a portare il materiale liquido radioattivo, appena irradiato,
20 fuori dal pozzo, dentro la C.S.C., ove questa mistura radioattiva viene raccolta nella Vessel 2.

3) Nella Vessel 2 la sostanza viene eluita con sodio citrato 0,05 M, pH 3,4, volume di 1,5 mL, proveniente dalla Vial 6.

- 4) Dalla Vessel 2 il Gadolinio 159, eluito con il sodio citrato, viene spinto fuori e
25 filtrato dalla colonna cromatografica 4 (Dowen-50). Tale sistema consente così

Dot. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



Dott. Adriano BOSCHIN

l'estrazione del Gadolinio 157, 158 e 159 da altri radionuclidi indesiderati, a base di Europio, come soprattutto l'Europio 158. Questa purificazione deve essere eseguita in meno di 20 minuti, prima che l'Europio 158 (emi-decadimento: 45 minuti) abbia avuto il tempo di decadere in Gadolinio 158, nuclide stabile e
5 indesiderato data la sua mancanza di segnale in T.R.M.N..

5) Dalla colonna cromatografica 3, la radioattività della mistura passante per il tubo 15 viene misurata all'interno del misuratore 16 di radioattività; quindi la mistura viene raccolta nella Vessel 3, per la preparazione del radiofarmaco.

6) Dalla Vial 7 il sistema automatico aggiunge ulteriore sodio citrato (0,5 mL, 0,1
10 M, pH 5), al cloruro di Gadolinio 159, portando così il volume a 3 mL complessivi.

7) Dalla Vial 8 il sistema automatico aggiunge 2,5 mg di biotina₂-DTPA, contenuti in 1 mL, portando così il volume a 4 mL complessivi. In questo passaggio, il rapporto molare che dev'essere rispettato è il seguente:

15 1 micromole di biotina₂-DTPA lega 0,2 micromoli di Gadolinio 157-159

Si lascia reagire il tutto per 30 minuti.

8) Dalla Vial 9 il sistema automatico aggiunge cloruro di Gadolinio 157 (500 nanomoli / 0,5 mL), misto a sodio citrato in eguale volume (0,1 M; pH 5; 0,5 mL), allo scopo di colmare la quantità di biotina₂-DTPA non marcata con
20 Gadolinio radioattivo.

Poichè si stima un residuo di Gadolinio 157-159 cloruro non marcato, dalla Vial
10 il sistema automatico aggiunge DTPA in quantità di 1 mg in 0,5 mL di citrato, allo scopo di complessare tutto il Gadolinio cloruro rimasto ancora libero con DTPA, essendo il DTPA-Gadolinio non accumulabile nell'organismo, a
25 differenza del Gadolinio cloruro, estremamente tossico, soprattutto se radioattivo,

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



per midollo osseo.

In questo passaggio, il rapporto molare che dev'essere rispettato è il seguente:

1 micromole di DTPA lega 0,5 micromoli di Gadolinio 157-159

9) Dopo 30 minuti, dalla Vial 11, il sistema automatico aggiunge acqua
5 fisiologica (2 mL), per la eluizione della mistura nella colonna 5 cromatografica.

10) Quindi il tubo di uscita, trasporta la miscela di reazione della Vessel 3 alla
seconda colonna di purificazione 5 che separa la biotina₂-DTPA-Gadolinio
157,159 e il DTPA-Gadolinio 157,159 dal Gadolinio 157,159 cloruro.

11) Uscita del prodotto finale (DTPA-Gadolinio 157,159 e biotina₂-DTPA-
10 Gadolinio 157,159) dalla C.S.C., con successiva filtrazione con un filtro sterile
(Millex-GV4 MILLIPORE) da 0,22 micrometri, del prodotto finale e sua raccolta
nel flacone 24.

12) Prelievo di una goccia della sostanza finale per esecuzione di Controllo di
Qualità:

15 12.a.) Controllo di qualità mediante cromatografia su TLC e su FPLC.

12.b.) Verifica della purezza radionuclidica del ¹⁵⁹Gd da altri radionuclidi
(spettro di emissione).

12.c.) Conta dell'attività specifica (finestra su 363 KeV).

Il controllo di Qualità avviene tramite Cromatografia su strato sottile (Thin Layer
20 Chromatography, TLC) come di seguito descritto.

Su una striscia di carta Whatman n. 1, utilizzata come fase stazionaria ed
immersa in tampone bicarbonato 0,05 M come fase mobile, si semina una goccia
(0,05 mL) della soluzione finale di biotina₂-DTPA marcata con Gadolinio 159 e
157 (0,4 mg / mL); si eluisce per 20 minuti. Analizzando il cromatogramma
25 ottenuto, utilizzando un analizzatore a scansione per radiazioni gamma, si

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



evidenzia la quasi totale migrazione della molecola marcata con il fronte del solvente, presentando all'origine eventuale Gadolinio 159 cloruro libero. Viene eseguita una prova di affinità seminando su una seconda striscia un eccesso di avidina (10 mg / mL), prima della goccia di biotina₂-DTPA-Gadolinio 159. Le
5 condizioni cromatografiche sono analoghe alle precedenti, e il cromatogramma, ottenuto con lo stesso strumento, dimostra la completa ritenzione all'origine del complesso avidina-biotina-DTPA Gadolinio 159, fenomeno dovuto all'alto peso molecolare dell'avidina (60 kDa).

Fase mobile: Buffer bicarbonato 0,05 M.

10 Fase fissa: carta Whatman n.1.

Biotina₂-DTPA-Gadolinio 159 / DTPA-Gadolinio 159:.....Fronte del solvente

Gadolinio 159 cloruro liberoOrigine

Biotina₂-DTPA-Gadolinio 159 + Avidina =..... Origine

15 Il Controllo di Qualità con Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) si esegue nel seguente modo.

200 microlitri della soluzione finale (0,4 mg / mL) sono iniettati nella colonna di un FPLC che, sfruttando i principi della gel filtrazione, distinguendo le molecole in base al loro peso molecolare, separa i vari composti presenti nel campione, e
20 rivela la presenza di radioattività grazie al suo collegamento ad un detector radiochimico. Il cromatogramma così ottenuto viene comparato con uno standard, quest'ultimo ottenuto mediante U.V. della sola biotina₂-DTPA (finestra su 560 nanometri di lunghezza d'onda), in modo tale da essere certi dell'avvenuta marcatura del complesso biotinilato. Per verificare che il DTPA non abbia
25 interferito sull'affinità avidina-biotina, a 100 microlitri della soluzione vengono

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009

TS 99 A 000009



aggiunti 100 microlitri di avidina (10 mg / mL) ed iniettati nuovamente nella
colonna della FPLC. Il cromatogramma ottenuto, comparato con uno dello
standard di sola avidina, dimostra che il picco radioattivo precedentemente
ottenuto si sposta in corrispondenza della zona dell'avidina, dimostrando in
5 questo modo l'avvenuto legame tra le due molecole.

Fase mobile: acqua sterile fisiologica

Fase fissa: Sephadex G 25

- 1). Depositare biotina marcata + avidina sulla colonna.
- 2). Lavare con 1 mL di fisiologica per fare scendere il composto.
- 10 3). Lavare 6 volte con 1 mL di fisiologica e raccogliere 6 frazioni.
- 4). Contare in Gamma Counter.

Biotina₂-DTPA-Gadolinio 159 / DTPA-Gadolinio 159:..... 2a-3a frazione.

Gadolinio 159 cloruro libero:.....5.a-6a. frazione

Lo spettro energetico risultante (nel range 0-1.200 KeV) del campione analizzato
15 si dovrà presentare privo di contaminazioni, anche se potrebbe essere possibile
una contaminazione da lantanidi, tipo Europio 152 ^m, o Europio 158.

In particolare si dovranno notare:

- a). Il picco a 363 KeV del ¹⁵⁹Gd, dovuto all'emissione gamma caratteristica.
- b). La spalla *Compton* conseguente.
- 20 c). Il picco a 58 KeV del ¹⁵⁹Gd, dovuto all'emissione gamma caratteristica.
- d). La spalla *Compton* conseguente.
- e). Il picco a 898 KeV del ¹⁵⁸Eu, dovuto all'emissione gamma caratteristica.
- f). La spalla *Compton* conseguente.
- g). Il picco a 944 KeV del ¹⁵⁸Eu, dovuto all'emissione gamma caratteristica.
- 25 h). La spalla *Compton* conseguente.

Dott. Adriano BOSCHIN



- i). Il picco a 842 KeV del ^{152m}Eu , dovuto all'emissione gamma caratteristica
- j). La spalla *Compton* conseguente.
- k). I picchi a 79 KeV, 897 KeV e 944 KeV del ^{152m}Eu , dovuti all'emissione gamma caratteristica.
- 5 l). Le spalle *Compton* conseguenti.
- m). Altri picchi foto-energetici, con relative spalle *Compton* conseguenti.
- n). Il picco di *backscattering*.
- o). Il taglio energetico a 50 KeV (*offset*) effettuato dalla catena elettronica in fase di taratura.
- 10 p). Ad alte energie si può evidenziare un piccolo picco (1.240 KeV) dovuto al ^{40}K del BKG

Si concluderà verificando che il campione esaminato risulti privo di contaminazioni radionuclidiche estranee significative.

- Il test di apirogenicità è necessario, pertanto ogni 4-5 sintesi bisogna effettuare un
- 15 test per verificare l'assenza o la presenza di pirogeni nel prodotto, che costituiscono un potenziale rischio per il paziente cui viene somministrato il radiofarmaco. Utile l'impiego, come da letteratura, del "Limulus Amebocyte Lysate test".

Il campo d'azione del radiofarmaco in oggetto è quello di:

- 20 A) indurre radionecrosi sul tumore primitivo e sulle sue metastasi in base alla veicolazione esclusiva della biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 sui complessi di streptoavidina-MoAbs biotinilati già presenti specificatamente sui soli epitopi tumorali.
- B) detezione I.T.-R.M.N. del radiofarmaco con risoluzione spaziale sub-
- 25 millimetrica, allo scopo di misurare con estrema precisione le quantità di

Dott. Adriano BOSCHIN



Gadolinio localizzatesi nelle sedi neoplastiche già note o meno all'operatore, secondo tempi di acquisizione delle immagini eseguiti in più sedute, per un tempo non inferiore alle 72 ore, allo scopo di seguire le variazioni di concentrazione del Gadolinio 157,159, con specifico riferimento alla sua fase di plateau, misurata per almeno 16 ore a partire dalla stabilizzazione della biotina radioattiva sul tumore primitivo e sulle sue metastasi, a clearance renale superata, dopo le prime ore post-iniezione endovenosa lenta del radio-farmaco.

Sostanzialmente, possibilità di ricavare le curve di attività / tempo in diversi organi del paziente, attraverso Regioni di Interesse (Region of Interest, ROI) disegnate dall'operatore sulle bio-immagini ottenute dalla I.T.-R.M.N., rendendo così possibile definire le bio-distribuzioni reali del radiofarmaco in esame.

Si valuterà soprattutto la captazione renale o di altri tessuti durante la fase acuta (prime ore di terapia), ricercando la percentuale di uptake relativo e assoluto in ambito renale, per valutare e prevenire l'insorgenza di possibili danni radio-indotti sui nefroni.

Le immagini a conteggio massimo e minimo, con le loro rispettive ROI di organo, consentono di ottenere, in base al cambiamento percentuale di conteggio, l'accumulo o la dismissione del radiofarmaco dagli altri organi del paziente e dalla neoplasia principale e sue metastasi, e la stima approssimativa della dose assorbita da essi nel corso del tempo, utile per la stesura successiva del piano di R.T.E. attraverso le porte di entrata dei tessuti sani meno gadolinizzati.

Utili sono i dati CDE applicati ai valori ottenuti dalla sovrapposizione delle diverse curve attività / tempo delle ROI estratte da immagini ottenute in tempi diversi di acquisizione.

Così, risulta possibile eseguire lo studio sui valori ricercati in termini CDE:

Dott. Adriano BOSCHIN



TS 99 A 000009

verrebbe in tal modo dimostrata la percentuale di attività in ciascuna ROI, visulizzandola già in termini di CDE assoluta, per un numero di immagini acquisite in un arco di tempo di almeno 16 ore e mezzo, essendo 1 CDE di Gadolinio 159 pari ad una attività media stimata (in plateau per 16,5 ore) di circa
5 10 microCurie di attività presente in 0,1 grammi di tessuto biologico, distribuiti in 100 millimetro cubo di volume. Una volta corretti i dati per il decadimento, si ottengono dei precisi istogrammi CDE a colori delle diverse ROI, a loro volta riferite ad organi o aree critiche. Questi istogrammi vengono normalizzati sulla vescica, essendo questo l'organo a maggiore attività. Tabelle di ritenzione
10 vescicale sono inoltre utili per il calcolo della percentuale di radioattività rimasta nel paziente. Viene anche stimato il tempo di dismissione del Gadolinio da aree critiche, come organi particolarmente delicati o, viceversa, aree tumorali importanti per grandezza e sede.

C) In base a quanto esposto al punto B, ricerca accurata di tessuto biologico non
15 gadolinizzato posto all'interno di cercini periferici gadolinizzati di diametro superiore ad almeno 0,5 centimetri, indici ad alta probabilità di tessuto neoplastico residuo ad elevata pressione interstiziale, con conseguente bassa perfusione ematica e quindi basso accumulo dei grandi complessi molecolari a base di MoAbs biotinilitati e di streptoavidina, punti di legame obbligatori per le
20 piccole molecole di biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159, che nel caso in questione non hanno potuto raggiungere la parte più interna del tumore.

D) Valutazione collegiale I.T.-R.M.N. e radioterapista di tali volumi intra-neoplastici in gap dosimetrico da Gadolinio 159, per studio di possibile R.T.E. mirata a piccolo campo, con attenta esclusione del tessuto sano limitrofo posto
25 al di fuori del cercine periferico gadolinizzato.

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



RIVENDICAZIONI

1 - Sintesi ed utilizzo di biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 per Radio-Terapia, in cui detto radiofarmaco sterile e apirogeno è caratterizzato dal fatto di venire utilizzato per inoculo endovenoso nell'uomo quale ultima componente di una
5 metodica di pretargeting caratterizzata dalla somministrazione parenterale sequenziata delle seguenti componenti: MoAbs biotinilati, avidina, streptoavidina, albumina biotinilata, biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159; detto radiofarmaco ha le seguenti funzioni:

A) indurre radionecrosi sul tumore primitivo e sulle sue metastasi in base alla
10 veicolazione esclusiva della biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 sui complessi di streptoavidina-MoAbs biotinilati già presenti specificatamente sui soli epitopi tumorali;

B) detezione I.T.-R.M.N. del radiofarmaco con risoluzione spaziale sub-millimetrica, allo scopo di misurare con estrema precisione le quantità di
15 Gadolinio localizzatesi nelle sedi neoplastiche già note o meno all'operatore, secondo tempi di acquisizione delle immagini eseguiti in più sedute, per un tempo non inferiore alle settantadue ore, allo scopo di seguire le variazioni di concentrazione del Gadolinio 157,159, con specifico riferimento alla sua fase di plateau, misurata per almeno sedici ore a partire dalla stabilizzazione della
20 biotina radioattiva sul tumore primitivo e sulle sue metastasi, a clearance renale superata, dopo le prime ore post-iniezione endovenosa lenta del radio-farmaco;

C) ricerca accurata di tessuto biologico non gadolinizzato posto all'interno di cercini periferici gadolinizzati di diametro superiore ad almeno 0,5 centimetri, indici ad alta probabilità di tessuto neoplastico residuo ad elevata pressione
25 interstiziale, con conseguente bassa perfusione ematica e quindi basso accumulo

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 0 0 0 0 0 9



dei grandi complessi molecolari a base di MoAbs biotinilitati e di streptoavidina, punti di legame obbligatori per le piccole molecole di biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159, che nel caso in questione non hanno potuto raggiungere la parte più interna del tumore;

- 5 D) valutazione collegiale I.T.-R.M.N. e radioterapista di tali volumi intra-neoplastici in gap dosimetrico da Gadolinio 159, per studio di possibile R.T.E. mirata a piccolo campo, con attenta esclusione del tessuto sano limitrofo posto al di fuori del cerchio periferico gadolinizzato.

- 2 - Sintesi di biotina₂-DTPA -Gadolinio 157,159, secondo la rivendicazione 1, in cui il cloruro di Gadolinio 159 viene prodotto tramite in un Acceleratore di
10 particelle ed un Modulo Automatico di Sintesi Chimica (M.A.S.C.), caratterizzato dal fatto che la mistura di Gadolinio 157, 159 ed altri radionuclidi (sottoprodotti) vengono trasferiti, tramite un tubo (1), in una prima Vessel (2) posta all'interno della Cella di Sintesi Chimica (C.S.C.) del M.A.S.C.; entro detta
15 C.S.C. sono inoltre alloggiate una seconda Vessel (3), due colonne cromatografiche (4, 5) e sei Vial (6, 7, 8, 9, 10, 11); superiormente alle predette Vessels (2, 3) vengono posti dei tappi di silicone, attraversati da tubi di teflon e acciaio per connettere dette Vessels (2, 3) tra di loro, con il sistema di erogazione del gas, e con le sei Vials previste, le quali contengono i reagenti ed i solventi
20 sotto specificati:

Vial (6): Sodio citrato, o ammonio citrato, pH 3-4; 0,05-0,1 M, in volume pari a quello del volume vuoto della prima colonna 4 (Dowen-50 oppure amalgama di sodio) considerando anche le perdite di materiale lungo il tubo (14) e (15);

- Vial (7): Sodio citrato pH 5-6; 0,1-0,2 M, in volume tale da essere pari,
25 sommando anche il sodio o l'ammonio citrato della Vial (6), al solo volume del

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



Gadolinio cloruro contenuto nella prima Vessel (2), da cui dev'essere considerata le perdita di materiale lungo il tubo (1);

Vial (8): biotina₂-DTPA in quantità di 5 micromoli per paziente adulto di peso standard standard (70 kg), per motivi legati al miglior rapporto stechiometrico previsto, su base sperimentale, con il sistema di pretargeting proposto: 50 mg di MoAbs eptabiotinilati, 30 mg di avidina, 50 mg di streptoavidina, 10 mg di albumina biotinilata (10 mg). Tale biotina₂-DTPA dev'essere disciolta in quantità leggermente superiore a 5 micromoli, e in un volume possibilmente non superiore ad 1-2 mL, dovendo considerare le perdite di materiale lungo il tubo (8) per motivi legati alla concentrazione successiva dei diversi reagenti previsti per la marcatura ottimale con Gadolinio 157,159;

Vial (9): cloruro di Gadolinio 157 (in quantità inferiore ad 1 micromole e disciolto in eguale volume di sodio citrato a pH 5-6; 0,1-0,2 M, anche qui in un volume massimo complessivo di 0,5-1 mL, sempre per motivi legati allo scopo di ottenere una buona concentrazione dei diversi reagenti previsti per la marcatura complessiva, ma dovendo anche considerare le perdite di materiale lungo il tubo (9);

Vial (10): DTPA in quantità di circa 1-2 mg, disciolto in un volume massimo non superiore ad 1 mL di sodio citrato (pH 5-6; 0,1-0,2 M), sempre per motivi legati ad ottenere una buona concentrazione dei diversi reagenti previsti per la marcatura finale, ma dovendo anche considerare le perdite di materiale lungo il tubo (10);

Vial (11): Acqua sterile fisiologica (in volume pari a quello del volume vuoto della seconda colonna cromatografica (5);

dette Vials (6, 7, 8, 9, 10, 11) vengono montate sul pannello frontale; dette Vials

Dott. Adriano BOSCHIN



(6, 7, 8, 9, 10, 11) contenenti i reagenti vengono chiuse mediante tappi metallici con interposti setti di silicone perforati; in ciascuno dei predetti vengono inseriti due tubi di teflon di cui il primo serve per il passaggio del gas, contenuto in un contenitore (12), che riempiendo le Vials (6, 7, 8, 9, 10, 11) spinge all'esterno i reagenti mentre il secondo tubo serve per il passaggio dei sopra precisati reagenti; detto secondo deve raggiungere il fondo di ciascuna Vial (6, 7, 8, 9, 10, 11) affinché tutto il liquido venga aspirato; la preparazione della biotina₂-DTPA avviene nel modo seguente:

la biotina₂-DTPA, in polvere viene diluita in PBS 1 x (*Phosphate Buffered Saline*) a pH 7,2-7,6 allo scopo di arrivare ad una concentrazione ottimale leggermente superiore a 5 mg/mL (5 micromoli/mL) per compensare le perdite di materiale lungo il tubo (8) ma senza diluire eccessivamente i reagenti; viene quindi ottenuta la sterilità e la apirogenicità con impiego di filtri sterili, possibilmente fino a 0,22 micrometri (es.: Millex-GV4), prima di essere introdotta nella pertinente Vial (8); un primo tubo (1), di acciaio inox, attraversa il tappo che ricopre la Vessel (2); detto tubo (1) trasporta il materiale radioattivo appena prodotto, misto a bersaglio (Europio 158, Gadolinio 157, Gadolinio 159) proveniente dal pozzo d'irradiazione; detto tubo (1) funge anche da supporto sia per il tubo (13) in teflon che collega la Vial (6) con la Vessel (2) sia per il tubo (14) di uscita, in teflon; detto tubo (14) parte dal fondo della Vessel (2), attraversa il tappo e si connette con la colonna cromatografica (4), idonea per la purificazione del Gadolinio 159 dall'Europio 158, connettendosi poi all'uscita della colonna (4) con il tubo (15) d'ingresso nella Vessel (3); in realtà, il prodotto che fuoriesce dalla colonna (4), prima di giungere alla Vessel (3), viene trasportato ad un contenitore (16), schermato e separato dalla Cella, nel quale

Dott. Adriano BOSCHIN

TS 99 A 000009



viene effettuato un conteggio quantitativo del radionuclide prodotto (conta della radioattività in milliCurie, MegaBequerel, o KiloRutherford); la taratura energetica del sistema (conversione KeV/canale), può utilizzare sorgenti calibrate di Bario 133 (4 spettri di emissione) e di Europio 152 (4 spettri di emissione),
5 ottenendo così uno spettro totale compreso fra 52 KeV e 1.112 KeV; la conversione ottenibile è di 0,35 KeV/canale, di conseguenza il massimo range energetico esplorabile sarà di 0 - 1.200 KeV; l'attività minima desiderata da produrre è quella massima prevista per l'inoculo endovenoso in un paziente adulto di 70 kg : 0,130 µg/mL (circa 0,5 nanomole), pari a circa 140 mCi di ¹⁵⁹
10 GdCl₃; tale attività è mista a Gadolinio 157 (bersaglio), quest'ultimo ancora presente in quantità molto più elevata, pari a circa 1 micromole, intendolo legare (assieme al Gadolinio 159 e 158) a 5 micromoli di Biotina₂-DTPA), in un volume complessivo di pochi mL (cloruro di Gadolinio 157, 158, 159 + sodio citrato o ammonio citrato proveniente dalla Vial 6); da ciascuna delle restanti cinque Vials
15 (7, 8, 9, 10, 11) partono i cinque tubi (17, 18, 19, 20 e 21) per la Vessel (3); i tubi di trasporto dei reagenti devono essere in teflon; un tubo 22 di uscita trasporta la miscela di reazione dalla Vessel (3) alla colonna di purificazione (5) (Sephadex G 25, oppure Superose 6), per cromatografia ad esclusione; un ultimo tubo (23) collega detta colonna di purificazione (5) con un flacone (24), posto all'esterno
20 della Cella di Sintesi Chimica, nel quale si raccoglie il prodotto finale; le predette colonne di purificazione (4, 5) vengono montate sui pannelli laterali.

3 - Sintesi di biotina₂-DTPA -Gadolinio 157,159, secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzata dal fatto di presentare le seguenti fasi:

1) irradiazione sotto trizio di cloruro di Gadolinio 157, con successiva
25 produzione di Europio 158, Gadolinio 159 e Gadolinio 158, in miscela di altri

Dott. Adriano BOSCHIN



nuclidi residui, fra cui lo stesso cloruro di Gadolinio 157 (sostanza bersaglio); la quantità di Gadolinio 157 cloruro, utilizzata come bersaglio, dev'essere tale da consentire la trasmutazione di almeno 0,5 nanomoli di Gadolinio 157 in Gadolinio 159, pari a circa 140 milliCurie di attività finale, con un quantitativo
5 totale di Gadolinio 157 risultante nella Vessel (1), e da qui nella Vessel (2), di circa 1 micromole, in preciso rapporto molare (1: 5) quindi con le 5 micromoli nette di biotina₂-DTPA presenti successivamente nella seconda Vessel (3). Il volume complessivo di cloruro di Gadolinio 157 da irradiare dev'essere di pochi mL, poichè deve ottenere una buona concentrazione dei successivi diversi
10 reagenti previsti per la marcatura complessiva, ma deve anche considerare le perdite di materiale lungo il tubo (1), e successivi;

2) il tubo (1) provvede a portare il materiale liquido radioattivo, appena irradiato, fuori dal pozzo, dentro la C.S.C., ove questa mistura radioattiva viene raccolta nella Vessel (2);

15 3) nella predetta Vessel (2) la sostanza viene eluita con sodio citrato o ammonio citrato, volume di alcuni mL, proveniente dalla Vial (6);

4) dalla Vessel (2) il Gadolinio 159, eluito con il sodio citrato, o ammonio citrato, viene spinto fuori e filtrato dalla colonna cromatografica (4); tale purificazione deve essere eseguita in meno di 20-30 minuti, prima che l'Europio
20 158 (emi-decadimento: 45 minuti) abbia avuto il tempo di decadere in Gadolinio 158;

5) dalla colonna cromatografica (4), la radioattività della mistura passante per il tubo (15) viene misurata all'interno del misuratore (16) di radioattività; quindi la mistura viene raccolta nella Vessel (3), per la preparazione del radiofarmaco;

25 6) dalla Vial (7) il sistema automatico aggiunge ulteriore sodio citrato al cloruro

Dott. Adriano BOSCHIN



Dott. Adriano BOSCHIN

di Gadolinio 159, portando così il volume a diversi mL complessivi;

7) dalla Vial (8) il sistema automatico aggiunge la biotina₂-DTPA: in questo passaggio, il rapporto molare che dev'essere rispettato è il seguente:

5 micromoli di biotina₂-DTPA legano 1 micromole di Gadolinio 157-159;

5 si lascia reagire il tutto per 30 minuti;

8) dalla Vial (9) il sistema automatico aggiunge ulteriore cloruro di Gadolinio 157 (circa 1 micromole, in meno di 1 mL), misto a sodio citrato in eguale volume (0,1-0,2 M; pH 5-6), per tentare di legare parte della biotina₂-DTPA non marcatasi con il Gadolinio radioattivo e il Gadolinio 157-bersaglio; poichè si
10 stima comunque un residuo di Gadolinio 157-159 cloruro non marcato, dalla Vial (10) il sistema automatico aggiunge DTPA in quantità di pochi milligrammi in meno di 1 mL di citrato, allo scopo di complessare tutto il Gadolinio cloruro rimasto ancora libero con DTPA, essendo il DTPA-Gadolinio non accumulabile nell'organismo, a differenza del Gadolinio cloruro, estremamente tossico,
15 soprattutto se radioattivo, per midollo osseo, in questo passaggio, il rapporto molare che dev'essere rispettato è il seguente:

1 micromole di DTPA lega 0,5 micromoli di Gadolinio 157-159

9) dopo 30 minuti, dalla Vial (11), il sistema automatico aggiunge l'acqua fisiologica, per la eluizione della mistura nella colonna (5) cromatografica;

20 10) quindi il tubo di uscita, trasporta la miscela di reazione della Vessel 3 alla seconda colonna di purificazione (5) che separa la biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159 e il DTPA-Gadolinio 157,159 dal Gadolinio 157,159 cloruro;

11) uscita del prodotto finale (DTPA-Gadolinio 157,159 e biotina₂-DTPA-Gadolinio 157,159) dalla C.S.C., con successiva filtrazione con un filtro sterile,
25 possibilmente da 0,22 micrometri (es.: Millex-GV4), del prodotto finale e sua

TS 99 A 0000009



raccolta nel flacone (24);

12) prelievo di una goccia della sostanza finale per esecuzione di Controllo di Qualità.

per il Dott. NACCI GIUSEPPE

5

Firmato: Dott. Boschini Adriano

Trieste, 03 GIU. 1999

Dott. Adriano BOSCHINI

TS 99 A 000009

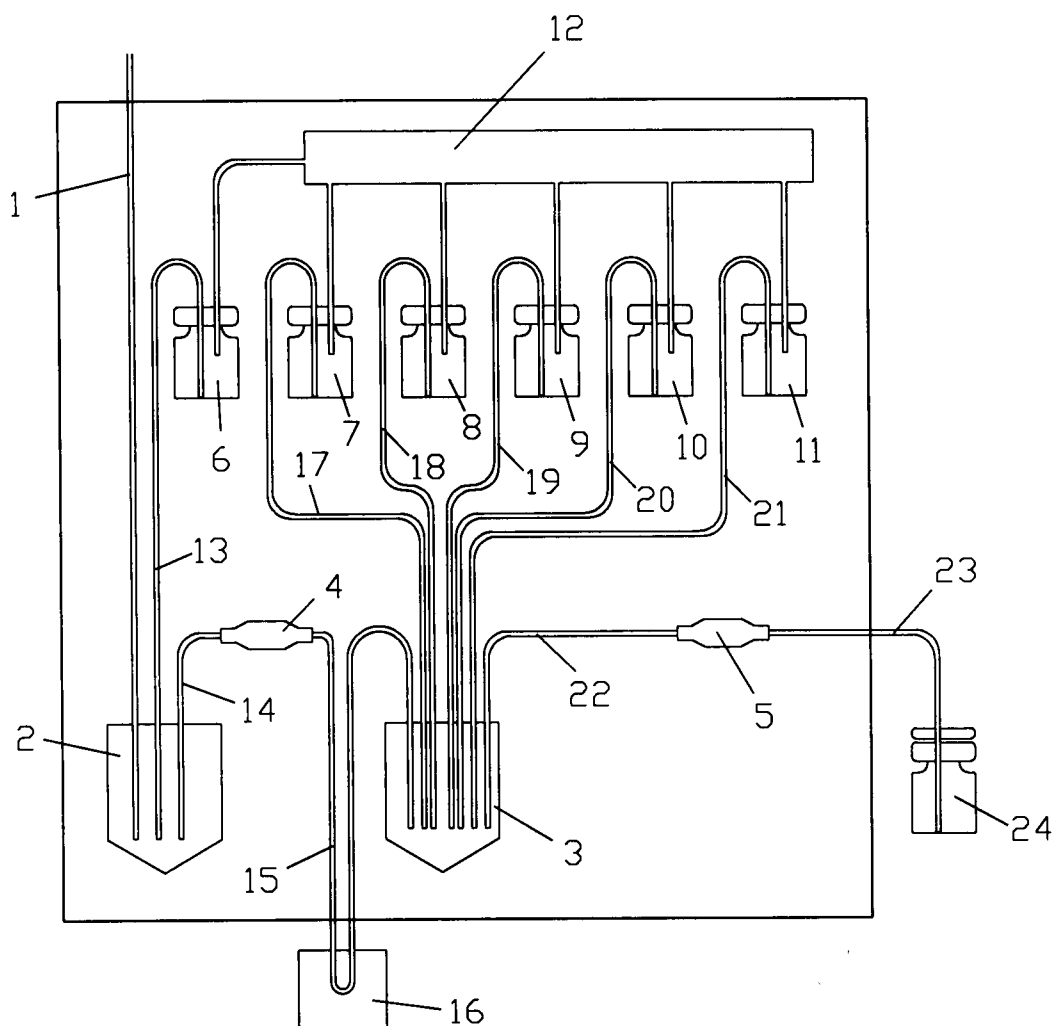


FIG. 1

03 GIU. 1999

Dott. Adriano BOSCHIN