

Raport asupra rezultatelor proiectului NARAD in perioada 2020-2022

1. Prezentare generală a realizării obiectivelor proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor

In cadrul proiectului NARAD, CO IFIN-HH a realizat urmatoarele obiective:

Obiectivul general al Etapei 1: Conceptul unui activator cu neutroni pilotat de ciclotron

Activitate 1.1 Definirea unui activator cu neutroni (AN) proiectat in linie cu ciclotronul TR19

Proiectul NARAD are ca obiect cercetarea aplicativa a unui concept modern de generare a unui spectru de neutroni adecvat producerii de radioizotopi prin captura de neutroni. La baza acestei idei se afla fenomenul numit Adiabatic Resonance Crossing (ARC) propus initial de C. Rubia (premiul Nobel 1984) la CERN in 1993 pentru construirea unui Activator cu neutroni in scopul realizarii transmutatiei elementelor radioactive cu timp de viata lung (Tc-99, I-129) din deseurile de la reactoarele nucleare (Experimentul TARC 1996-1999).

Conceptul ARC. Plumbul foarte pur este practic transparent pentru neutronii rezultati prin bombardarea unei tinte de beriliu cu protoni. Miezul de plumb inconjoara zona de tinta, iar multitudinea de ciocniri cvasielastice in interiorul masei de plumb si reflectarea pe grafit determina atingerea multor stari de rezonanta pentru reactii de captura de neutroni corespunzatoare unor izotopi pe care dorim sa-i activam.

Activitate 1.2 Selectarea codurilor de simulare Monte Carlo utilizate in proiectarea activatorului cu neutroni

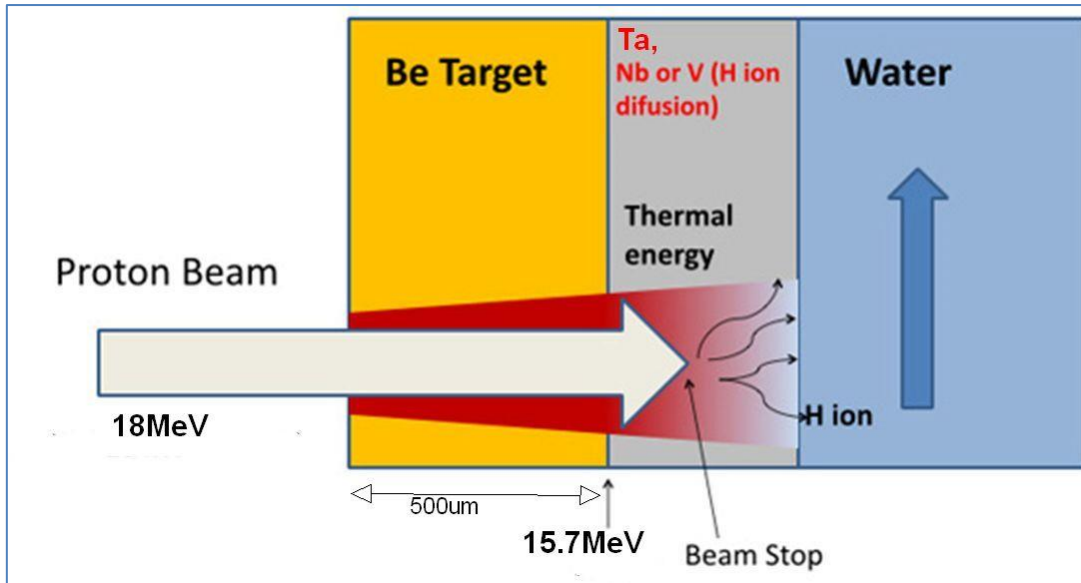
Codurile de simulare Monte Carlo sunt folosite in acest proiect pentru a simula componentele principale ale activatorului – țintă, masă de răcire cu apă, tampon de plumb și reflector de grafit - pentru a obține randamentele maxime pentru radioizotopii de interes. De asemenea, captarea combinată de neutroni în ambele domenii de energie epitermală și termică este optimizata prin utilizarea, pe lângă efectul ARC, a unui reflector de neutroni din grafit dimensionat corespunzător.

Luand in considerare puterea de calcul necesara rularii codurilor de simulare si experienta in utilizarea courilor am decis utilizarea codului FLUKA in simularile necesare derularii proiectului

Obiectivul general al Etapei 2. Proiectarea unui activator cu neutroni pilotat de ciclotronul TR19 pentru productia de radiofarmaceutice

Activitate 2.1 Proiectarea unei tinte de Beriliu bombardata cu protoni de 18 MeV pentru productia de neutroni la ciclotronul TR19

In echipamentul realizat am utilizat o tinta formata dintr-o placa de beriliu cu grosimea de 0.5mm si o placa de tantal cu grosimea de 1mm, ambele de forma patrat cu latura de 25mm. Cele doua placi sunt suprapuse intr-un suport proiectat sa asigure o racire eficienta cu apa.



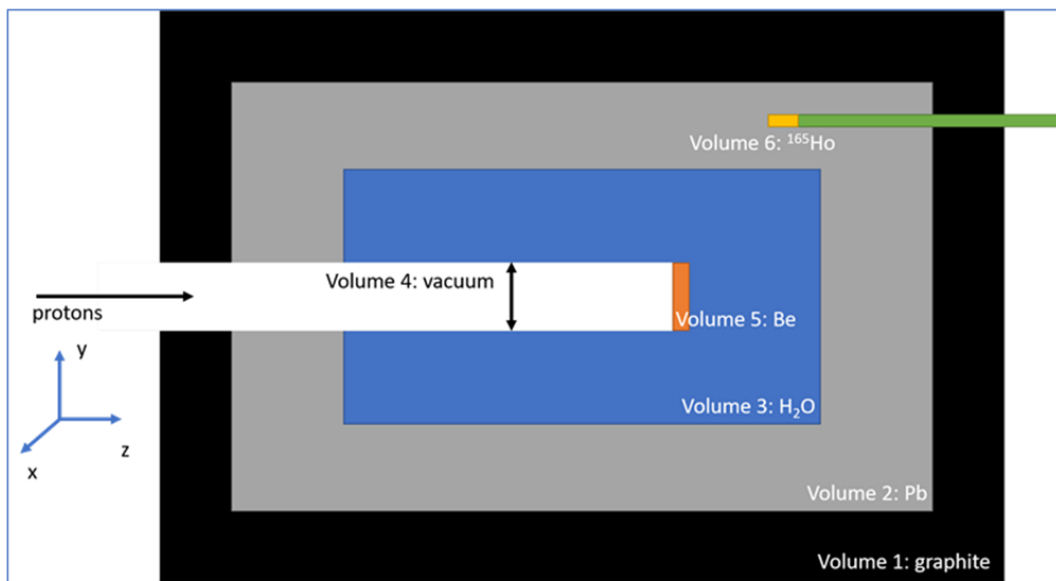
Activitate 2.2 Studii de proiectare pentru un sistem moderator-reflector

Materialele speciale care se utilizeaza in constructia AN sunt:

- Reflector din grafit de puritate nucleara
- Plumb de inalta puritate
- Tinta de beriliu

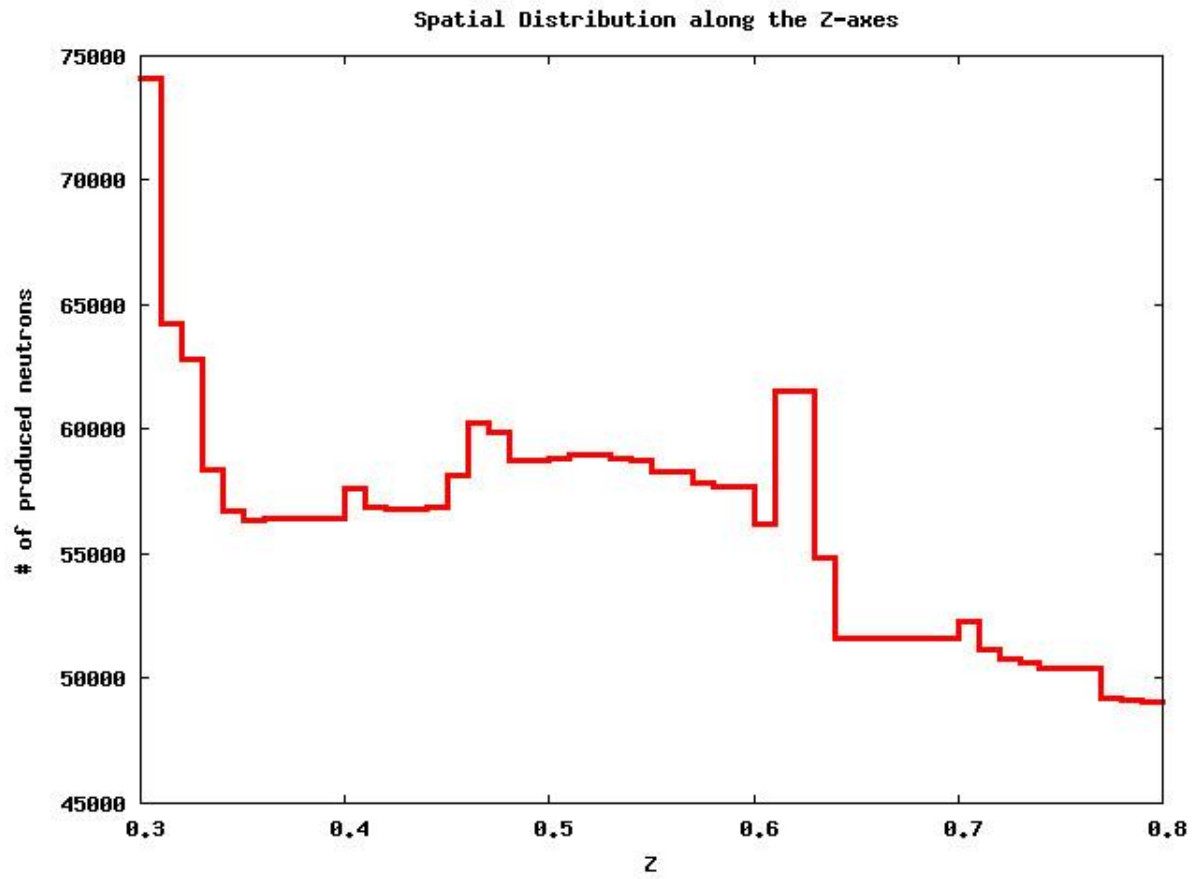
Activitate 2.3 Utilizarea codurilor Monte Carlo in proiectarea activatorului de neutroni

Schema de principii a Activatorului cu neutroni. O ținta de beriliu este bombardata cu protoni rezultand neutroni rapizi. Miezul de plumb înconjoară zona țintă ca în imaginea alăturată, iar multitudinea de ciocniri cvasi-elastice în cadrul masei de plumb și reflexia pe grafit determină atingerea multor stări de rezonanță pentru reacțiile de captare a neutronilor corespunzătoare izotopilor pe care dorim să-i activăm

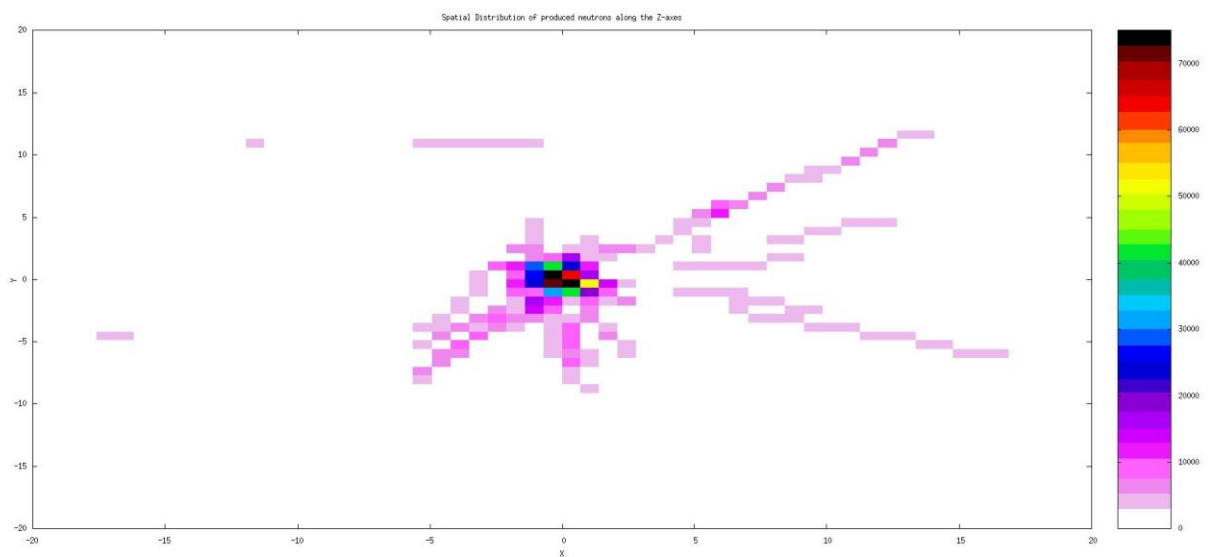


Rezultate

(1) Grafic cu numarul de neutroni (in bin-uri) de-a lungul axei Z, in volumul de plumb



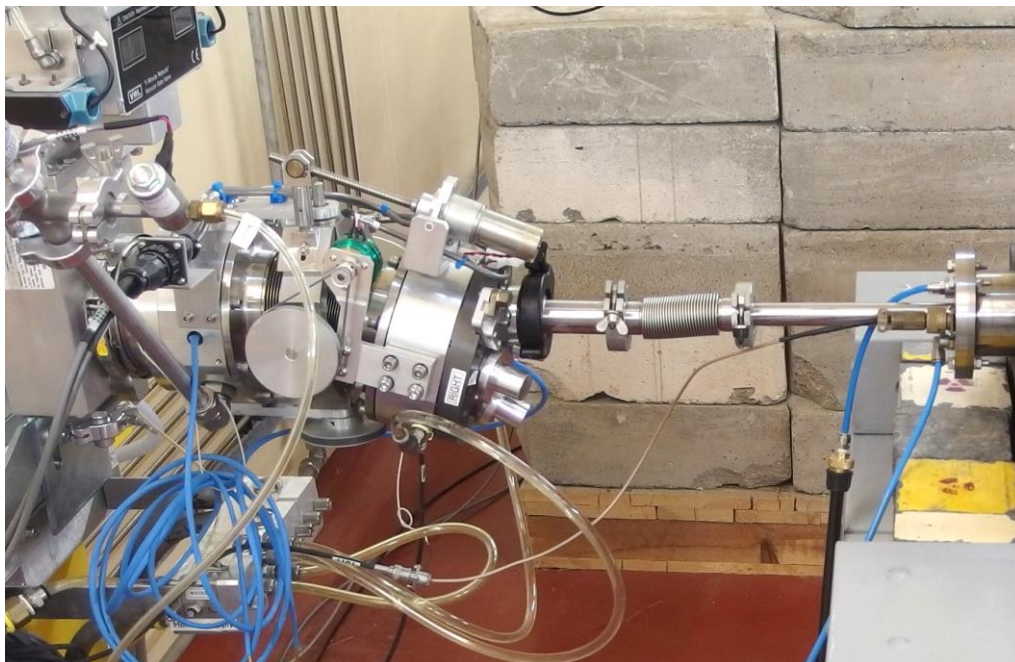
(2) Grafic cu distributia numarului de neutroni, proiectata in volumul de plumb



Activitate 2.4 Proiectul tehnic de cuplare al AN cu linia de extensie dedicata in Hala de experimente



Acceleratorul ciclotron TR19 (ACSI-Canada) cu linia orizontala de extractie a fascicolului de protoni la capatul careia a fost instalat Activatorul de neutroni



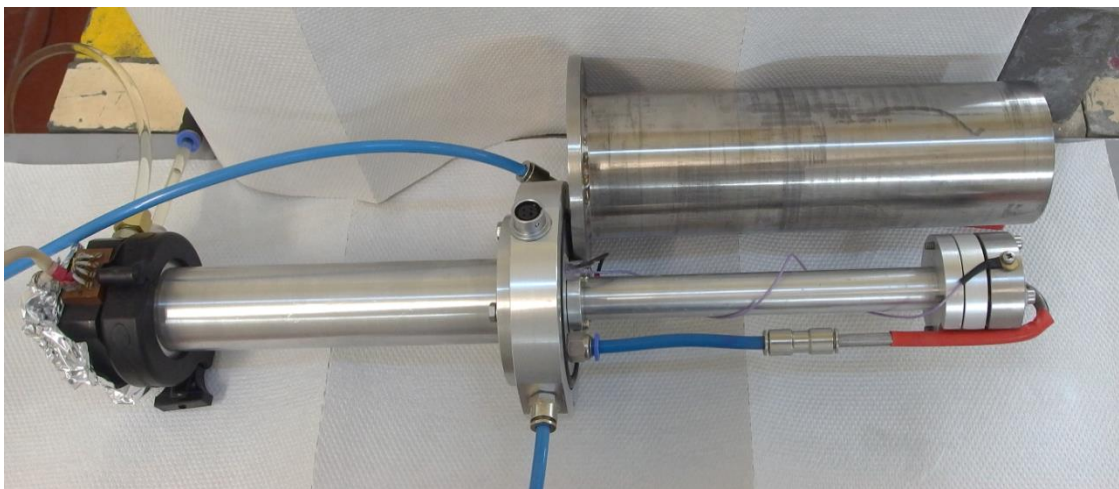
La capatul liniei orizontale de fascicul cu lungimea de 6 m se cupleaza AN prin intermediul unei conducte flexibile (silfon), asa cum se observa in imaginea atasata. Acest cuplaj elastic este necesar pentru a permite mici deplasari ale Capului selector in vederea realizarii unei alinieri corecte a fascicolului de protoni. Cota fata de podea a liniei de fascicul este 96 cm

Activitate 2.5 Proiectarea sistemului de racire cu apa al tinte

Instalatia care furnizeaza apa de racire este conceputa ca un circuit inchis format din:

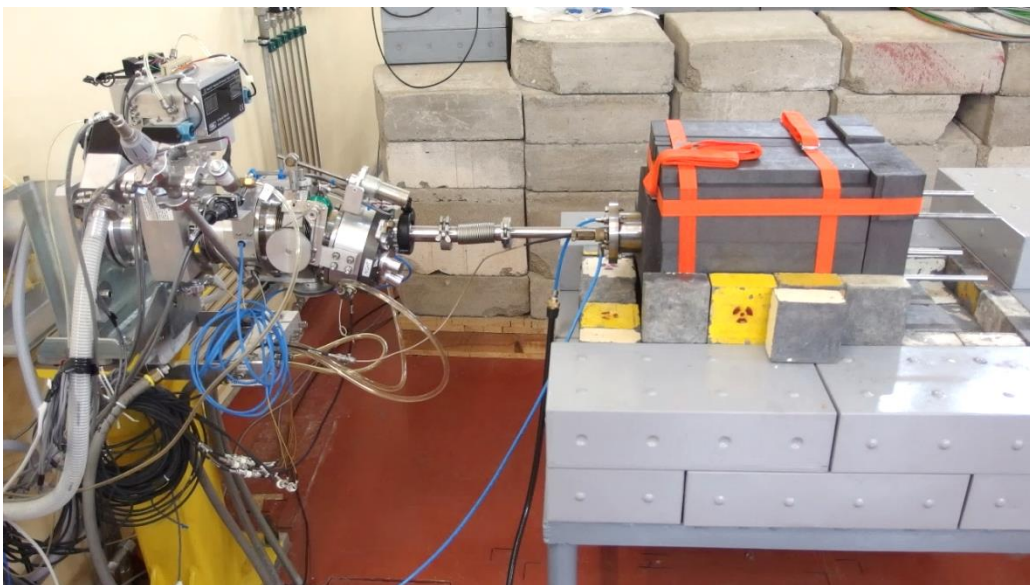
- Schimbator de caldura
- Pompa de circulatie
- Debitmetru pe retur
- Robineti de reglaj
- Vas tampon de 10 l
- Furtune de cuplaj
- Termosenzori pentru masurarea temperaturii apei inainte si dupa racirea tinte

Apa din circuitul primar provine de la sistemul general al apei de racire a ciclotronului. Aceasta apa este deionizata si termostata la temperatura de 20 °C

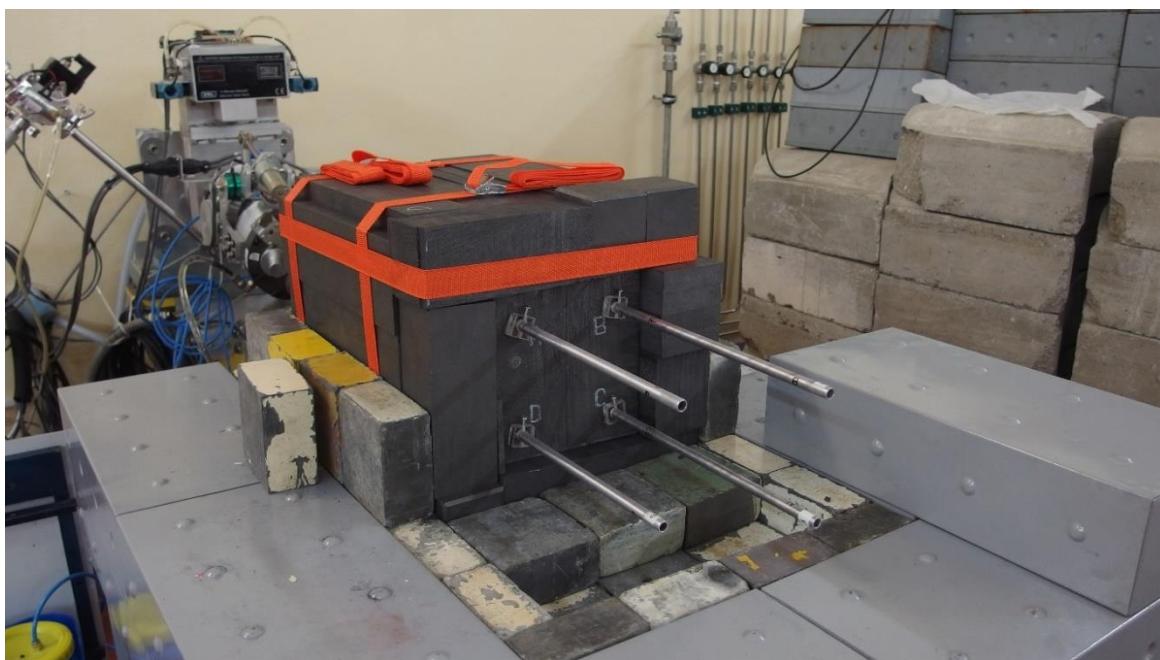


Componentele majore ale instalatiei. De la stanga la dreapta: colimatorul cu cinci zone de masura a curentului de protoni, tubul de vacuum de cuplaj cu ciclotronul, sistemul port tinta izolat electric pentru preluarea curentului si sistemul de racire cu apa.

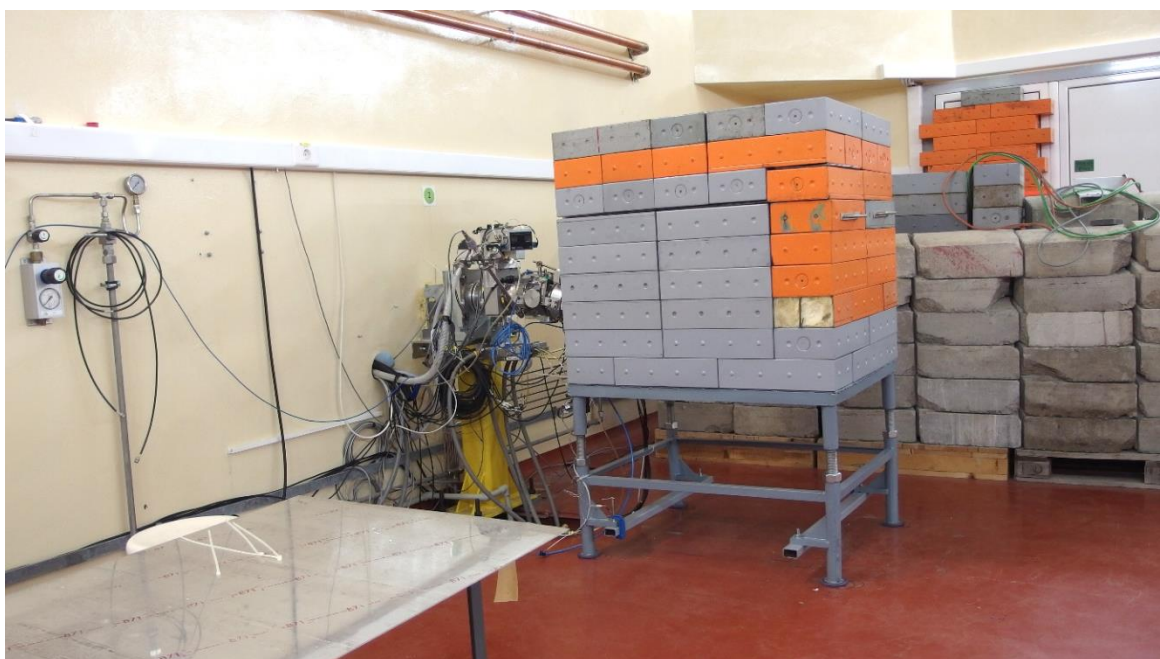
Activitate 2.6 Realizarea si instalarea activatorului



Vedere generala a sistemului asamblat



Ansamblul Activator cu neutroni. Se observa invelisul din grafit cu rol de reflector si cele 4 tevi port proba



Fotografie a activatorului de neutroni instalat pe linia de fascicul extern a ciclotronului TR19 al IFIN-HH. Se pot vedea cărămizile de parafină care acoperă întregul sistem pentru a minimiza fluxul de neutroni în exterior

Obiectivul general al Etapei 3. Testarea Activatorului cu Neutroni. Studiu de caz al affibody marcați cu Ho-166 pentru diagnostic și terapie țintită

Activitate 3.1 Teste de iradiere și caracterizări radiologice

Scopul principal este de a dovedi fezabilitatea obținerii radiofarmaceuticului medical cu ajutorul Activatorului cu Neutroni

Producția de Holmium-166 pentru diagnostic și terapie țintită; caracteristici

- Holmium-166 unul dintre cei mai eficienți radionuclizi utilizați pentru terapia țintită
- Radiație β de mare energie $E\beta_1=1854,9\text{keV}$ 50%, $E\beta_2=1774,3\text{keV}$ 48%
- Interval de penetrare în țesut (max. 8,7 mm)
- Timp de înjumătățire 26,8 ore, dezintegrare la Er-166 stabil
- este considerat a fi o alegere bună de utilizat pentru brahiterapie. De asemenea, a fost propus recent pentru controlul local al melanomului malign
- Ho-166 emite, de asemenea, raze γ (80,5 keV), utile pentru imagistica în timp real

Au fost efectuate opt sesiuni de iradiere a pulberii de holmiu natural de puritate ridicată sub forma de Ho_2O_3 . Au fost efectuate spectrometrii gamma pentru probele iradiate și s-au determinat experimental activitățile produsilor rezultați.

Raport iradiere Ho-165 2022.09.29

Tip de iradiere: iradiere cu protoni pe linia 6m, Side 1 in Hala de experimente

Scop: Testare Activator cu neutroni

Tinta 1: Be+Ta

Reactia nucleara ${}^9\text{Be}(p,n){}^9\text{B}$ $T_{1/2}=8.439\times 10^{-19}$ sec
 ${}^{181}\text{Ta}(n,2n){}^{180}\text{Ta}$ $T_{1/2}=8.125$ h

Tinta 2 natHo

Reactia nucleara ${}^{\text{nat}}\text{Ho}(n,\gamma){}^{166}\text{Ho}$ $T_{1/2}=26.8$ h

Data solicitata: 27.09.2022-29.09.2022

Energie extrasa 18MeV

Curent de protoni: $I=15\ \mu\text{A}$, $10\ \mu\text{A}$ și $6\ \mu\text{A}$

Timp de iradiere $T=47$ h

Curent integrat: $I_{\text{int}}=532.9\ \mu\text{A}$

Activitati masurate

Fiola Pozitia in Activator	Ho ₂ O ₃ gram	Activitate masurata (MBq) in data de 2022.09.29 la ora:	
		12:22	13:33
A1	0.9962	6.16	5.79
B1	1.0057	6.90	6.53
C1	1.0004	7.23	6.88
D1	1.0029	7.35	7.02

Pulberea de Holmiu iradiata in cele 4 flacoane a fost deversata intr-un alt flacon din sticla și măsurată activitatea din nou: $A_0=18.70$ MBq la ora 13:50

A fost făcută apoi o soluție de HoCl_3 cu volumul de 7.6 ml și pH=4.0

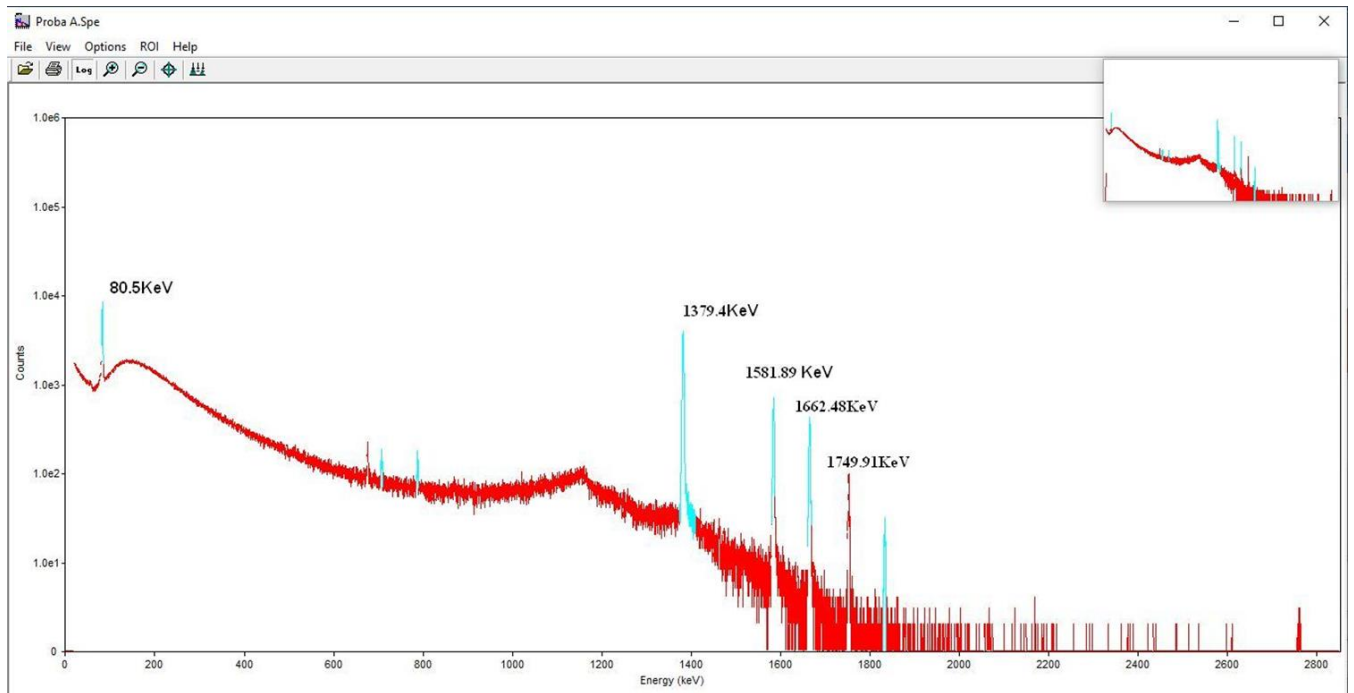
Activitatea măsurată la ora 17:02 a fost:

$A_1 = 15.46$ MBq

Marcarea Ho-DOTA-NT (8-13)

Activitatea măsurată la ora 18:38 a fost: $A_2 = 4.93$ MBq /2 ml

Activitatea Ho-166 la ora 8:25 a fost: $A_3 = 8.16$ MBq/5.6ml



Spectrul gamma pentru Ho-166 obtinut cu detector High Purity Germanium (HPGe).
Se observa linia principala de 80.5 KeV caracteristica dezintegrării pentru Ho-166

In cadrul proiectului NARAD, P1 IBAR a realizat urmatoarele obiective:

A1.3. Schita experimentelor si achizitie de materiale

Pentru acest obiectiv, s-a realizat planificarea in detaliu a experimentelor si design-ul constructului ce a fost utilizat ulterior in experimente: 6xHis-SUMO-Affibody anti-HER2. Plasmidul pentru acesta a fost comandat de la Genscript. De asemenea, s-au achizitionat toate materialele si reactivii necesari indeplinirii tuturor obiectivelor, conform planului proiectului.

A2.7. Expresia la scara larga si purificarea prin afinitate a Affibody anti-HER2

Affibody anti-HER2 a fost exprimat in sistem procariot si apoi purificat prin cromatografie de afinitate pe coloane HisTrap, pe baza secventei 6xHis. Randamentul de obtinere a affibody final a fost ridicat, permitand utilizarea acestuia in urmatoarele etape experimentale.

A2.8. Dezvoltarea metodelor analitice de monitorizare a compozitiei monomer-dimer a affibody

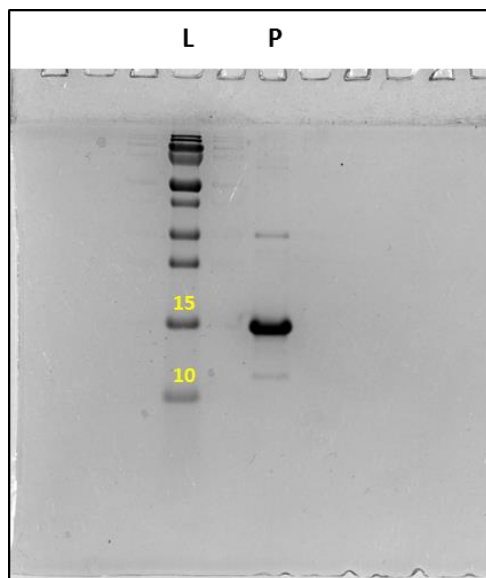
Pentru acest scop, s-a realizat o reactie de reducere in solutie a affibody obtinut, cu diferiti compusi. In urma analizei rezultatelor reactiei, este evident faptul ca affibody anti-HER2 obtinut nu a format/a format in proportie neglijabila dimeri in solutie, deci calitatea acestuia a fost ridicata. Astfel, affibody anti-HER2 obtinut a putut fi utilizat in reactia de cuplare cu MMA-DOTA.

A2.9. Cuplarea de control a affibody cu derivatul MMA al unui colorant fluorescent

Affibody anti-HER2 a fost apoi cuplat directionat, pe baza reactiei cu gruparea maleimida, cu fluoroforul MMA-Alexa 555. Din analiza HPLC a amestecului de reactie de conjugare a reiesit faptul ca reactia a avut succes si conjugatul fluorescent a fost obtinut.

A2.10. Cuplarea la affibody a unor chelatori selectati (MMA-DOTA, MMA-NODAGA, s.a.)

Pentru indeplinirea acestui obiectiv, s-a realizat cuplarea Affibody anti-HER2 cu MMA-DOTA, prin aceeasi reactie cu gruparea maleimida utilizata si in cazul conjugarii cu MMA-Alexa 555 (realizata in cadrul obiectivului A2.9.). Obtinerea acestui conjugat a fost un proces de lunga durata, deoarece reactia este dificil de realizat cu randament mare si sunt necesare conditii foarte stricte de lucru. In ciuda acestor inconveniente, conditiile de reactie au fost optimizate in mod empiric si s-a putut obtine conjugatul affibody anti-HER2-MMA-DOTA, conform planului proiectului. Ca alternativa pentru chelatorul DOTA, conform planului proiectului, s-a realizat design-ul unui construct nou, format din Affibody anti-HER2 fuzionat cu peptida chelatoare de lantanide LBT-15. Plasmidul pentru acest nou construct a fost comandat de la Genscript, apoi proteina a fost exprimata in sistem procariot si purificata la grad inalt de puritate prin cromatografie de afinitate pe coloana HisTrap, pe baza secventei 8xHis, fiind capabila direct sa lege lantanide cu un grad mare de afinitate. Obtinerea constructului affibody anti-HER2-LBT-15 de catre P1 IBAR reprezinta o noutate, un compus valoros, atat pentru diagnostic, cat si pentru terapie. Ambele constructe purificate sunt capabile sa lege nu numai Ho^{3+} , conform planului proiectului, dar si alte lantanide utile in imagistica si terapie.



Imaginea proteinei Affibody anti-HER2 pura obtinuta, vazuta intr-un gel ca o banda neagra. L – Marker pentru a indica marimea proteinei; P – Affibody pur obtinut

A3.8. Dezvoltarea unor metode analitice pentru monitorizarea reactiei de cuplare chelator-affibody

In urma studiului atent al literaturii stiintifice, este evident faptul ca exista insuficiente informatii in ceea ce priveste anumite tehnici clare pentru monitorizarea reactiei de cuplare

cu gruparea maleimida. In ciuda acestui lucru, pentru a indeplini acest obiectiv, P1 IBAR a realizat 4 tehnici analitice menite sa monitorizeze reactia de cuplare. S-a realizat o gel filtrare cuplata cu analiza spectrelor de absorbanta ale fractiilor colectate, dar spectrele nu au aratat o diferenta intre conjugat si affibody nereactionat. Apoi, mixul de conjugare a fost amestecat cu un suport solid de rasina de Ni-agaroză. DOTA leaga ionii de Ni^{2+} cu o afinitate ridicata si intr-un gel SDS-PAGE s-ar putea vedea conjugatul legat de suportul solid. Aceasta analiza a fost realizata, insa, probabil cantitatea de conjugat obtinuta a fost nedetectabila prin SDS-PAGE. Aceasta analiza se va repeta cu cantitati mai mari de conjugat. Rezultatele obtinute in urma acestor doua tehnici au fost prezentate in cadrul proiectului. De asemenea, a fost confirmat ca reactia de conjugare a avut intr-adevar loc, calitativ prin MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) si prin analiza HPLC. Rezultatele preliminare obtinute din aceste doua metode analitice vor fi prezentate in publicatiile emergente.

A3.9. Purificarea la puritate inalta a conjugatelor affibody-chelator

Pentru purificarea conjugatului Affibody anti-HER2-MMA-DOTA, s-a realizat o gel filtrare bazata pe diferenta dintre spectrele de absorbanta ale componentelor reactiei – Affibody anti-HER2 si DOTA-MMA. Apoi, s-a realizat si o dializa in doi pasi pentru a elimina DOTA-MMA in exces. Astfel, s-a obtinut o puritate corespunzatoare a conjugatului, conform planului proiectului, pentru ca acesta sa fie utilizat in studiile functionale de marcare cu Ho^{3+} si de validare ale compusului, realizate de ceilalti parteneri din cadrul proiectului.

In concluzie, toate obiectivele aferente P1 IBAR din cadrul proiectului NARAD au fost indeplinite. In ceea ce priveste obiectivul **A3.8.**, rezultatele preliminare vor fi dezvoltate si tehnicile de analiza vor fi imbunatatite pentru publicatiile emergente.

2. Prezentarea și argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului

Conform definițiilor TRL, proiectul nostru a început de la TRL 2 (Un concept de tehnologie existent și o aplicație formulată) și se termină la TRL 4 (Tehnologie validată în laborator). În consecință, trecerea de la TRL 2 la TRL 4 exprimă cercetarea pentru a dovedi fezabilitatea proiectului propus.

Într-adevăr, rezultatele noastre anterioare și experimentul raportat la JRC-Ispra ne-au permis să înțelegem clar cerințele dificile și complexitatea obiectivului principal al prezentei propuneri de proiect de a dezvolta propriile idei de cercetare, noi protocoale și de a formula concepte practice pentru tehnologie nouă. Am proiectat și executat un model funcțional de Activator de neutroni bazat pe principiul ARC demonstrând ca tehnologia este validată. De asemenea, obiectivul de a obține produsul radiofarmaceutic medical Holmium-166 pentru terapie țintită folosind un activator de neutroni compact cu accelerator a trecut toate testele specificate în proiect

Pentru partea aferenta partenerului **P1 IBAR**, nivelul de maturitate tehnologica atins este TRL 3-4, asa cum a fost propus in planul proiectului. Acest nivel a fost indeplinit, deoarece P1 a demonstrat ca se pot obtine compusii necesari (cele doua constructe Affibody anti-

HER2) pentru studiile functionale *in vitro* si *in vivo* si mai mult, affibody anti-HER2 conjugat cu un chelator de lantanide a fost validat pentru imagistica pe soareci, de catre colaboratori ai P1 IBAR.

3. *Gradul de atingere a rezultatelor estimate*

Rezultatele estimate au fost atinse conform planului proiectului.

- A fost proiectat, executat si testat Activatorul cu neutroni pilotat de ciclotronul TR19, componenta majora a proiectului NARAD. Au fost efectuate opt sesiuni de iradiere folosind probe de holmiu natural de inalta puritate sub forma Ho_2O_3 conform reactiei nucleare:

$^{165}\text{Ho}(n,\gamma)^{166}\text{Ho}$. Astfel a fost demonstrata fezabilitatea Activatorului cu neutroni pilotat de un cilotron cu energia in domeniul 14-19 MeV

- Partenerul P1 IBAR a obtinut doi compusi importanti: Affibody anti-HER2-MMA-DOTA si Affibody anti-HER2-LBT-15, acesta din urma fiind chiar o noutate care va fi prezentata in articole viitoare

4. *Impactul rezultatelor obtinute*

Impactul esential al succesului acestui proiect consta in demonstrarea fezabilitatii folosirii metodei ARC la cuplarea cu clotrotronul TR19 cu energie variabila 14-19 MeV si curent de protoni maxim de 300 μA

Pana in acest moment nu a fost raportat in literatura de specialitate un experiment folosind metoda ARC, atunci când este cuplată cu ciclotroane de dimensiuni mici, utilizate în prezent pentru producerea de izotopi PET (16-19 MeV, 100 μA). Aceasta categorie de ciclotroane este cea mai raspandita si poate fi utilizată eficient pentru a produce doze terapeutice de radiofarmaceutice pentru brahiterapie.

Fundamentul teoretic al Activatorului cu neutroni este Principiul ARC (Adiabatic Resonance Crossing) descoperit de Carlo Rubbia (Premiului Nobel pentru Fizică în 1984) Experimentele anterioare bazate pe conceptul ARC:

- Experimentul TARC (CERN 1996) pentru transmutarea Tc-99, folosind un fascicul de protoni de 3,5 GeV și un ansamblu de plumb foarte mare (dimensiuni de 3m, 334 tone).
- Al doilea experiment a fost proiectat si realizat la University of Louvain (UCL-Belgium, 2002) cu un ansamblu de plumb de inalta puritate 1.6x1.6x1.63 m3 si 47 tone folosind un fascicul de protoni de 65-75 MeV
- Experimentul de la JRC-Ispra (2006) Neutroni produși de fascicul de protoni (max 40 MeV) care bombardează ținta de Be, instalație de 0,6 tone Pb, 60x60x60 cm3

Conceptul de activare cu neutroni dezvoltat în acest proiect poate constitui o alternativă atractivă la reactoarele nucleare pentru producerea anumitor radioizotopi, pentru analiza medicală sau alte aplicații

Cei doi compusi produși de **P1 IBAR** sunt obtinuti amandoi prin tehnici si tehnologii stiintifice moderne, reprezinta abordari curente in cercetarea cancerului si sunt extrem de utili, chiar si in aceste etape preclinice, pentru dezvoltarea in viitor a unor produse revolutionare atat in diagnosticul pacientilor cu cancer de san, colorectal etc., cat si in terapia cu succes a acestora. De asemenea, posibilitatile produsilor terapeutici sau de imagistica ce pot proveni din acesti doi compusi obtinuti de P1 IBAR sunt nenumarate, din moment ce

ambii compusi pot fi marcati nu numai cu Ho³⁺, dar si cu alte lantanide utilizate in tratamentul si diagnosticul cancerului.

5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului.

- elaborarea site-ului web al proiectului care cuprinde informații despre obiectivele proiectului, partenerii de proiect, prezentarea rezultatelor preliminară/finală, participarea la conferințe, rezumate ale lucrărilor participante la conferințe, lista publicațiilor, link-uri utile, informații utile pentru mass-media științifică, utilizatori și posibile noi parteneri etc.;
- participarea la conferințe științifice naționale și internaționale în cadrul cărora au fost prezentate rezultatele preliminară/proiectul final și au fost identificate noi oportunități de colaborare;
- organizarea de mese rotunde pentru promovarea rezultatelor obținute, având ca scop principal facilitarea întâlnirilor dintre cercetătorii științifici cu preocupare în domeniul nostru, școli de vară pentru tineri cercetători;
- publicarea articolelor în reviste de specialitate.

În plus, am folosit oportunitatea colaborării în parteneriat cu facultatea de Fizică a Universității din București pentru a prezenta studenților rezultatele cercetării noastre. Valorificarea/diseminarea rezultatelor a fost făcută și în programele educaționale dedicate studenților absolvenți care efectuează stagii de lucru în perioada de masterat, pregătirea lucrărilor de dizertație și doctoranzilor.

Rezultatele obținute de către **P1 IBAR** în proiectul NARAD sunt valoroase și vor fi prezentate într-un manuscris în curs de elaborare, care va fi trimis spre publicare în curând, precum și în manuscrise viitoare. De asemenea, aceste rezultate vor fi prezentate în cadrul Scolii Doctorale a Academiei Române, în prima jumătate a lunii Decembrie, la IBAR. Mai mult, compusii obținuți pot fi baza unui studiu-pilot viitor de validare *in vivo* a acestora.

6. Prezentarea livrabililor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuși.

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați	Nr.
1.	Etapa 1 Raport științific	1	Raport științific	1
2.	Etapa 2 Raport științific și tehnic	1	Raport științific și tehnic	1
3	Etapa 2 Pagina web	1	https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/20-proiecte.html	1
4	Etapa 2 Articol științific	1	Articol științific	1
5	Etapa 2 Conferința	1	Conferința	6
6	Etapa 3 Raport științific	1	Raport științific	1
7	Etapa 3 Articol științific	1	Articol științific	3
8	Etapa 3 Conferința	1	Conferința	1