



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



PEDECIBA



UDELAR
FACULTAD DE
QUÍMICA

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE QUÍMICA

PEDECIBA QUÍMICA

TESIS DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

**Desarrollo y evaluación de complejos de
metales de transición y ligandos
nitroimidazólicos con potencial aplicación en
Medicina Nuclear.**

B.C. Soledad Fernández

**Directores de tesis:
Dra. Ana M. Rey
Dr. Hugo Cerecetto**

Agosto, 2011.

**A mis padres y a mi hermana,
por su apoyo constante e incondicional, siempre.**

ÍNDICE

1- RESUMEN	5
2- INTRODUCCIÓN	8
3- OBJETIVOS	43
3.1 – Objetivos generales	43
3.2 – Objetivos específicos	43
4 – PARTE EXPERIMENTAL	46
4.1 – Materiales	46
4.2 – Métodos	47
4.2.1 – Síntesis de ligandos	47
4.2.1.1 - Síntesis de N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2)	47
4.2.1.2 - Síntesis de la sal sódica del ácido N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilditiocarbámico (L3)	49
4.2.1.3 - Síntesis del ácido 10-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L4)	50
4.2.1.4 - Síntesis del ácido 10-{[N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil]-1,4,7-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (L5).	51
4.2.2 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc	52
4.2.2.1 - Síntesis del precursor tricarbónico <i>fac</i> -[^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺	52
4.2.2.2 - Síntesis del precursor tricarbónico <i>fac</i> -[^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ a partir de kit comercial	53
4.2.2.3 - Síntesis del complejo tricarbónico con L1	53
4.2.2.4 - Síntesis del complejo tricarbónico con L2	54
4.2.2.5 - Síntesis del complejo tricarbónico con L3	54
4.2.3 – Síntesis de los complejos de ⁶⁸Ga	55
4.2.3.1 - Síntesis del complejo con L4	55
4.2.3.2 - Síntesis del complejo con L5	55
4.2.4 – Caracterización fisicoquímica de los complejos	55
4.2.4.1 - Determinación de la lipofilicidad	55
4.2.4.2 - Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas	56
4.2.4.3 - Determinación de la estabilidad en el medio de reacción	56
4.2.4.4 - Determinación de la estabilidad en plasma	56
4.2.5 – Caracterización biológica de los complejos	57
4.2.6 – Preparación de los complejos con Re estable para los ligandos L2 y L3	58
4.2.6.1 - Síntesis del complejo precursor <i>fac</i> -[NEt ₄] ₂ [Re(CO) ₃ Br ₃]	58
4.2.6.2 - Síntesis de los complejos Re(I) tricarbónicos de L2	59

	y L3	
5 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN		60
5.1 – Síntesis de los ligandos		60
5.1.1 - Síntesis de N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2)		60
5.1.2 - Síntesis de la sal sódica del ácido N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilditiocarbámico (L3)		71
5.1.3 - Síntesis del ácido 10-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L4)		73
5.1.4 - Síntesis del ácido 10-[[N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L5)		79
5.2 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc		83
5.2.1 - Síntesis del precursor tricarbónico <i>fac</i>-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺		83
5.2.2 - Síntesis del complejo tricarbónico con L1		84
5.2.3 - Síntesis del complejo tricarbónico con L2		86
5.2.4 - Síntesis del complejo tricarbónico con L3		88
5.3 – Síntesis de los complejos de ⁶⁸Ga		89
5.3.1 - Síntesis del complejo con L4		89
5.3.2 - Síntesis del complejo con L5		91
5.4 – Caracterización fisicoquímica de los complejos		92
5.4.1 - Lipofilicidad		92
5.4.2 - Unión a proteínas plasmáticas		93
5.4.3 - Estabilidad en el medio de reacción		95
5.4.4 - Estabilidad en plasma		95
5.5 – Caracterización biológica de los complejos		95
5.5.1 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos		95
5.5.1.1 - Complejos de ^{99m}Tc		96
5.5.1.2 - Complejos de ⁶⁸Ga		107
5.5.2 - Correlación entre parámetros fisicoquímicos y biológicos		112
5.6 - Preparación de complejos con renio estable para los ligandos L2 y L3		114
5.6.1 - Preparación del complejo precursor Re(I)-tricarbónico		115
5.6.2 - Complejo de renio con L2		116
5.6.3 - Complejo de renio con L3		119
6 – CONCLUSIONES		123
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS		126
8 – REFERENCIAS		128
9 – AGRADECIMIENTOS		140

1 – RESUMEN

Un elevado porcentaje de tumores sólidos presentan zonas hipóxicas y su identificación tiene gran importancia debido a que presentan mayor resistencia a la quimioterapia por su pobre irrigación y una mayor radiorresistencia por la baja pO_2 .

La Medicina Nuclear es una especialidad médica que utiliza compuestos radiactivos conocidos como radiofármacos, para fines diagnósticos o terapéuticos. Los radiofármacos de diagnóstico emplean radionucleidos emisores γ , cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente y permiten la obtención de imágenes. En el presente trabajo se han desarrollado cinco compuestos con potencial aplicación para el diagnóstico de tumores hipóxicos. Para ello, se han seleccionado dos radionucleidos, ^{99m}Tc y ^{68}Ga . El primero de ellos es un emisor γ , mientras que el segundo es un emisor de positrones, del que se detecta la radiación de aniquilación (fotones γ).

La primera etapa del trabajo consistió en sintetizar ligandos adecuados para la formación de compuestos de coordinación con los radionucleidos. Para ello, se ha seleccionado la función 5-nitroimidazol como la unidad farmacofórica. Los nitroimidazoles son compuestos biorreducibles que son irreversiblemente reducidos en células con baja presión de O_2 por acción de enzimas intracelulares originando compuestos hidrofílicos que pueden quedar atrapados dentro de la célula por no poder atravesar la membrana. Esta propiedad permite su utilización en la preparación de potenciales radiofármacos para detección de tejido hipóxico.

Para la síntesis de los cinco ligandos, se toma como reactivo de partida el Metronidazol[®], fármaco antiparasitario comercial, al que mediante modificaciones químicas se le adicionan grupos quelantes adecuados para la formación de complejos con cada metal.

La estrategia utilizada para unir el tecnecio al ligando conteniendo el farmacóforo es a través de la formación de un complejo $Tc(I)$ -tricarbonílico, en el que el metal se encuentra coordinado por tres grupos carbonilo que estabilizan el estado de oxidación bajo, quedando tres posiciones de coordinación libres para completar con el ligando seleccionado. Para el caso del complejo con el primer ligando (L1), los resultados

muestran la formación de una única especie con elevada pureza radioquímica, estable por al menos 4 horas, mientras que para el complejo con el segundo ligando (L2) se obtienen dos especies que se interconvierten en solución y que juntas poseen una elevada pureza radioquímica. En la síntesis del complejo de ^{99m}Tc con L3 se obtienen nuevamente dos especies en equilibrio. La estabilidad para estos casos también resultó ser mayor al 90% por al menos 4 horas.

La evaluación fisicoquímica de los complejos se realizó mediante la determinación de lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. Se encontraron valores de $\log P$ intermedios o moderados que correlacionan con las cargas formales de los complejos y elevadas uniones a proteínas plasmáticas.

Los resultados de los estudios de comportamiento biológico en animales portadores de tumor revelaron que los tres complejos de ^{99m}Tc presentan una muy elevada captación hepática. La captación tumoral es moderada para los complejos 1 y 2 ($0.93 \pm 0.21\%/g$ y $1.33 \pm 0.32\%/g$, respectivamente a las 2 horas) y menor para el complejo 3 ($0.75 \pm 0.08\%/g$ a 0.5 horas, disminuyendo con el tiempo). En todos los casos la relación tumor/músculo fue de muy buena a buena (3.19 ± 0.26 , 1.93 ± 0.34 y 1.41 ± 0.54 para C1, C2 y C3, respectivamente a las 2 horas), con relaciones tumor/sangre menores a la unidad.

Los estudios estructurales con renio estable para C2 indicarían que el ligando actúa de manera bidentada, mientras que para C3 las coordinaciones bidentada o tridentada son compatibles con los resultados obtenidos.

Para los complejos de ^{68}Ga , la función 5-nitroimidazol se ha acoplado a una unidad DOTA, agente quelante ampliamente utilizado para dicho metal. Las marcaciones de los ligandos L4 y L5 con ^{68}Ga resultan en la formación de una única especie, para cada caso, de elevada pureza radioquímica, estables durante las 4 horas post-marcación. Su elevada hidrofiliicidad y baja unión a proteínas plasmáticas correlaciona con los resultados biológicos. El complejo de ^{68}Ga con L4, mostró una captación hepática muy baja ($0.34 \pm 0.07\%$), así como una rápida depuración sanguínea ($0.34 \pm 0.07\%$) y alta eliminación por vía renal ($91.40 \pm 0.40\%$) a las 2 horas post-inyección. Las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre son muy favorables (4.96 ± 1.97 y 1.20 ± 0.43 , respectivamente), mientras que la captación tumoral es

levemente menor que para los complejos de ^{99m}Tc ($0.66 \pm 0.59\%/g$). Las biodistribuciones del complejo de ^{68}Ga con L5 muestran un patrón muy similar al otro complejo de ^{68}Ga a las 0.5 horas post-inyección.

Como conclusión, se ha trabajado en todas las etapas del diseño de un radiofármaco, y los resultados obtenidos son promisorios, aunque nuevos estudios serán necesarios para continuar la caracterización de los complejos.

2 - INTRODUCCIÓN

El microambiente tumoral está constituido por el flujo sanguíneo, la microcirculación, el aporte de oxígeno y nutrientes, el pH residual y el estado bioenergético y metabólico de un tumor. Este microambiente influye en las características biológicas de los tumores, como la tasa de proliferación celular o el potencial de invasión metastásico y angiogénico. También influye en la respuesta de los tumores al tratamiento radioterápico y quimioterápico, o ambos, demostrándose el efecto de los niveles bajos de oxígeno en la resistencia a la radioterapia externa, entre otras (1).

La hipoxia se produce cuando la demanda metabólica de oxígeno de un tumor excede los niveles aportados por la circulación sanguínea, observándose valores de presión parcial de oxígeno por debajo de 5 mmHg (2). Una revisión reciente de la bibliografía del tema describe diversos factores que contribuyen a un inadecuado transporte de oxígeno e hipoxia (3). Entre ellos, se destaca una baja densidad vascular sobre el tejido junto con un incremento en el consumo de oxígeno. Este aumento del consumo es una consecuencia de la constante replicación celular y crecimiento tumoral. La angiogénesis promovida por factores del propio tejido surge como estrategia para satisfacer esa demanda de oxígeno. Sin embargo, a menudo la velocidad de formación de nuevos vasos es insuficiente y se desarrollan regiones hipóxicas en las que las células se adaptan a esta condición para sobrevivir (4,5).

El estado de hipoxia en un tejido origina tanto cambios metabólicos como genéticos (1). Entre las modificaciones metabólicas se destacan la disminución de fosforilación oxidativa y el aumento de la glucólisis a causa de la falta de oxígeno. A su vez, este aumento de la vía de glucólisis conlleva cambios importantes de pH, debido a la acumulación de ácidos. La difusión de dióxido de carbono desde y hacia los vasos sanguíneos es una de las principales herramientas reguladoras de estos cambios de pH, y la pobre irrigación del tejido hipóxico contribuye a la disminución del mismo (6). Este metabolismo anaeróbico no es el único cambio que surge en las células hipóxicas como mecanismo de adaptación. La liberación de factores transcripcionales conocidos como *factores inducibles por hipoxia* o *hypoxia-inducible factors (HIFs)*, constituyen una pieza clave que activa la transcripción de una diversa gama de genes

destinados a proteger las células de la hipoxia (7). La regulación transcripcional de decenas de genes bajo condiciones de baja presión de oxígeno está mediada por la unión del factor HIF-1. Dicho factor consiste en un heterodímero compuesto por dos subunidades denominadas HIF-1 α y HIF-1 β . La transcripción génica se activa cuando ambas subunidades se encuentran unidas. La subunidad HIF-1 β ubicada a nivel nuclear, por sí sola no es capaz de activar esta transcripción, por lo que es imprescindible la translocación de la subunidad citoplasmática HIF-1 α para la dimerización. La figura 1 esquematiza el mecanismo bioquímico que permite regular la disponibilidad de HIF-1 α para su translocación y formación del factor HIF-1.

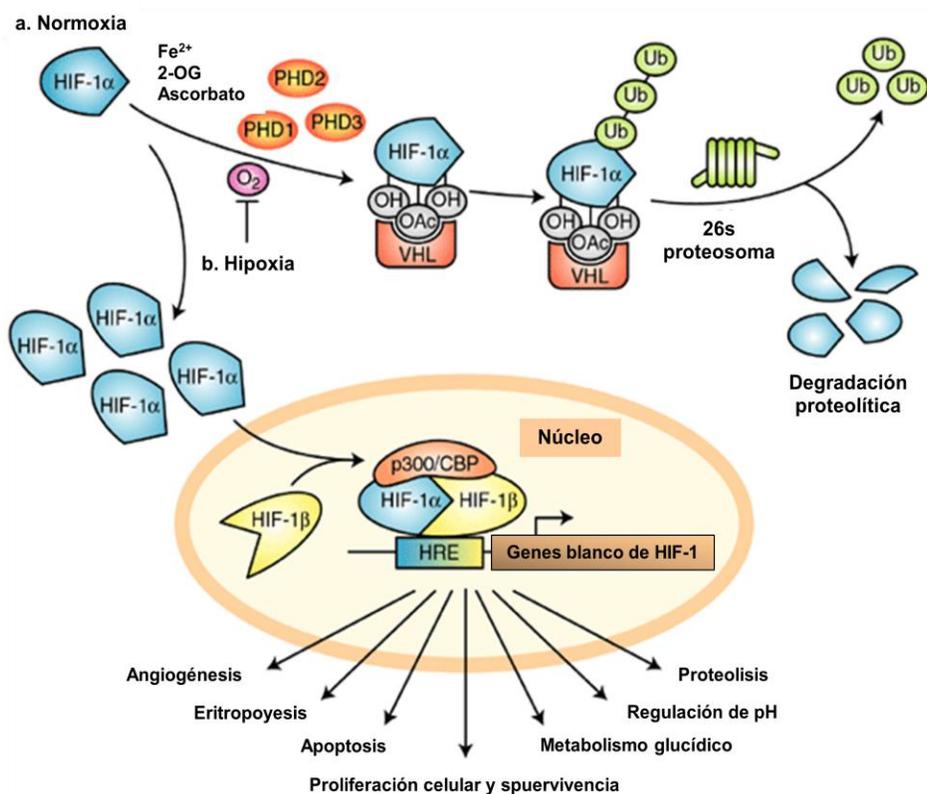


Fig. 1. Esquema de degradación y activación de HIF-1. **(a)** Condiciones de normoxia. Degradación de HIF-1 α . **(b)** Condiciones de hipoxia. Acumulación de HIF-1 α y formación de HIF-1. (Esquema adaptado de Expert Reviews in Molecular Medicine. Vol. 7; Issue 6; 15. Abril 2005).

En normoxia (niveles normales de presión parcial de oxígeno), el HIF-1 α es hidroxilado por hidroxilasas (*PHD1*, *2* y *3*) en presencia de oxígeno, Fe²⁺, 2-

oxoglutarato (2-OG) y ascorbato. Esta hidroxilación y otros procesos de acetilación permiten que HIF-1 α sea reconocido por una proteína denominada *VHL* la cual, junto con subunidades de ubiquitinas, finalmente deriva en la degradación de HIF-1 α por el proteosoma. En condiciones de hipoxia, la hidroxilación se encuentra inhibida y *VHL* no es capaz de unirse a HIF-1 α para su posterior degradación. Esto conduce a la acumulación de la subunidad y su translocación al núcleo, donde se dimeriza con HIF-1 β . Una vez formado el HIF-1, éste reconoce secuencias promotoras de diversos genes, recluta otros factores activadores de la transcripción (*p300/CBP*) y permite la transcripción (8).

Estos genes activados regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadoras hasta hormonas involucradas en la regulación de la circulación y la eritropoyesis. El papel de HIF-1 no se restringe únicamente a la inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que también participa significativamente en los mecanismos de reparación celular. Como consecuencia de todo esto, la hipoxia en los tumores puede inducir cambios que permitan a las células superar la privación nutritiva y favorecer el crecimiento sin restricciones (9-15).

Las investigaciones clínicas llevadas a cabo durante las últimas décadas han demostrado que la prevalencia de zonas de tejido hipóxico es una propiedad característica de los tumores sólidos avanzados. Estas regiones se han encontrado en una amplia gama de tumores malignos: cáncer de mama, cuello uterino, próstata, recto, páncreas, pulmón, tumores cerebrales, sarcomas de tejido blando, linfoma no-Hodgkin, melanomas malignos, tumores metastásicos de hígado, entre otros (16-20). La evidencia acumulada muestra que hasta un 50-60% de tumores sólidos avanzados pueden presentar hipoxia y/o zonas anóxicas. Además, la evidencia clínica y experimental sugieren que dicha expresión génica inducida por HIF-1 en respuesta a un ambiente hipóxico contribuye a la progresión del tumor hacia metástasis (21,22).

Por otra parte, la hipoxia se asocia con una disminución en la eficacia del tratamiento quimioterapéutico. Esto no es solamente debido a la pobre difusión de los fármacos desde los vasos hacia el tumor a causa de la menor irrigación, como se pensaba en un principio, sino también a los cambios en el fenotipo celular como consecuencia de

la activación de genes mencionada anteriormente (23,24). Además, también se asocia con una resistencia a la radioterapia ya que la menor presión parcial de oxígeno hace que se forme menor cantidad de radicales libres de éste, causantes de la muerte celular mediante dicho tratamiento.

El rol de la hipoxia en la evolución tumoral y la resistencia a la terapia han llevado a considerarla como un importante blanco terapéutico y grandes esfuerzos se dedican para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos con selectividad hacia este tipo de tejido. En este sentido, dos grandes estrategias se han descrito (25). La primera de ellas consiste en la utilización de *pro-fármacos biorreducibles*, que son activados por reducción enzimática en tejido hipóxico. Desde el punto de vista químico, estos pro-fármacos son variados, encontrándose moléculas con farmacóforos tales como grupos nitro, quinonas, *N*-óxidos aromáticos y alifáticos (25), entre otros. El mecanismo de acción está mediado por la reducción enzimática de estas estructuras, lo que da lugar a especies con actividad citotóxica, como se esquematiza en la figura 2. La selectividad hacia el tejido hipóxico se explica por la irreversibilidad de la reducción a causa de la baja presión parcial de oxígeno, hecho que ha sido demostrado con compuestos nitro (26).

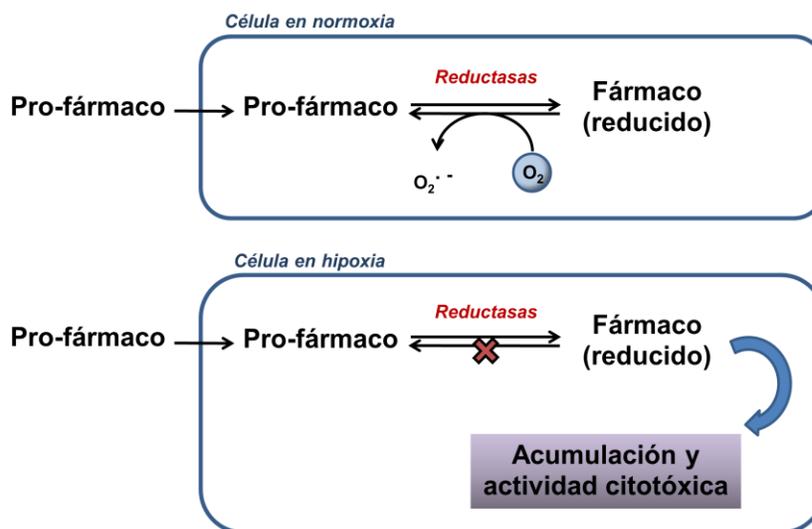


Fig. 2. Mecanismo de acción de pro-fármacos biorreducibles.

Es importante destacar que este mecanismo de biorreducción es diferente al mecanismo de radiosensibilización de los mismos compuestos. La radiosensibilización

se debe a la habilidad para reemplazar al oxígeno en la generación de radicales libres capaces de provocar un daño irreparable sobre la doble hebra de ADN (25,27,28). Algunos ejemplos de estos pro-fármacos se muestran en la figura 3.

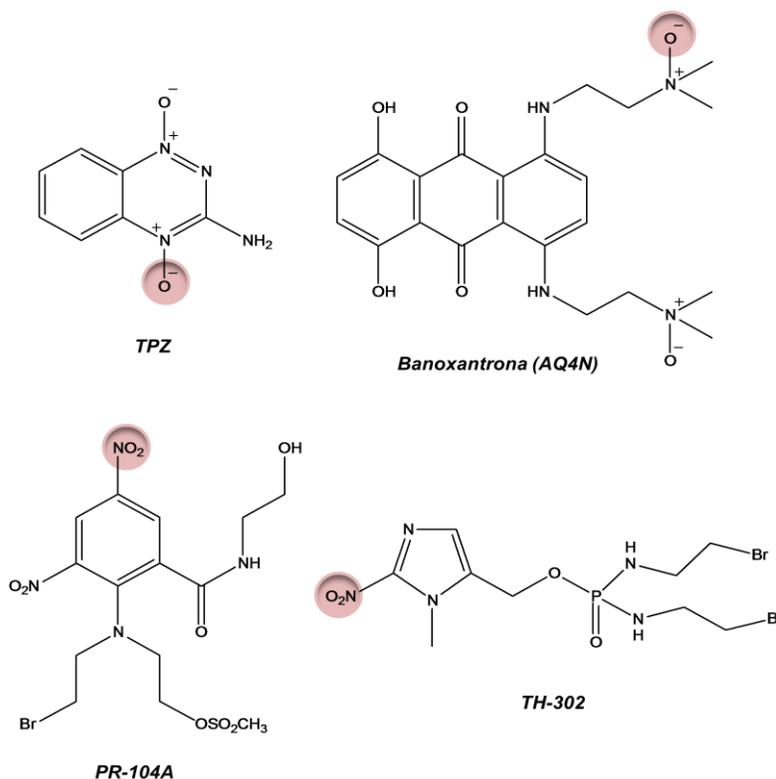


Fig. 3. Ejemplos de pro-fármacos biorreducibles selectivos hacia células hipóxicas. Se encuentran señalados los grupos que se reducen.

La difusión desde los vasos sanguíneos hacia las zonas hipóxicas junto con los procesos metabólicos a través de los cuales estos fármacos son biotransformados, han resultado ser factores de gran importancia a la hora de evaluar la eficacia de su acción. Por ello, se han dedicado grandes esfuerzos a la farmacomodulación con el fin de optimizar las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas.

La segunda estrategia utilizada para el desarrollo de agentes terapéuticos busca desarrollar inhibidores de blancos moleculares involucrados en la supervivencia de células hipóxicas, tales como la familia de factores de transcripción *HIF* (29,30).

Se ha demostrado que existe una extrema heterogeneidad entre la oxigenación de diversos tumores sólidos e inclusive se ha observado este mismo fenómeno dentro de

un mismo tumor (31). La medida directa de la presión parcial de oxígeno a través de electrodos ha comprobado lo anteriormente expuesto y es, hasta el día de hoy, el método diagnóstico de referencia. Sin embargo, en la actualidad se tiende a sustituir este tipo de procedimientos invasivos por métodos indirectos. Estos métodos pueden consistir en un monitoreo de marcadores de hipoxia endógenos, como por ejemplo, *HIFs*, o el uso de marcadores exógenos, como el *pimonidazol* que se une covalentemente a tioles de moléculas presentes en células hipóxicas. La figura 4 muestra la distribución de pimonidazol y *CA9*, una enzima cuya expresión está mediada por *HIFs* y funciona como un marcador endógeno de hipoxia.

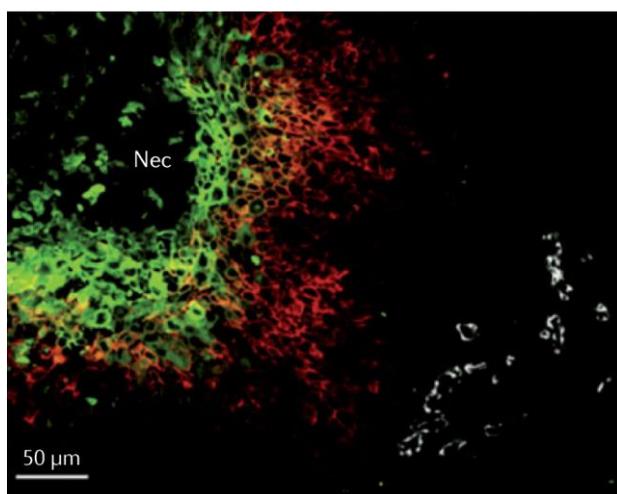


Fig. 4. Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la diferencia de distribución del pimonidazol, un marcador exógeno de hipoxia (color verde) y *CA9*, una anhidrasa carbónica regulada mediante *HIFs* que actúa como marcador endógeno (color rojo). En la imagen también se observan los vasos sanguíneos (color blanco) y la zona de necrosis del tumor. (Imagen extraída de Hoogsteen I.J. et. al., *Eur J Cancer*, 45, 2906-2914, 2009).

La extrema variabilidad obtenida en estudios con este tipo de marcadores (32) junto con la importancia no sólo del diagnóstico de hipoxia sino también la cuantificación de su extensión para establecer el pronóstico y la estratificación de ciertos tumores, ha hecho que la comunidad científica dedique gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos marcadores y nueva tecnología, en especial no invasiva, que permita realizar un correcto diagnóstico (33-36). Es aquí donde la Medicina Nuclear, entre otras, ha cobrado importancia como herramienta útil.

La Medicina Nuclear es una especialidad médica que utiliza radiaciones ionizantes con fines diagnósticos y terapéuticos. Para diagnóstico, se emplean emisores γ , cuya radiación de alto poder de penetración es detectada externamente, así como también

emisores de positrones, de los cuales se aprovecha la radiación de aniquilación de 0.51MeV de alto poder de penetración. En el caso de terapia, se emplean las radiaciones de poco poder de penetración como son las α y β^- , con el fin de destruir en forma selectiva y localizada el tejido a ser tratado (37).

A diferencia de otras técnicas que utilizan radiaciones ionizantes, la Medicina Nuclear involucra la administración al paciente de trazadores radiactivos, conocidos como *radiofármacos*. Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene al menos un átomo radiactivo en su estructura, siendo apto para ser administrado en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos, como se mencionó previamente (38).

El término *radiofármaco*, a diferencia del de *fármaco*, no implica la existencia de un efecto farmacológico en el sentido estricto de la palabra. Su utilidad radica en su potencial para diferenciar una anatomía, fisiología o bioquímica anormal de una normal, basándose en el patrón de distribución de este trazador en el organismo. A pesar de esto, la OMS incluye a los radiofármacos dentro de la categoría de fármacos y por lo tanto, se encuentran incluidos en las farmacopeas oficiales (39).

Un estudio básico de Medicina Nuclear se esquematiza en la figura 5. El primer paso consiste en la preparación del radiofármaco y su administración al paciente, siendo la vía intravenosa la más frecuente, aunque no es la única. A continuación, se deja transcurrir un tiempo apropiado para la distribución del radiofármaco y su concentración en el sitio de interés. Finalmente, se realiza la adquisición de la imagen mediante un detector externo.

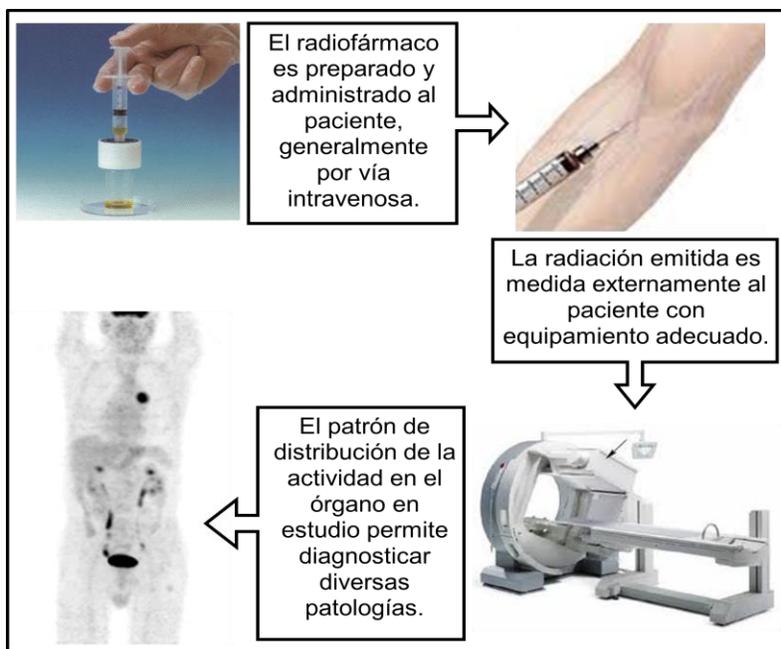


Fig. 5. Etapas de un estudio básico de Medicina Nuclear.

La principal ventaja de la Medicina Nuclear frente a otras modalidades de imagenología, tales como la Tomografía Computada o la Resonancia Magnética Nuclear, es la posibilidad de estudiar la funcionalidad de los órganos y no solamente su anatomía, ya que el mecanismo de captación y retención de los radiofármacos depende de dicha funcionalidad.

Dependiendo del tipo de emisor utilizado para estos estudios diagnósticos, la tecnología utilizada para tomar la imagen puede ser SPECT o PET.

La modalidad SPECT, o *single-photon emission computed tomography*, es utilizada a nivel mundial y en Uruguay desde hace años para obtener imágenes mediante el uso de radiofármacos que poseen emisores γ , mientras que la modalidad PET, o *positron emission tomography*, ha ganado cada vez más terreno y permite la utilización de radionucleidos emisores de positrones. Uruguay cuenta con SPECT desde el año 1982, cuando el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas recibió el equipamiento a través de la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), hecho que significó un importante avance en Medicina Nuclear en nuestro país. Desde principios del 2010, Uruguay también cuenta con la tecnología PET en el Centro

Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), hecho que ha representado otro gran avance.

En cualquiera de los dos casos, una adecuada selección del radionucleido a utilizar y la molécula que lo vehiculiza es fundamental para lograr la máxima eficiencia de la detección de la radiación emitida con una mínima dosis de radiación absorbida por el cuerpo del paciente.

A la hora de seleccionar el radionucleido, el tipo de radiación emitida y su energía, junto con el período de semidesintegración y accesibilidad, resultan ser consideraciones muy importantes a tener en cuenta.

Los radionucleidos metálicos son particularmente interesantes para el desarrollo de radiofármacos debido a sus propiedades nucleares tan variables (tipo de radiación, energía de sus fotones gamma o partículas beta, período de semidesintegración) y su rica química de coordinación (40). La tabla 1 muestra algunos ejemplos de radiometales y sus propiedades nucleares.

Radionucleido	Modo de decaimiento	Período de semidesintegración (horas)	Usos
^{99m} Tc	γ	6.0	Diagnóstico
⁶⁴ Cu	β^+ (19%) EC (41%) β^- (40%)	12.7	Diagnóstico y terapia
⁶⁸ Ga	β^+ (90%) EC (10%)	1.1	Diagnóstico
⁸⁹ Zr	β^+ (23%) EC (77%)	78	Diagnóstico
⁹⁰ Y	β^-	63.8	Terapia
¹¹¹ In	EC	67.9	Diagnóstico
¹⁵³ Sm	β^- , γ	46.8	Terapia
¹⁶⁶ Ho	β^- , γ	26.4	Terapia
¹⁷⁷ Lu	β^- , γ	88.8	Terapia

Tabla 1. Propiedades nucleares de algunos radiometales utilizados para diagnóstico y terapia en Medicina Nuclear. EC: decaimiento por captura electrónica.

Por otra parte, el uso de radionucleidos metálicos ofrece una amplia variedad de alternativas en el diseño y desarrollo de nuevos radiotrazadores. Dado que los agentes quelantes del metal pueden tener un gran impacto en las propiedades

biológicas del complejo, es posible modificar la biodistribución de los mismos mediante cambios sistemáticos en la región de coordinación del metal (41).

El diseño de radiofármacos con metales puede estar basado en diferentes estrategias. Una de ellas, conocida como *integrated approach*, que consiste en simular mediante el compuesto de coordinación la estructura del compuesto bioactivo. Una aplicación interesante de esta estrategia es el desarrollo de radiofármacos capaces de interactuar con el receptor de estrógenos, sobreexpresado en algunos tipos de tumores (48). Un ejemplo de éstos se muestra en la figura 6.

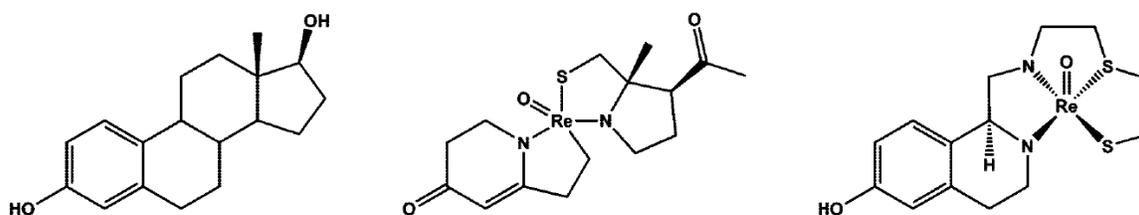


Fig. 6. Diseño de radiofármacos de renio a partir de la molécula de estradiol utilizando la estrategia *integrated approach*.

La segunda estrategia utilizada para la formación de radiofármacos con metales implica la utilización de agente bifuncionales (*BFCs*, *bifunctional chelates*). Este enfoque, conocido como *pendant approach*, se basa en la utilización de estructuras moleculares capaces de, por un lado, coordinar al metal por medio de grupos donores de electrones adecuados y, por otro lado, unirse covalentemente a la molécula que se quiera marcar (que contiene el farmacóforo) por medio de grupos químicos capaces de reaccionar con grupos presentes en la molécula en cuestión. En la mayoría de los casos, estos agentes bifuncionales poseen también lo que se conoce como *espaciador* con el fin de separar espacialmente la región de coordinación del metal del resto de la molécula y minimizar la posible interferencia entre el metal y la estructura de la molécula original (figura 7).

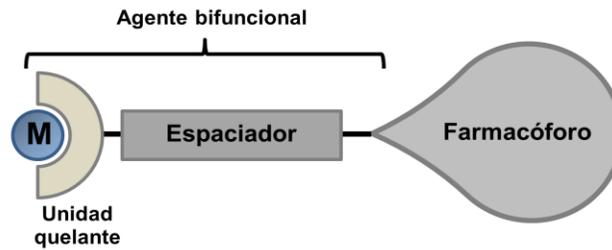


Fig. 7. Esquema de un agente bifuncional en el desarrollo de un radiofármaco.

La elección del BFC está determinada por la naturaleza y el estado de oxidación del radiometal, así como la posibilidad de conjugación al farmacóforo. Actualmente, ésta es la estrategia más ampliamente utilizada para el diseño de radiofármacos metálicos y existen varios ejemplos de aplicación exitosa de este concepto de marcación. Entre ellos se destacan los péptidos análogos a la somatostatina que, marcados con diferentes radionucleidos metálicos, se han utilizado para diagnóstico y terapia de tumores neuroendócrinos (42). La figura 8 muestra uno de ellos, en el que el péptido *octreotide* ha sido conjugado a un agente bifuncional, *DTPA*, para su marcación con ^{99m}Tc .

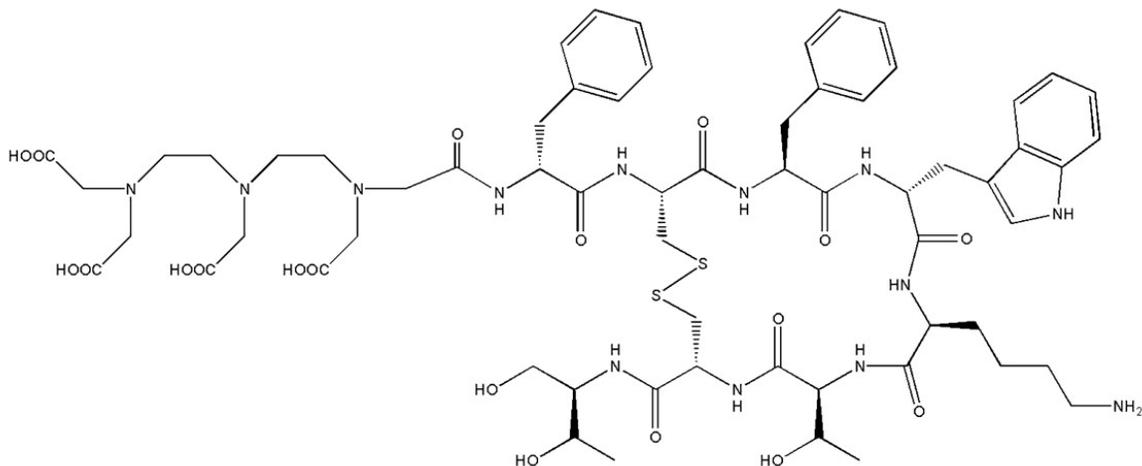


Fig. 8. Estructura química del análogo de somatostatina DTPA-octreotide, ejemplo de aplicación del concepto *pendant approach* para su marcación con radionucleidos metálicos.

El TRODAT-1 es un radiofármaco que ha sido ampliamente utilizado en la clínica (figura 9). Este es un ejemplo de la aplicación del método de *pendant approach* en la

marcación de una biomolécula no proteica, la cocaína, capaz de interactuar con receptores dopaminérgicos.

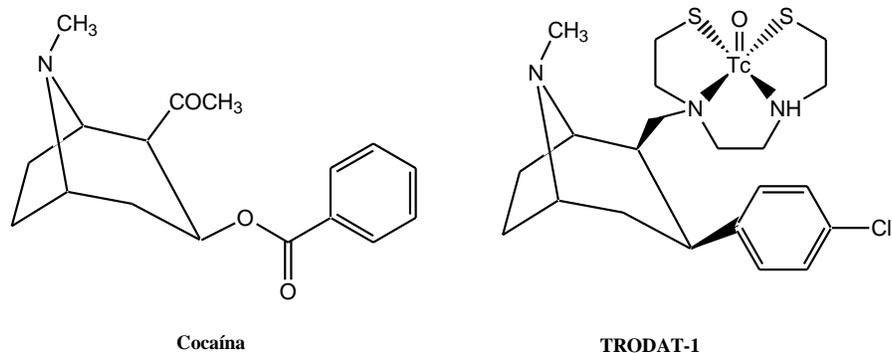


Fig. 9. Aplicación de la estrategia *pendant approach* al desarrollo de un radiofármaco a partir de la cocaína como biomolécula.

En el presente trabajo, se han seleccionado dos radiometales para el desarrollo de nuevos complejos con potencial aplicación en el diagnóstico de hipoxia tumoral. Ellos son el ^{99m}Tc , radionucleido de mayor aplicación en Medicina Nuclear mediante la modalidad SPECT, y ^{68}Ga , radionucleido emisor de positrones que cada vez gana mayor terreno en el campo de la Medicina Nuclear mediante PET. En ambos casos, se han diseñado ligandos adecuados para la marcación mediante *pendant approach*. Como se acaba de mencionar, el ^{99m}Tc es el radionucleido más utilizado en la preparación de radiofármacos de diagnóstico. Esto se debe a sus propiedades nucleares ideales para la obtención de imágenes: emisión γ pura con alto rendimiento de fotones, energía de 140 keV capaz de detectarse externamente mediante SPECT, y período de semidesintegración de 6 horas, compatible con el tiempo requerido para la preparación de los radiofármacos y el tiempo necesario para realizar el estudio de Medicina Nuclear. A las propiedades nucleares favorables se debe agregar la fácil disponibilidad a partir de generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

Desde el punto de vista químico, el tecnecio es un metal de la segunda serie de transición y puede presentar estados de oxidación entre -1 y +7. La forma química bajo la cual se obtiene el ^{99m}Tc a partir de su generador es el ion pertecneciato, $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$, donde el metal se encuentra con estado de oxidación VII (43). El primer paso para la formación de un complejo es la reducción del Tc(VII) que se realiza, en la

mayoría de los casos, con agentes reductores químicos, como el cloruro de estaño II y el borohidruro de sodio, entre otros (44-45). Las formas reducidas poseen orbitales *d* incompletos y forman fácilmente compuestos de coordinación con ligandos adecuados que posean átomos o grupos de átomos ricos en electrones capaces de formar el enlace covalente coordinado. El estado de oxidación final en el complejo depende de diversos factores, entre los que se destacan el pH, la temperatura, la naturaleza del agente reductor y el ligando, siendo este último uno de los factores de mayor influencia. Los ligandos, que actúan como bases de Lewis en la formación del complejo, se clasifican según los criterios de Pearson, de acuerdo a su *dureza*. Ligandos *duros* son aquellos que presentan grupos donores de electrones de pequeño tamaño, y en general, retienen carga negativa sobre ellos. Por el contrario, ligandos *blandos* presentan mayor tamaño y menor densidad electrónica. Los mismos criterios pueden aplicarse en la clasificación del metal, el que actúa como ácido de Lewis. Teniendo además en cuenta que un ácido *duro* de Pearson formará preferentemente complejos estables con bases también *duras*, podemos saber qué tipo de donores serán los preferidos por el tecnecio en sus distintos estados de oxidación (46). En estados de oxidación altos (V, IV) la alta carga del centro metálico lo convierte en ácido *duro*. La estabilidad se logra por coordinación con bases *duras*, como los grupos *oxo*, *nitruro* o *nitreno*. Estos grupos se unen directamente al átomo metálico formando un núcleo o *core* en el que quedan aún sitios de coordinación disponibles para unión a los ligandos. Estos *cores* son relativamente inertes, no siendo alterados, en general, ni por la formación del complejo, ni por eventuales reacciones de sustitución de ligandos (46).

Numerosos radiofármacos utilizados actualmente en Medicina Nuclear son complejos de $^{99m}\text{Tc(V)}$ -oxo, como el ^{99m}Tc -HMPAO, o el ^{99m}Tc -ECD, ambos radiofármacos utilizados para evaluación de perfusión cerebral (47). Sus estructuras se muestran en la figura 10. Cabe destacar que los sistemas de átomos donores utilizados en estos radiofármacos, en especial el N_2S_2 del ECD son muy importantes dentro de los oxo-complejos de $^{99m}\text{Tc(V)}$.

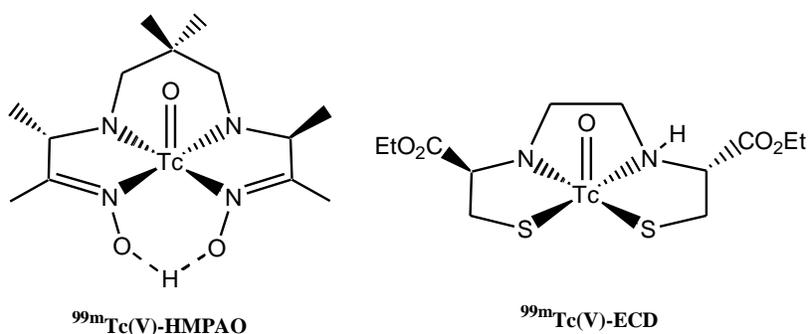


Fig. 10. Ejemplos de radiofármacos utilizados en clínica con una estructura $^{99m}\text{Tc(V)-oxo}$. Ambos permiten evaluar la perfusión cerebral.

Dentro de los complejos de Tc(V), otro core destacable es el Tc(V)-nitruro. Estos compuestos, inicialmente desarrollados por Baldas y colaboradores (48), se caracterizan por la presencia de un triple enlace terminal tecnecio- nitrógeno que deja cuatro posiciones de coordinación disponibles para la unión al ligando. Las mismas pueden ocuparse mediante dos ligandos bidentados iguales o diferentes, dando lugar a complejos simétricos o asimétricos, respectivamente. Los complejos simétricos completan la esfera de coordinación del core con dos moléculas de un ligando bidentado que sea donador π , generalmente ditiocarbamatos. Los nitrurocomplejos asimétricos, en cambio, requieren la combinación de dos ligandos: uno pseudotridentado de tipo aceptor π , generalmente heterodifosfinas de estructura PNP, con un coligando bidentado que sea donador π . Entre ellos, dos ejemplos que se han publicado son el $^{99m}\text{TcN-NOET}$ y el $^{99m}\text{TcN-DBODC}$, ambos diseñados para imágenes cardíacas (49) y sus estructuras se muestran en la figura 11.

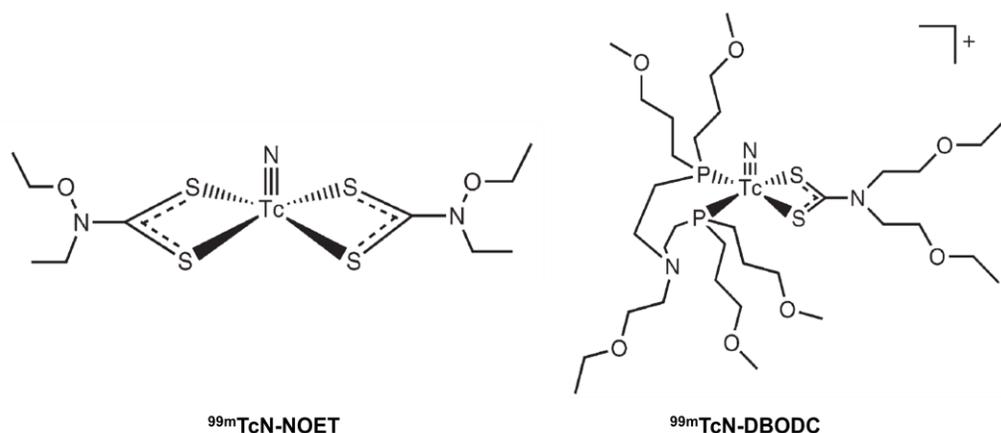


Fig. 11. Ejemplos de complejos con core Tc(V)-nitrido desarrollados para imágenes cardíacas. El $^{99m}\text{TcN-NOET}$ es un complejo simétrico y el $^{99m}\text{TcN-DBODC}$ es asimétrico.

Se han desarrollado también algunos nitrurocomplejos asimétricos de tipo “3+1” formados por la combinación de un ligando tridentado donador π conteniendo el set de átomos donores [S⁻, N, S⁻] y un ligando monodentado aceptor π de tipo PR₃ como se muestra en la figura 12 (50).

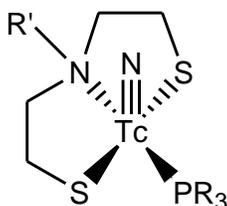


Fig. 12. Estructura general para complejos Tc(V)-nitruro “3+1”.

La ventaja principal de este tipo de nitrurocomplejos radica en la posibilidad de utilizar como coligandos monofosfinas disponibles comercialmente y de adecuada estabilidad, mientras que las heterodifosfinas de estructura PNP son muy inestables y de difícil síntesis.

Continuando con los complejos de Tc(V), otro core que ha sido utilizado es el Tc(V)-nitreno, en el que un grupo nitreno se une directamente al metal dejando 5 posiciones de coordinación libres. El HYNIC (hidracinonicotinamida) es una hidracina aromática que ha sido ampliamente utilizada como agente bifuncional para la formación de

complejos de tecnecio con proteínas o péptidos. La coordinación del metal se logra a través de la formación del core Tc(V)-nitreno, como se muestra en la figura 13.

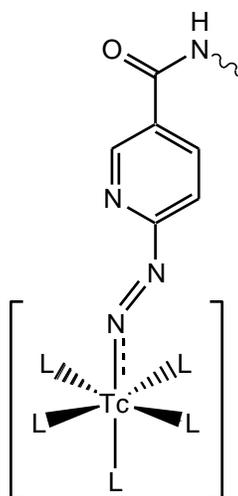


Fig. 13. Core Tc(V)-nitreno formado por HYNIC, utilizado como agente bifuncional.

En este core quedan cinco posiciones de coordinación disponibles que deben ser ocupadas por uno o más coligandos. Una diversidad de moléculas han sido usadas como coligando y los estudios coinciden en señalar que la naturaleza de las mismas tiene un efecto significativo en la estabilidad y biodistribución del compuesto marcado. Una de las más utilizadas es la tricina o *tris*-(hidroximetil)-metilglicina, que da lugar a la formación de un número variable de complejos isómeros en solución (51).

El core Tc(V)-*di-oxo* o $[\text{Tc}(\text{V})\text{O}_2]^+$ no ha sido hasta el momento utilizado ampliamente en la preparación de radiofármacos. Solamente el Tetrofosmin (Myoview®), radiofármaco utilizado en estudios de perfusión miocárdica, presenta este core coordinado con 2 moléculas del ligando 1,2-bis[di-(2-etoxietil)fosfino]etano. Sin embargo, recientemente se han desarrollado una serie de pépticos marcados haciendo uso de este core de Tc(V) que presentaron muy buenas propiedades biológicas (52-53). En el core *di-oxo*, la alta densidad de carga positiva del metal se neutraliza mediante la unión en posición *trans* de 2 grupos O^{2-} quedando 4 posiciones de coordinación disponibles en el plano ecuatorial del octaedro. Estas posiciones de

coordinación suelen llenarse con grupos donores duros, como por ejemplo los grupos amino.

El tecnecio en estado de oxidación III es un ácido blando y por tanto se une preferentemente a bases blandas que contienen grupos aceptores π , principalmente fosfinas o isonitrilos. No existen, por lo tanto, grupos oxo, nitruro o nitreno unidos al metal. Este estado de oxidación no es demasiado común en radiofármacos, aunque se observa en un radiofármaco de segunda generación, el Teboroxime (CardioTec®) y más recientemente, en los complejos de Tc(III) "4+1" desarrollados por Pietzsch et. al. (54) basados en el sistema donador NS_3/CN o NS_3/P , como se muestra en la figura 14.

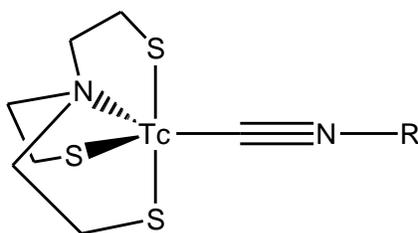


Fig. 14. Complejos Tc(III) "4+1" desarrollados por Pietzsch et. al.

Si bien la aplicación de este core al desarrollo de potenciales radiofármacos no se ha difundido ampliamente aún, el grupo de investigación que lo desarrolló lo ha utilizado para la marcación de diversos tipos de péptidos y de ácidos grasos, entre otros. (55,57).

El tecnecio en estado de oxidación +1 presenta una configuración d^6 , la que debe ser estabilizada por ligandos deficientes en electrones como fosfinas, difosfinas e isonitrilos, todos ellos dadores σ y aceptores π . La estructura más común en estas condiciones es el Tc^+ , que forma compuestos octaédricos por coordinación simultánea de seis de ligandos monodentados. Un ejemplo de aplicación clínica actual es el radiofármaco ^{99m}Tc -Sestambi (Cardiolite®), utilizado como trazador de perfusión miocárdica. Se trata de un complejo que contiene seis ligandos monodentados 2-metoxiisobutilisonitrilo (58) y se muestra en la figura 15.

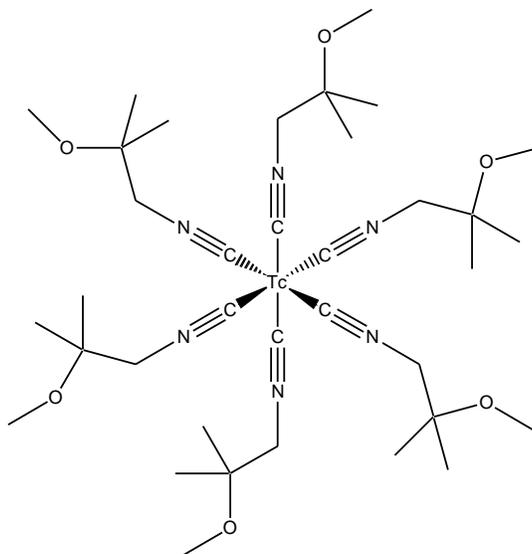


Fig. 15. Radiofármaco ^{99m}Tc -Sestamibi, ejemplo de aplicación del core Tc^+ .

Sin embargo, otro core que ha ganado cada vez más terreno en el campo de la radioquímica y radiofarmacia es el Tc(I) -*tricarbonílico* o $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Se trata de un core que contiene al metal bajo el estado de oxidación +1 coordinado y estabilizado por 3 moléculas de monóxido de carbono, también llamados ligandos carbonilo. En 1998, Alberto et. al. (59) han propuesto la formación a baja presión del acuocomplejo tricarbonílico de Tc(I) *fac* $[\text{fac}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (figura 16), el que puede ser utilizado como precursor para obtener una gran variedad de potenciales radiofármacos.

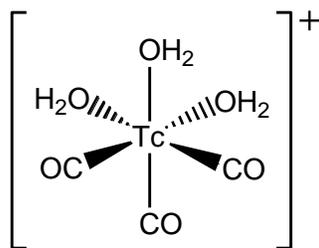


Fig. 16. Estructura del complejo precursor tricarbonílico.

Se trata de un complejo en el cual tres de las posiciones de coordinación son ocupadas por los grupos carbonilo fuertemente unidos al metal. El enlace de coordinación entre el metal y los grupos carbonilo es muy estable debido a que estos

ligandos son dadores σ y aceptores π . El intenso campo de los ligandos resultante, conjuntamente con la configuración electrónica d^6 del metal, provoca una significativa estabilización del estado de oxidación +1 y evitan que éste pueda sufrir nuevas reacciones de óxido-reducción. El resto de las posiciones de coordinación disponibles están ocupadas por tres moléculas de agua débilmente unidas. Éstas pueden ser reemplazadas por ligandos que posean una combinación de átomos donores con alta afinidad por el metal.

Existe una amplia gama de posibles grupos donores para completar la esfera de coordinación de este core, desde grupos duros e hidrofílicos basados en ácidos carboxílicos y aminas alifáticas, hasta otros blandos y lipofílicos, preferentemente aminas aromáticas. También los grupos tiol, tioéter o fosfina se coordinan adecuadamente con el precursor tricarbónílico. Los ligandos conteniendo este tipo de grupos no solamente son simples de sintetizar sino que también aparecen en muchas moléculas biológicamente activas, en particular en el aminoácido histidina presente en muchas proteínas y péptidos. La figura 17 muestra ligandos tridentados adecuados para la sustitución de las 3 moléculas de agua del complejo precursor (60).

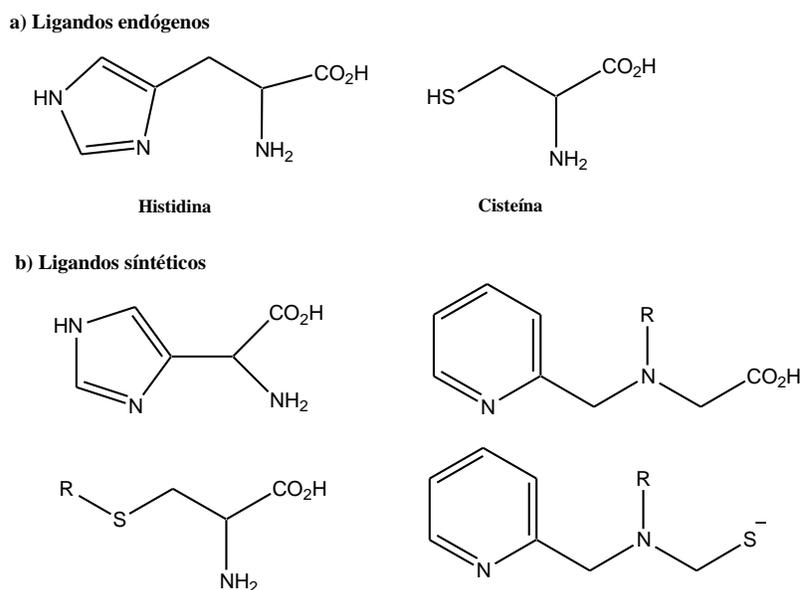


Fig. 17. Ejemplos de ligandos tridentados adecuados para la formación de complejos de Tc(I)-tricarbónílicos, (R= fragmento variable).

También se han descrito en varios trabajos ligandos bidentados para la formación de este tipo de complejos. Un ejemplo de ello lo constituyen los derivados de glucosa desarrollados por Ferreira et. al. (61) que se muestran en la figura 18. Se trata de complejos tricarbónicos de tecnecio y renio con ligandos bidentados que contienen una unidad de glucosa y un agente bifuncional, 3-hidroxi-4-piridinona. Estudios espectroscópicos demostraron la presencia de una molécula de agua en los complejos finales.

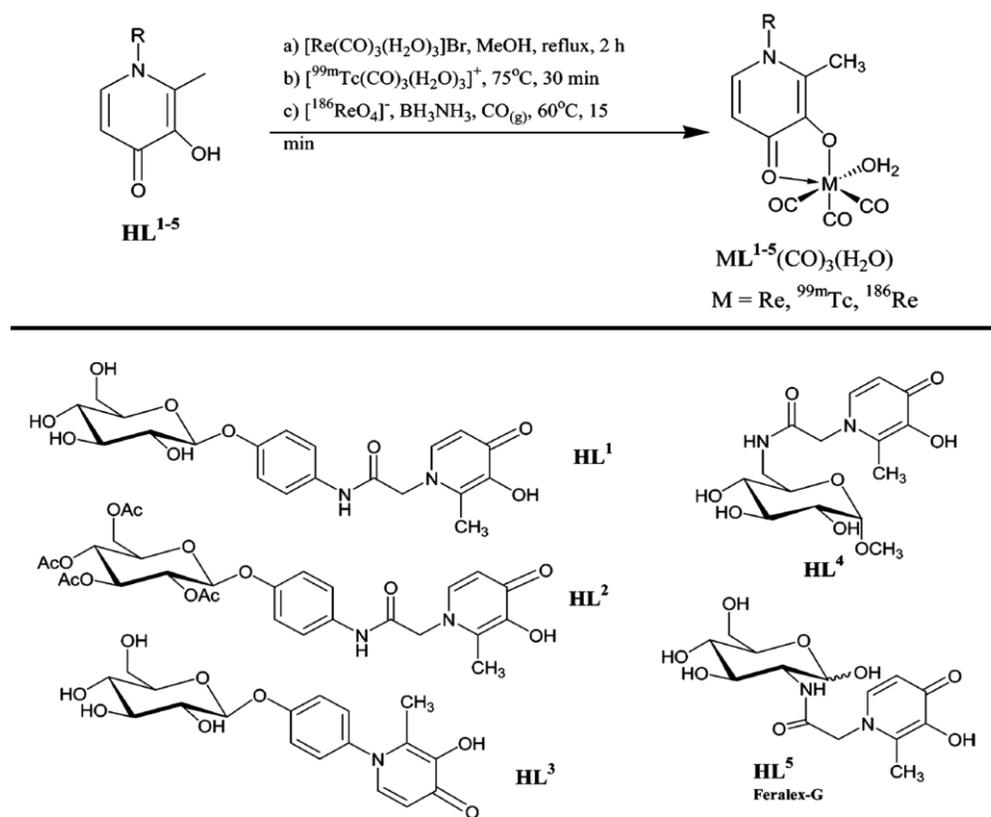


Fig. 18. Complejos tricarbónicos de tecnecio y renio desarrollados a partir de ligandos bidentados derivados de glucosa. Imagen extraída de la referencia (61).

Estos complejos han sido obtenidos con altos rendimientos y han resultado ser estables por al menos 24 horas frente a un exceso de cisteína e histidina, ligandos tridentados adecuados para la coordinación del metal bajo este tipo de core, tal cual fue mencionado previamente (61).

Otro ejemplo de la literatura acerca del uso de ligandos bidentados lo constituye el trabajo publicado por Kniess T. et. al. (62), quienes han desarrollado nuevos agentes bifuncionales bidentados para este tipo de complejos. La figura 19 muestra dos ejemplos de complejos de Re(I)-tricarbonílicos en los cuales los ligandos actúan como bidentados, quedando un átomo de bromo en la esfera de coordinación. Cabe destacar que el renio es capaz de formar estos mismos complejos debido a la similitud en sus propiedades químicas con el tecnecio, y el bromo, en este caso, reemplaza al agua ya que el complejo precursor de Re(I)-tricarbonílico es $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3][\text{NEt}_4]_2$.

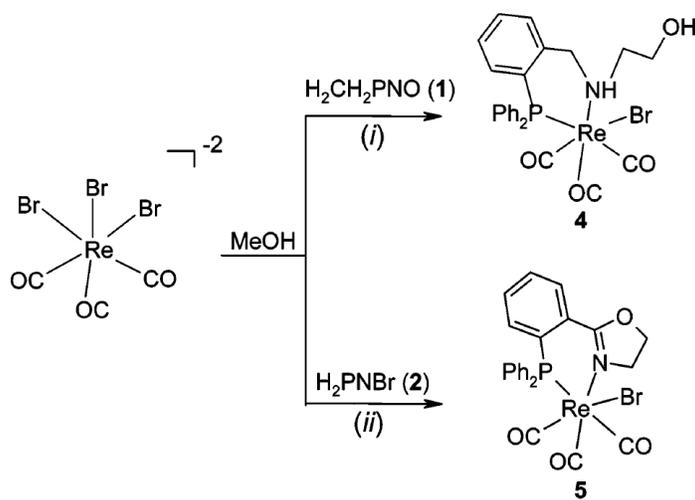


Fig. 19. Complejos tricarbonílicos de renio desarrollados a partir de nuevos agentes bifuncionales bidentados, $\text{H}_2\text{CH}_2\text{PNO}$ y H_2PNBr . (Imagen extraída de Kniess T. et. al. *Inorg Chem*, 42, 6130-6135, 2003).

A su vez, Bourkoula A. et. al. (63) han desarrollado complejos tricarbonílicos de tecnecio y renio a partir de un ligando bidentado reconocido por el receptor EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), vinculado a algunos tipos de tumores. El autor ha demostrado mediante técnicas espectroscópicas las estructuras de ambos complejos y su estabilidad tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. La figura 20 presenta las estructuras de dichos complejos.

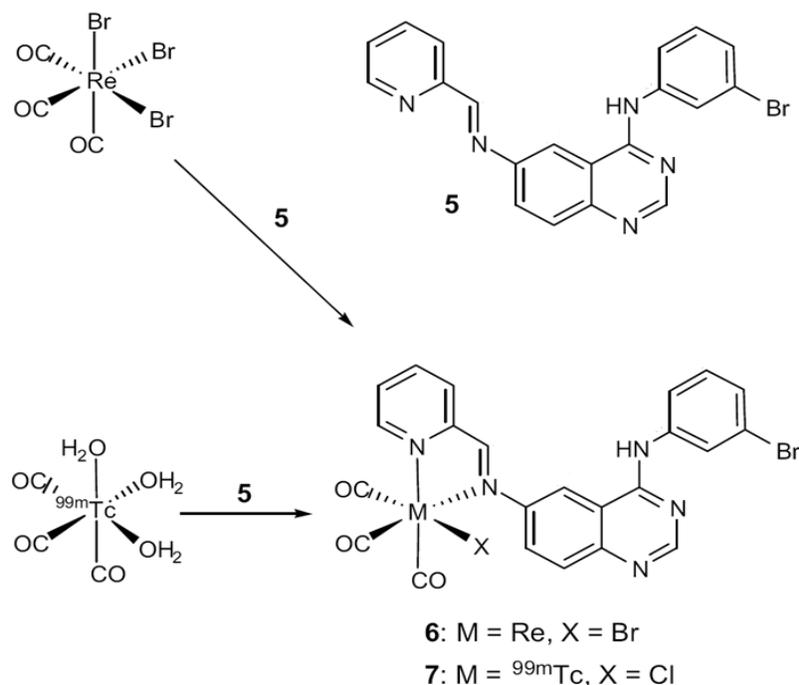


Fig. 20. Complejos tricarbónicos de tecnecio y renio desarrollados para un ligando bidentado con afinidad por el receptor EGFR. (Imagen extraída de Bourkoula A. et al., Eur J Med Chem, 44, 4021-4027, 2009).

Otra posibilidad más reciente ha sido la introducción de ciclopentadienilos derivatizados como potenciales ligandos para la preparación de complejos de ^{99m}Tc conteniendo el core $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. La unidad ciclopentadienilo ofrece varias ventajas que lo hacen potencialmente aplicable a la preparación de radiofármacos: es pequeño, tiene bajo peso molecular y permite formar complejos estables y robustos con Tc(I) partir del precursor $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. En la figura 21 se muestra la estructura de estos complejos. Debe notarse que en este caso, el índice de coordinación pasa a ser 4, y no 6 como en los complejos tricarbónicos previamente ejemplificados.

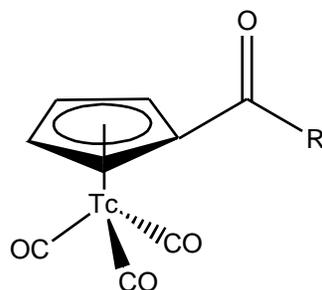


Fig. 21. Complejos de Tc(I)-tricarbónicos con ciclopentadienilos. El grupo R representa a la unidad farmacofórica.

Esta estrategia ha sido aprovechada para la formación de complejos de ^{99m}Tc con moléculas de pequeño tamaño (64-66) así como también estructuras de mayor tamaño, como péptidos (67).

Al día de hoy, grandes esfuerzos se dedican para el desarrollo de nuevos cores de tecnecio que permitan nuevas posibilidades en el campo de la radioquímica y radiofarmacia con este metal. Sin embargo, la aplicación de los nuevos cores en el desarrollo de radiofármacos no ha representado gran impacto hasta el momento. Aún así, vale la pena destacar el core carbonilo-nitrosilo (figura 22) que se forma por sustitución de un ligando CO por un ligando NO en el core tricarbónico. El grupo NO es isoelectrónico con el CO y se coordina linealmente provocando un efecto aceptor de electrones más alto. La carga positiva adicional hace que el core sea más duro, presentado preferencia por otro tipo de grupos donores de electrones ampliando, por tanto, las posibilidades en cuanto a ligandos (68,69).

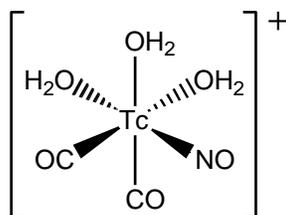


Fig. 22. Complejo precursor Tc(I)-carbonilo-nitrosilo.

Todos estos conceptos mencionados han sido empleados también en la preparación de potenciales radiofármacos de ^{99m}Tc para el diagnóstico de hipoxia tumoral. La mayoría de ellos utilizan la función biorreducible nitroimidazol como farmacóforo.

Linder et. al. (70) presentaron el primer complejo de ^{99m}Tc con selectividad hacia tejido hipóxico BMS181321 que se muestra en la figura 23. En este caso, el farmacóforo empleado es un 2-nitroimidazol al cual se le conjugó la unidad quelante del tipo N_4 para la formación de un complejo de $\text{Tc(V)}\text{-oxo}$. Se trata de un compuesto neutro y altamente lipofílico que presenta algunas desventajas, tales como inestabilidad química, lenta depuración sanguínea, elevada captación hepática e intensa eliminación gastrointestinal, por lo cual resulta inadecuado para la obtención de imágenes abdominales (71).

Unos años después, Melo et. al. (72) desarrollan un nuevo complejo, BRU59-21, cuya estructura también se muestra en la figura 23. En este caso, el farmacóforo sigue siendo el 2-nitroimidazol y las pequeñas modificaciones que se le realizan a la unidad quelante disminuyen su lipofilidad y mejoran significativamente la estabilidad química del complejo. Sin embargo, la captación en tejido hipóxico no mejora y se evidencia un extenso metabolismo hacia pertechnetato.

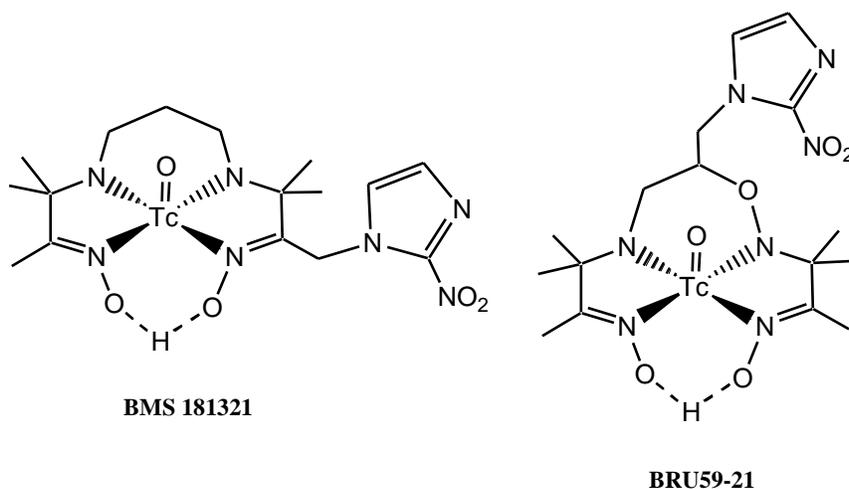


Fig. 23. Primeros complejos de ^{99m}Tc desarrollados con selectividad hacia tejido hipóxico.

A partir de estos complejos, fueron introducidas diversas modificaciones y nuevas estructuras han sido propuestas (73). Uno de ellos es el que se muestra en la figura 24 y se trata de un complejo de $\text{Tc(V)}\text{-dioxo}$ cargado positivamente (74). El ligando

consiste en una unidad quelante *cyclam* conjugada a cuatro unidades de AK2123, un nitro-triazol utilizado como radiosensibilizador. Estudios *in vivo* mostraron una intensa eliminación renal y elevada relación tumor/músculo (8.5 a 5 h post-inyección en ratas portadoras de tumores mamarios). Sin embargo, la captación tumoral resultó ser baja debido a la escasa penetración a través de las membranas plasmáticas, imposibilitando su empleo en imágenes (73).

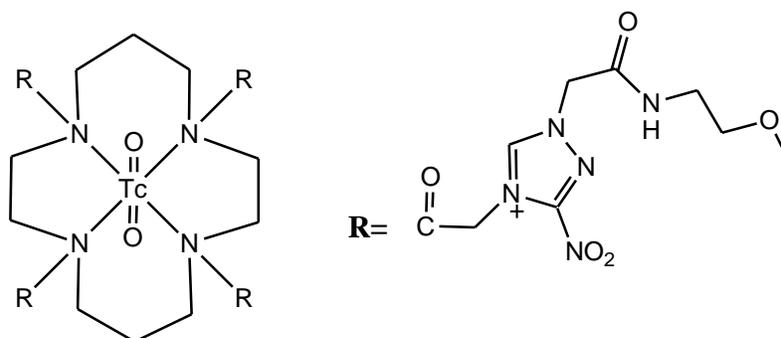


Fig. 24. Complejo ^{99m}Tc -cyclam-AK2123, con selectividad hacia tumores hipóxicos.

Existen varios ejemplos de complejos utilizando cores de tecnecio más recientes. Tal es el caso del complejo de $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitrido con el ligando NIET desarrollado por Chu T. et. al. (75), en el que el ligando contiene un grupo 4-nitroimidazol como farmacóforo y un grupo ditiocarbamato, ideal para la coordinación del metal bajo este tipo de core. Su estructura se muestra en la figura 25. El complejo formado es simétrico y su comportamiento biológico ha mostrado similares propiedades al complejo BMS181321.

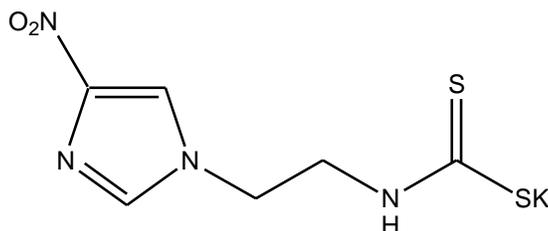


Fig. 25. Ligando NIET: [2-(4-nitro-1*H*-imidazol-il)etil ditiocarbamato de potasio] diseñado para la formación de un complejo de $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitrido simétrico.

Existen pocos ejemplos de aplicación del core de Tc(I)-tricarbonílico en el desarrollo de compuestos para detección de hipoxia. Uno de ellos es el complejo sintetizado por Giglio J. et. al. (76) que se muestra en la figura 26. El ligando diseñado contiene un sustituyente nitrobencilo como unidad farmacofórica (componente biorreducible) conjugado al sustituyente piridinmetilaminoacétilo que actúa como unidad quelante. Si bien ha demostrado poseer una rápida depuración sanguínea e intensa excreción renal y hepatobiliar, se trata de un compuesto que presenta baja captación tumoral, probablemente debido a su baja lipofilicidad.

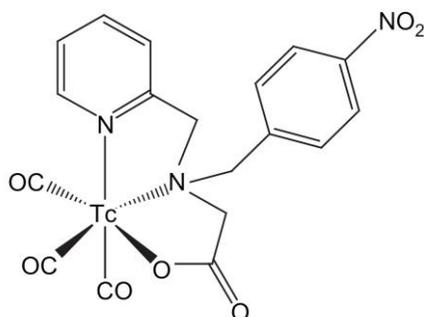


Fig. 26. Ejemplo de complejo de Tc(I)-tricarbonílico en el desarrollo de potenciales radiofármacos para diagnóstico de tejido hipóxico.

También se encuentran ejemplos de ligandos con funciones nitroimidazólicas derivatizados para la formación de complejos tricarbonílicos. Entre ellos, se destaca un 5-nitroimidazol propuesto por Mallia M.B. et. al. (77) y los ligandos desarrollados en el marco de la tesis doctoral de Giglio J. (78). En los tres casos se trata de ligandos tridentados y sus estructuras se muestran en la figura 27.

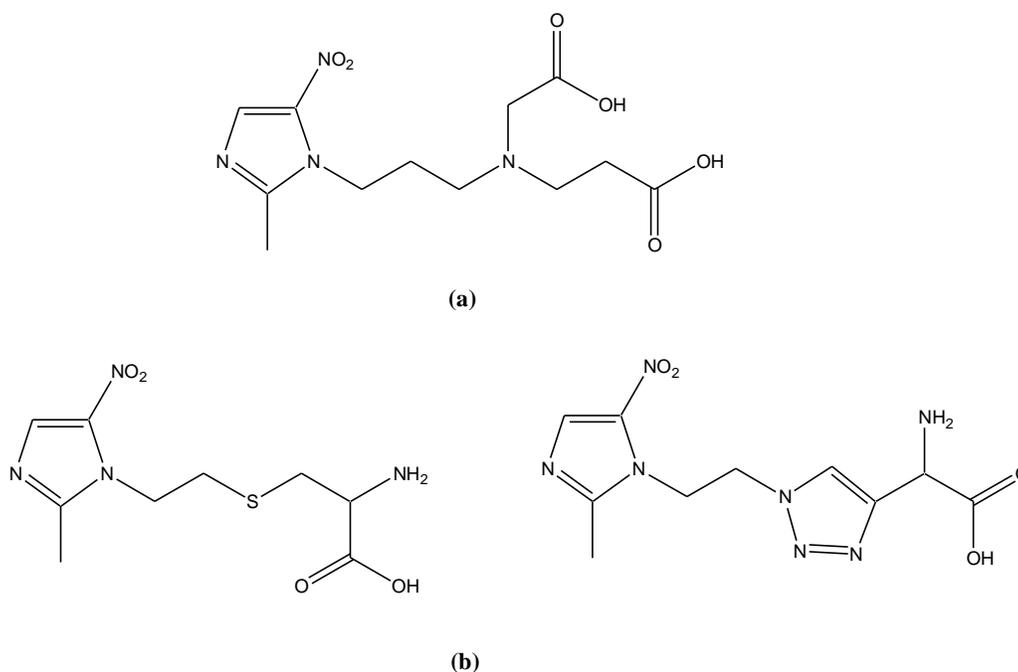


Fig. 27. Ligandos que han sido desarrollados para su marcación mediante la formación de complejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbónicos. **(a)** Ligando desarrollado por Mallia M.B. et. al. **(b)** Ligandos desarrollados por Giglio J., en el marco de su tesis doctoral (78).

Hasta el momento, se han descrito los principales aspectos de la química de coordinación del ^{99m}Tc y sus aplicaciones en Medicina Nuclear, destacando ejemplos relevantes de complejos con potencial aplicación en el diagnóstico de tumores hipóxicos.

El segundo radiometal seleccionado para el desarrollo de esta tesis es, como ya fue mencionado, el ^{68}Ga . Se trata de uno de los emisores de positrones metálicos más prometedores en Medicina Nuclear ya que puede ser producido mediante un sistema de generador, el cual consiste en una matriz orgánica o inorgánica que inmoviliza al radionucleido padre, ^{68}Ge . Se han investigado diversos agentes para imagen basados en este metal para estudios pulmonares, de perfusión cerebral y miocárdica, estudios renales, hepatobiliares, imágenes tumorales, cerebrales y óseas.

El galio natural está presente bajo la forma de dos isótopos: ^{69}Ga (60% de abundancia natural) y ^{71}Ga (40% de abundancia natural). Del total de sus radioisótopos, sólo tres son relevantes en Medicina Nuclear y pueden ser producidos para la preparación de radiofármacos: ^{66}Ga , ^{67}Ga y ^{68}Ga . Tanto el ^{66}Ga como el ^{68}Ga son emisores de

positrones, con un período de semidesintegración de 9,5 horas y 68 minutos respectivamente. Sin embargo, el ^{66}Ga es producido mediante ciclotrón a través de la reacción nuclear $^{66}\text{Zn}(p,n)^{66}\text{Ga}$, y el ^{68}Ga , como ya se mencionó, es producido por medio de un generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, lo que resulta en una mayor disponibilidad y, por lo tanto, mayor comodidad para su uso en Medicina Nuclear. El ^{67}Ga es un emisor gamma de período de semidesintegración de 78 horas, por lo que sus usos se limitan a tecnología SPECT. Su producción se realiza por medio de ciclotrón a través de la reacción $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$ (79).

La química del galio más relevante en radiofarmacia ocurre en el estado de oxidación +3, ya que es el más estable en solución acuosa.

En solución acuosa, el Ga(III) libre hidratado sólo es estable bajo condiciones ácidas (pH menor a 3). Cuando el pH aumenta, se produce la formación del trihidróxido de galio por hidrólisis. A concentraciones por encima de la nanomolar, este compuesto comienza a precipitar en ausencia de agente estabilizantes (entre pH=3 y 7). A pH más elevado, el sólido se re-disuelve como ion $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$. La figura 28 muestra los equilibrios que se dan en solución acuosa entre las diferentes especies de galio formadas.

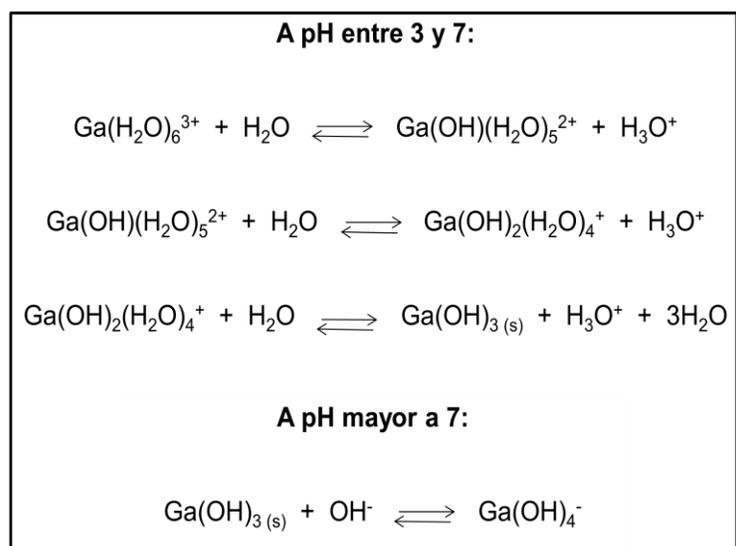


Fig. 28. Equilibrios generados en solución acuosa para el galio.

A pH fisiológico (pH=7.4), el reparto entre la fracción soluble e insoluble es de 49:1, por lo que se puede obtener una concentración máxima del anión de $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$ sin

superar la solubilidad del hidróxido de galio. Esto permite entonces que, tanto el $^{67}\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ como el $^{68}\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ existan en solución a pH fisiológico sin que precipite el hidróxido de galio (asumiendo que el galio no co-precipita con otros metales traza presentes en solución).

Como el resto de los elementos del grupo XIII (B, Al, In), el galio se clasifica como ácido duro de Lewis, uniéndose fuertemente a bases de Lewis no polarizables y altamente iónicas. Por ello, su química de coordinación está dominada por átomos donores como O, N y S. Además, es importante mencionar que esta química de coordinación es muy similar a la del Fe(III) debido a sus similitudes en carga, radio iónico, número de coordinación 6 y configuración electrónica. Por esta razón, será imprescindible que el complejo final de galio no presente intercambio del metal con proteínas plasmáticas de gran afinidad por el hierro, tales como la transferrina. Como ejemplo, las constantes de unión del metal a la transferrina para el galio son: $k_1=20,3$ y $k_2=19,3$ (80). Para el hierro, son levemente mayores: $k_1=22,8$ y $k_2=21,5$. A pesar de que muchos ligandos forman complejos con el galio que no son termodinámicamente estables frente al intercambio con transferrina, algunos aún así son útiles desde el punto de vista de la radiofarmacia, ya sea porque su intercambio con la transferrina es cinéticamente lento o porque pueden ser utilizados para marcar componentes sanguíneos en ambientes libres de transferrina.

Para el diseño de agentes bifuncionales para el galio, es importante tener en cuenta que éste se puede coordinar mediante ligandos polidentados, tanto cíclicos como de cadena abierta (81). La mayoría de los ligandos diseñados para el Ga(III) son hexadentados, aunque se han descrito muchos otros que son estables *in vivo* y que poseen números de coordinación 4 y 5. Estos ligandos tetra y pentadentados, sin embargo, son menos frecuentes que los primeros.

EDTA, DTPA, DFO y HBED (figura 29) son agentes bifuncionales que se han empleado para marcar macromoléculas con ^{111}In , $^{67/68}\text{Ga}$, ^{90}Y , para imágenes y terapia de tumores (figura 29) (82-85). Sin embargo, la mayoría de estos complejos mostraron baja estabilidad *in vivo* e *in vitro*, lo cual ha sido relacionado con la tendencia de dichos complejos aniónicos a la disociación *in vivo*. Como consecuencia

de esto, el radiometal pasa a unirse a la transferrina (y otras proteínas séricas) o se aloja en órganos radiosensibles.

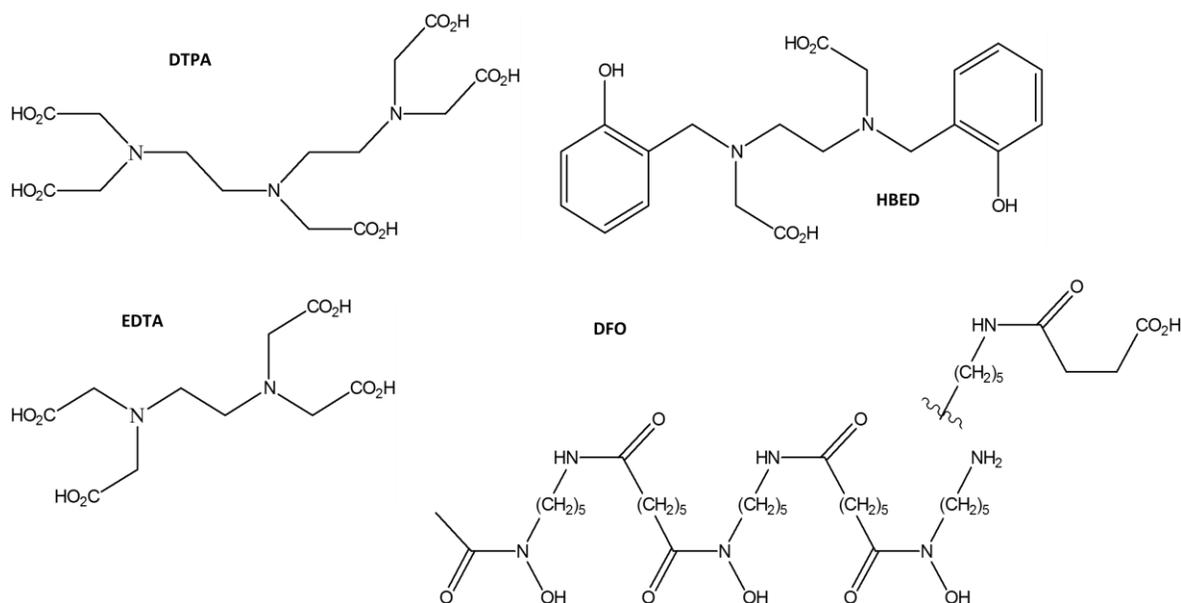


Fig. 29. Algunos agentes bifuncionales para Galio, de cadena abierta.

A su vez, *Sun et. al.* (86) midieron la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de una serie de quelantes para el Ga(III) e In(III) consistentes en ligandos mercapto-amino de diferentes denticidades, destacándose algunos de ellos por su buena estabilidad.

Los quelantes macrocíclicos, en particular los ligandos triaza, muestran una elevada selectividad (conformacional y de tamaño) hacia los iones metálicos. La estabilidad termodinámica de estos ligandos se debe a que el pequeño catión se sitúa o aloja adecuadamente en la cavidad cíclica, quedando éste aislado de las especies competitivas como la transferrina plasmática. Esto se comprueba al observar las constantes de disociación típicas de los complejos macrocíclicos con el Ga(III), que presentan valores 10^5 - 10^7 veces mayores que aquellos de cadena abierta. Algunos ejemplos se muestran en la figura 30.

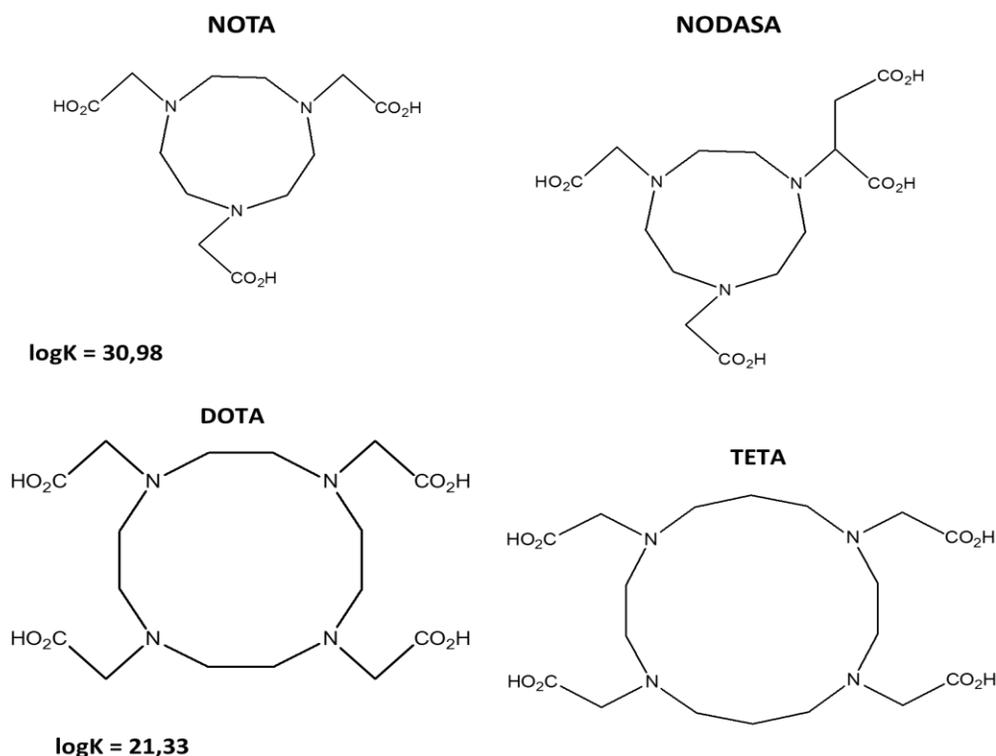


Fig. 30. Agentes bifuncionales macrocíclicos para Galio.

Los complejos que estos ligandos forman con el metal son menos sensibles a la disociación comparado con los complejos con agentes de cadena abierta. Por ejemplo, el Ga-NOTA sufre disociación a un pH muy bajo (pH no fisiológico).

Un ejemplo de ligando tetraaza lo constituye el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). La estabilidad termodinámica del complejo Ga-DOTA es menor que la del complejo Ga-NOTA debido a las mayores dimensiones de su cavidad. Esto se concluye a partir de las constantes de disociación de ambos complejos: $\log K (\text{Ga-DOTA}) = 21,33$, $\log K (\text{Ga-NOTA}) = 30,98$. Sin embargo, a pesar de su estabilidad más baja, el Ga-DOTA es un complejo lo suficientemente estable para ser utilizado en la clínica. En cuanto a la estructura, la cristalografía de rayos X del complejo Ga-NOTA revela una geometría octaédrica, estando definida la cavidad por un plano facial triaza y otro plano facial opuesto formado por los tres átomos de oxígeno de los grupos carboxilatos (figura 31).

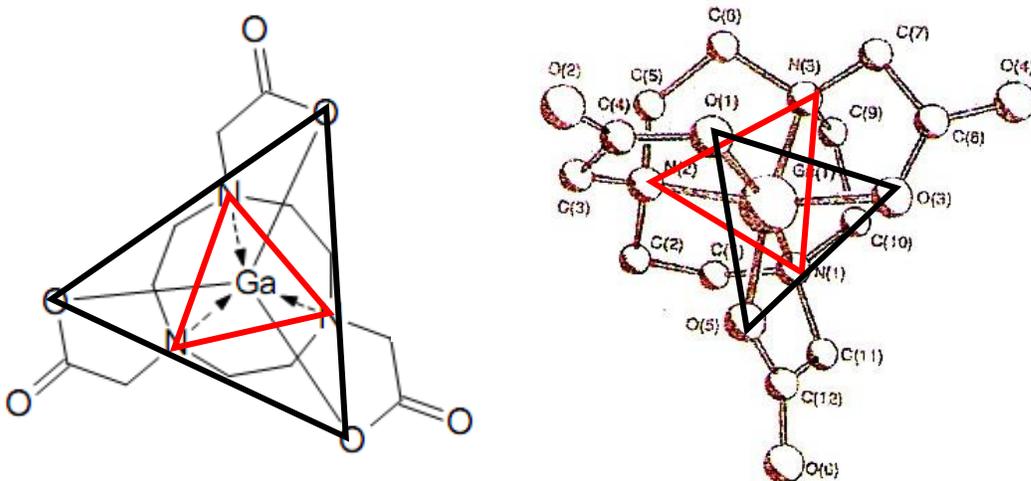


Fig. 31. Complejo Ga-NOTA. Geometría octaédrica.

Como ya se mencionó, el NOTA tiene una cavidad de menor tamaño que la del DOTA, lo que resulta para éste último en una estabilidad menor para el complejo con galio. Para el complejo Ga(III)-DOTA-D-Phe-NH₂, el DOTA adopta una geometría *cis*-pseudo-octaédrica en la que el plano ecuatorial está formado por dos átomos de nitrógeno del ciclo (transanulares) y dos oxígenos de los grupos carboxilatos correspondientes. Las dos posiciones axiales están ocupadas por los otros dos nitrógenos restantes del anillo (figura 32) (81).

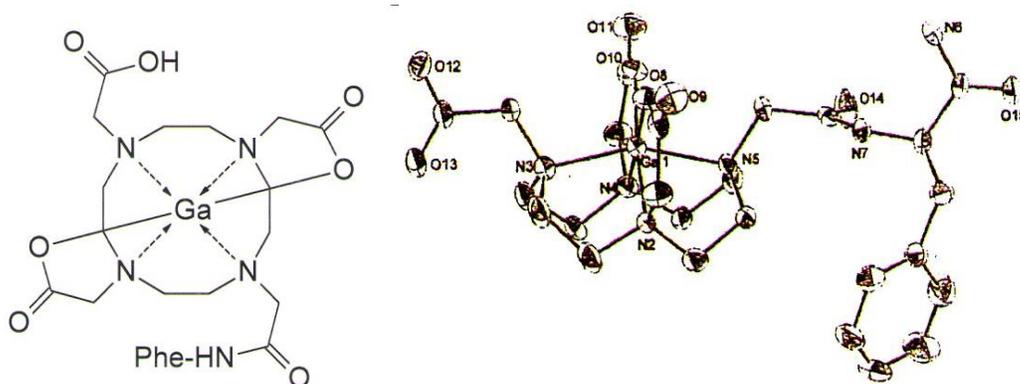


Fig. 32. Complejo Ga-DOTA. Geometría *cis*-pseudo-octaédrica.

Potenciales radiofármacos para diversas aplicaciones se encuentran en investigación y otras en fase clínica con este radionucleido.

Radiofármacos de ^{68}Ga basados en octreotide se han desarrollado obteniéndose muy buenos resultados. Uno de los primeros en surgir fue el ^{68}Ga -DFO-octreotide, que mostró tener una alta captación tumoral y en corteza cerebral de ratas, aunque los estudios clínicos en humanos fueron poco prometedores por la baja depuración sanguínea y la elevada unión a proteínas plasmáticas (87,88). Sin embargo, se han desarrollado también otros compuestos, como ser ^{68}Ga -DOTATOC (^{68}Ga -DOTA-Tyr³-octreotide), ^{68}Ga -DOTATATE (^{68}Ga -DOTA-Tyr³-Thr³-octreotide), ^{68}Ga -DOTANOC (^{68}Ga -DOTA-Nal³-octreotide) y ^{68}Ga -DOTA-lanreotide. Con pequeñas variantes entre ellos, en su mayoría mostraron buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* (89). La figura 33 muestra a modo de ejemplo, la estructura del ligando DOTATOC.

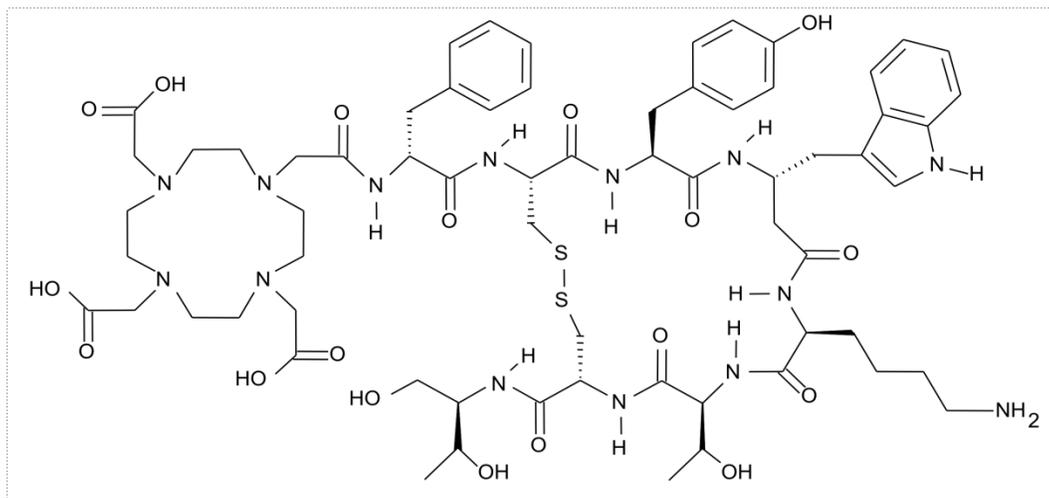


Fig. 33. Estructura del ligando DOTATOC.

También se han diseñado radiofármacos basados en DOTA conjugado a péptidos derivados de la hormona alfa-MSH, con afinidad por receptores MC1-R, sobreexpresados en melanoma (90). Éstos mostraron una alta captación tumoral y baja retención renal.

Este agente bifuncional también se ha a derivados de la bombesina, con una elevada tasa de internalización en líneas celulares con receptores de bombesina AR4-2J (90). Los resultados mostraron una alta captación tumoral así como también en órganos que poseen este tipo de receptores (intestino, páncreas).

I. Velykian en 2005 (91) realizó la marcación con ^{68}Ga de otro derivado de DOTA: ^{68}Ga -DOTA-hEGF, para visualizar la expresión tumoral del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta misma autora también ha realizado marcaciones de oligonucleótidos para detectar mutaciones en tumores, logrando que las propiedades de hibridación de estos compuestos se mantengan inalteradas.

De estos radiofármacos, al día de hoy existen cinco péptidos que se encuentran en etapa de investigación: DOTATOC, DOTANOC, DOTA-lanreotide, DOTA-bombesina y DOTA-gastrina (89).

Existen pocas aplicaciones de galio al desarrollo de compuestos para diagnóstico de hipoxia tumoral. Una de ellas ha sido propuesta por Mukai T. et. al. (92), quienes han sintetizado un derivado de DOTA que contiene dos unidades 5-nitroimidazolil como farmacóforo y lo ha marcado con ^{67}Ga . La estructura se muestra en la figura 34.

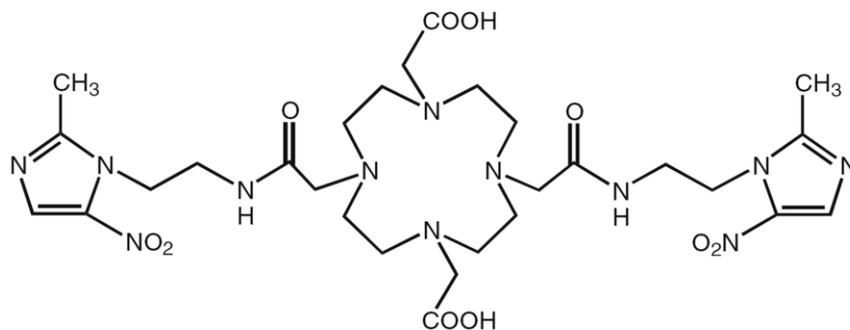


Fig. 34. Compuesto desarrollado por Mukai T. et. al.

Los resultados para este complejo muestran una elevada captación tumoral, así como una rápida depuración sanguínea e intensa eliminación renal.

Como se desprende de lo expuesto anteriormente, al día de hoy existen varios trabajos científicos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ relativos a hipoxia. Sin embargo, aún no se cuenta con un compuesto adecuado para detección de zonas hipóxicas en tumores. Por otro lado, las publicaciones con ^{68}Ga vinculadas al tema son escasas. Es por ello que resulta fundamental continuar avanzando en el desarrollo de nuevas estructuras.

El objetivo de este posgrado involucra el diseño, síntesis y evaluación de compuestos de coordinación de tecnecio y galio conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico. Para ello, se plantea

avanzar en las diferentes etapas que constituyen un diseño racional, como se describe más adelante.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivos generales

El objetivo general de este posgrado es el diseño, síntesis y evaluación de compuestos de coordinación de tecnecio y galio conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico.

Para ello, se plantea abordar cada una de las etapas básicas del desarrollo de un nuevo radiofármaco, desde el diseño y la preparación de los ligandos con la función nitroimidazólica, hasta la evaluación biológica de los complejos finales, pasando por las etapas intermedias de preparación de los complejos, caracterización estructural y evaluación fisicoquímica.

De esta manera, el trabajo propone una profundización en aspectos de química orgánica, química de coordinación del tecnecio y galio y modelos fisicoquímicos y biológicos de caracterización de potenciales radiofármacos.

3.2 – Objetivos específicos

1. *Diseño y síntesis de ligandos nitroimidazólicos conteniendo grupos quelantes adecuados para la preparación de complejos de ^{99m}Tc .*

Para esta etapa de síntesis orgánica, se propone trabajar sobre el fármaco Metronidazol[®], un 5-nitroimidazol comercialmente disponible como agente antiparasitario. El objetivo consiste en diseñar y optimizar diferentes rutas sintéticas que permitan incorporar sobre esta molécula grupos quelantes adecuados para la formación posterior de complejos tricarbonílicos con el metal.

2. *Diseño y síntesis de ligandos nitroimidazólicos conteniendo grupos quelantes adecuados para la preparación de complejos de ^{68}Ga .*

Así como en la etapa anterior, también en ésta se partirá del Metronidazol[®] y se diseñarán rutas de síntesis que permitan incorporar grupos adecuados para el

acoplamiento de la función nitroimidazólica al agente bifuncional DOTA para su posterior marcación con ^{68}Ga .

3. Preparación de complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

La marcación de los ligandos correspondientes con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ implicará la utilización de una de las estrategias más recientes en Radiofarmacia: la formación de complejos Tc(I)-tricarbonílicos. Las marcaciones de este tipo implican la sustitución del precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ con los ligandos nitroimidazólicos conteniendo grupos donores adecuados.

4. Preparación de complejos de ^{68}Ga .

La marcación de los ligandos correspondientes con ^{68}Ga implicará la formación de un complejo Ga(III)-DOTA utilizando las técnicas de marcación descritas en Radiofarmacia.

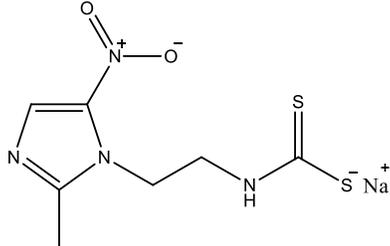
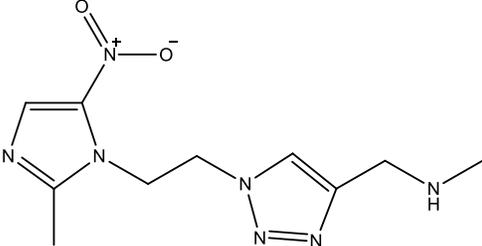
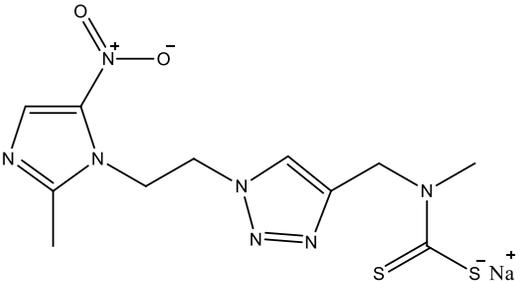
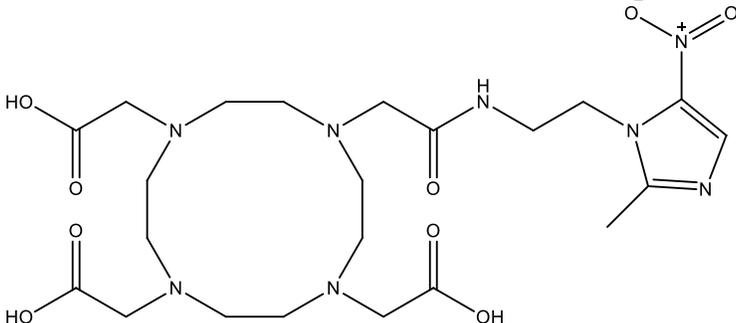
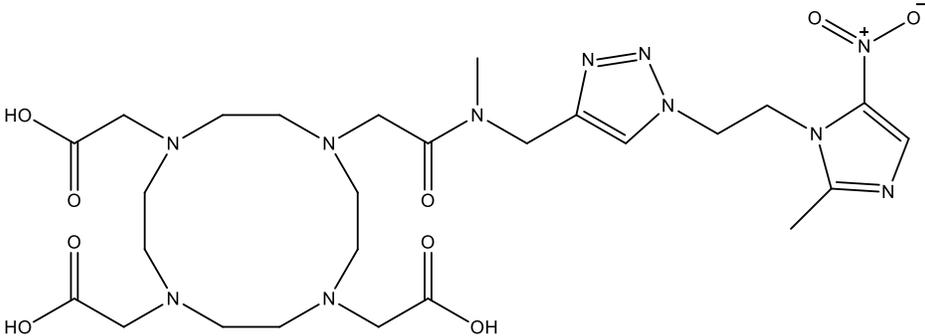
5. Caracterización fisicoquímica de los complejos.

En esta etapa se propone determinar el comportamiento fisicoquímico de los complejos previamente sintetizados, estableciendo para cada uno de ellos su lipofilicidad, estabilidad en el medio de reacción, en plasma y unión a proteínas plasmáticas.

6. Caracterización biológica de los complejos.

Implica la evaluación de los complejos desde el punto de vista de su comportamiento biológico en modelos animales portadores de tumores sólidos hipóxicos. Se dará especial atención no sólo al nivel de captación tumoral, sino también a su comportamiento farmacocinético, vías de eliminación y órganos de acumulación.

En la tabla de la página siguiente se muestran los ligandos propuestos para su marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{68}Ga . Las rutas sintéticas se recogen en la parte experimental.

Ligandos para complejos de ^{99m}Tc	
Estructura	Código
	L1
	L2
	L3
Ligandos para complejos de ⁶⁸Ga	
Estructura	Código
	L4
	L5

4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Materiales

Todos los disolventes utilizados durante la síntesis de los ligandos fueron destilados previamente y, en el caso que correspondiente, secados. Se utilizaron reactivos comerciales de Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, entre otros. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando sílica-gel o alúmina, con indicador UV en placas de poliéster. El revelado de dichas cromatografías se realizó mediante exposición a luz ultravioleta a 254 nm, exposición a vapores de yodo o asperjado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico:anisaldehído (95:1:4) (v/v/v). Para las cromatografías en columna se utilizó sílica-gel (Merck, 60-230 mesh) o alúmina neutra (Merck, 70-230 mesh). Los espectros de resonancia magnética nuclear, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, se realizaron en un equipo Bruker DRX-400 (400 MHz), utilizando los disolventes deuterados que se indican en cada caso y empleando tetrametilsilano como referencia interna.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de fusión Electrothermal 9100.

Los espectros infrarrojos se registran en un espectrofotómetro Bomem MB-102 FT-IR en el rango $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ en pastillas de KBr al 1%.

Los espectros de masas fueron registrados por Impacto Electrónico (EI) en un MSD Hewlett Packard 5973 o por Ionización Electrospray (ESI) en un Hewlett Packard LC / MS Serie 1100.

El metronidazol empleado en la síntesis de todos los ligandos fue de calidad USP (Farmacopea de los Estados Unidos de América), y fue proporcionado por Laboratorios Gramón-Bagó del Uruguay S.A.

Los *kits IsolinkTM*, Mallinckrodt Medical B.V. empleados en la preparación del precursor tricarbónico fueron proporcionados por Covidien. El monóxido de carbono gaseoso fue de alta pureza de AGA-Speciality Gas, Cleveland, EEUU.

La sal sódica del ácido [2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]ditiocarbámico (L1), así como también el hidrobromuro de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilamina fueron

sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias en el marco de la tesis de doctorado del Dr. Javier Giglio (78).

El [^{99m}Tc]NaTcO₄ empleado en todas las marcaciones fue eluido de un generador $^{99}\text{W}/^{99m}\text{Tc}$ Tecnonuclear, Industria Argentina, proporcionado por el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas.

El [^{68}Ga]GaCl₃ empleado en todas las marcaciones fue eluido de un generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Eckert & Ziegler (IGG 100-50M), en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). Para su elución fue utilizada una solución de ácido clorhídrico 0.1 N ultra puro de Merck a flujo de 1.8 mL/min empleando bomba peristáltica.

Para las determinaciones de actividad se empleó una cámara de ionización CAPINTEC CRC5 o ALFANUCLEAR ACT-15P. También se utilizaron espectrómetros de centelleo sólido con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC y con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas plano acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

4.2 – Métodos

4.2.1. – Síntesis de ligandos

4.2.1.1 – Síntesis de *N*-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2)

*4.2.1.1.1 – Síntesis de [2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil metilsulfonilo.*

Una solución de cloruro de metilsulfonilo (1.6 mL, 21 mmoles) en diclorometano anhidro (3 mL) fue adicionada gota a gota a una suspensión de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol (metronidazol) (3.0 g, 17.5 mmoles) y trietilamina (3.7 mL, 26.3 mmoles) en diclorometano (60 mL) a 20°C bajo atmósfera de nitrógeno. Luego de 4 horas de agitación, la mezcla es filtrada y el sólido es lavado con agua (2 x 50 mL) (3.32 g, 76%). Los datos espectroscópicos que confirman la identidad del producto coinciden con los publicados (93).

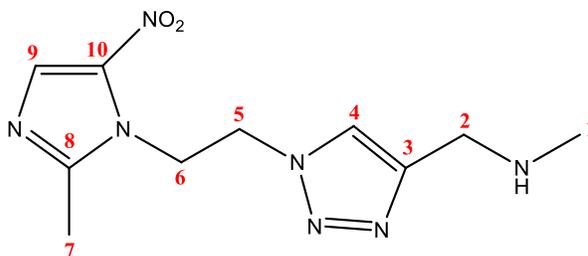
4.2.1.1.2 – Síntesis de [2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)]etilazida.

Una solución del derivado sulfonilo sintetizado anteriormente (3.32 g, 13.35 mmoles) y azida de sodio (0.96 g, 14.7 mmoles) en dimetilformamida anhidra (37 mL) es calentada a 100°C durante 1 hora. A continuación, la mezcla es enfriada y se le agrega una solución saturada de cloruro de sodio (100 mL) luego de lo cual se realiza la extracción del producto con acetato de etilo (3 x 50 mL). Posteriormente, la fracción orgánica es lavada con solución saturada de cloruro de sodio (2 x 50 mL), secada con sulfato de sodio anhidro y evaporado el disolvente a presión reducida para obtener un producto de color amarillo-anaranjado (1,7 g, 71%). Los datos espectroscópicos que confirman la identidad del producto coinciden con los publicados (93).

4.2.1.1.3 - Síntesis de N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2).

Una solución de ascorbato de sodio (0.30 g, 1.49 mmoles) y sulfato de cobre (II) (0.47 g, 2.97 mmoles) en agua (15 mL) se adiciona sobre una solución de la azida sintetizada anteriormente (1.50 g, 7.42 mmoles) y N-metilpropargilamina (0.63 mL, 7.42 mmoles) en *tert*-butanol (15 mL) bajo agitación continua a 20°C. La mezcla se deja reaccionar hasta el día siguiente cuando se le incorpora nuevamente ascorbato de sodio (0.15 g, 0.75 mmoles). Pasadas 24 horas de agitación a temperatura ambiente, la reacción se detiene por

evaporación del *tert*-butanol bajo presión reducida y a la mezcla acuosa remanente se le agrega una solución de hidróxido de sodio 33% (60 mL). A continuación se



realizan extracciones con acetato de etilo (4 x 60 mL). Las fracciones orgánicas se juntan, se secan con sulfato de sodio anhidro y el disolvente es evaporado a presión reducida. Se obtiene un sólido marrón claro (0.92 g, 47%). PF: 86.5-88.9 °C. ¹H-RMN (CD₃OD:D₂O) δ (ppm): 2.00 (s, 3H, H-7), 2.37 (s, 3H, H-1), 3.80 (s, 2H, H-2), 4.87 (t, J = 3.0 Hz, 2H, H-6), 4.91 (H-5)¹, 7.79 (s, 1H, H-4), 7.98 (s, 1H, H-9). ¹³C-RMN

¹ Señal de metileno superpuesta con la señal del agua del disolvente.

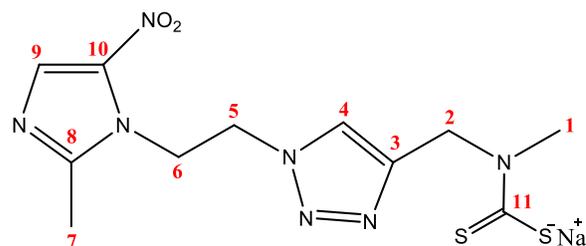
(CD₃OD:D₂O) δ (ppm): 11.8 (C-7), 33.9 (C-1), 44.9 (C-2), 46.1 (C-6), 49.1 (C-5), 123.9 (C-4), 131.6 (C-9), 138.7 (C-10), 145.7 (C-3), 151.0 (C-8).

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 1366 (NO₂), 1527 (NO₂), 3402 (N-H).

MS, m/z : 264 (M⁺- H, 20%), 248 (M⁺- OH, 22%), 218 (M⁺- HNO₂, 9%), 44 (CH₃NHCH₂⁺, 100%).

4.2.1.2 – Síntesis de la sal sódica del ácido *N*-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilditiocarbámico (L3)

Sobre una suspensión de hidruro de sodio (33 mg, 1.36 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (15 mL) enfriado a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno, se agrega el compuesto L2 sintetizado previamente (300 mg, 1.14 mmoles) y disulfuro de carbono (0.1 mL, 1.70 mmoles). La mezcla se agita durante 30 minutos luego de los cuales el baño de hielo es retirado y se comienza el



calentamiento a reflujo. La reacción se detiene a las 4 horas y el disolvente es evaporado, obteniéndose un sólido marrón (319 mg, 77%) que corresponde a L3. ¹H-RMN (CD₃OD:D₂O) δ (ppm): 1.98 (s, 3H, H-7), 3.50 (s, 3H, H-1), 4.84 (t, J = 3.2 Hz, H-6), 4.90 (H-5)², 5.48 (s, 2H, H-2), 7.97 (s, 1H, H-9), 8.05 (s, 1H, H-4). ¹³C-RMN (CD₃OD:D₂O) δ (ppm): 12 (C-7), 41 (C-1), 46 (C-6), 49 (C-5), 51 (C-2), 125 (C-4), 132 (C-9), 139 (C-10), 142 (C-3), 151 (C-8).

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 1050 (S-CS-N), 1151 (C-N), 1364 (NO₂), 1539 (NO₂).

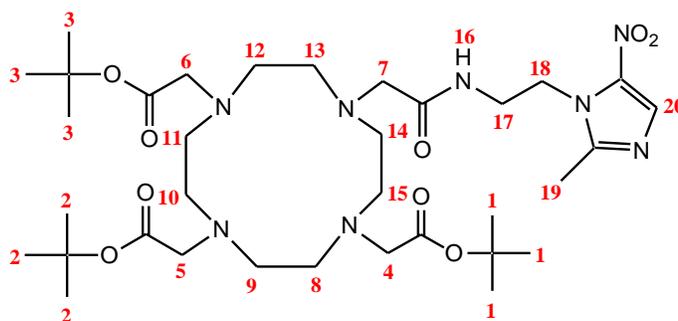
² Señal de metileno superpuesta con la señal del agua del disolvente.

4.2.1.3 – Síntesis del ácido 10-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L4)

4.2.1.3.1 – Síntesis de 10-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano.

Se disuelve el hidrobromuro de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilamina en agua y se ajusta a pH 12 con solución acuosa de hidróxido de sodio 33%. A continuación, se realiza la extracción de la amina neutra con diclorometano (10 x 20 mL). Rendimiento de la extracción: 57%. Se disuelve la amina neutra (12.8 mg, 0.075 mmoles) junto con 1,4,7-tris-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-acetato de *N*-hidroxisuccinimida (éster DOTA-mono-NHS-*tris-t*-butilo) (50 mg, 0.075 mmoles) en diclorometano anhidro (3 mL) y la reacción se agita a 20°C durante 5 días. Luego de este período, se interrumpe la reacción evaporando el disolvente bajo presión reducida. El producto es purificado

mediante cromatografía en columna de alúmina y un gradiente de diclorometano y metanol como fase móvil. Se obtiene un aceite de color amarillo (21 mg, 47%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.45 (m, 27H, H-1,



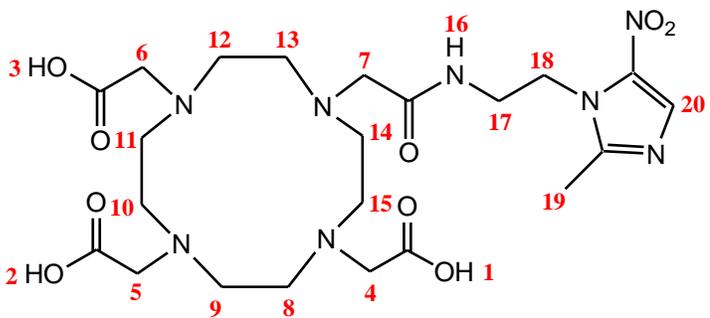
H-2, H-3), 1.70-4.10 (sa + s, 29H, H-4 hasta 15, H-17, H-19), 4.46 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-18), 6.81 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H-16), 7.90 (s, 1H, H-20).

MS, *m/z*: 707 (M⁺ - OH, 1%), 554 (M⁺ - 170, 1%), 107 (M⁺ - 617, 10%), 56 (CH₂=C(CH₃)₂, 57%), 41 (CH₂=CHCH₃, 100%), 28 (CH₂=CH₂, 19%).

4.2.1.3.2 - Síntesis del ácido 10-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L4).

La reacción de desprotección del producto anterior se realiza en todos los casos en el día anterior al momento de la marcación con ⁶⁸Ga para garantizar la integridad del ligando. El derivado sintetizado en la reacción anterior (21 mg, 0.029 mmoles) se disuelve en cloroformo (1 mL) y se agrega un exceso de ácido trifluoroacético (0.046

mL, 0.60 mmoles) y la mezcla es calentada a reflujo bajo agitación continua. Luego de 4 horas de calentamiento, la reacción se detiene y el disolvente es evaporado bajo presión reducida.



$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ (ppm): 2.60-4.40

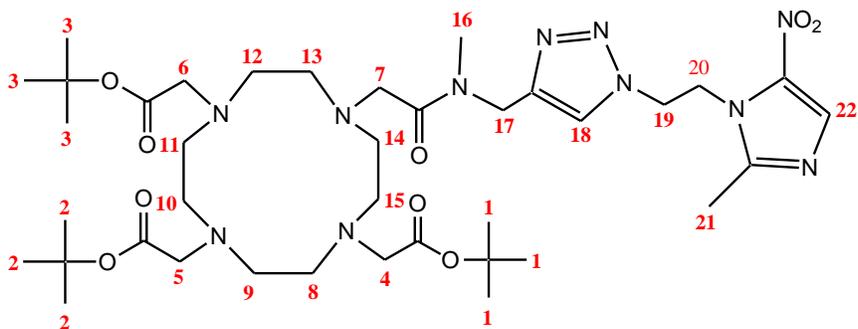
(sa + s, 29H, H-4 hasta 15, H-17, H-19), 4.55 (t, 2H, H-18), 8.35 (s, 1H, H-20).

4.2.1.4 – Síntesis del ácido 10- $\{[N\text{-metil-1-[1-(2-(2\text{-metil-5-nitro-1}H\text{-imidazol-1-il)etil)-1}H\text{-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil}-1,4,7\text{-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (L5)}$

4.2.1.4.1 – Síntesis de 10- $\{[N\text{-metil-1-[1-(2-(2\text{-metil-5-nitro-1}H\text{-imidazol-1-il)etil)-1}H\text{-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil}-1,4,7,10\text{-tetraazaciclododecano-1,4,7--tris(tert-butilacetato)}$.

Se disuelve la *N*-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2) (19.8 mg, 0.075 mmoles) junto con el éster DOTA-mono-NHS-*tris-t*-butilo (50 mg, 0.075 mmoles) en diclorometano anhidro (3 mL) y la reacción se agita a 20°C durante 5 días.

Luego de este período, se interrumpe la reacción por evaporación del disolvente bajo presión reducida. El producto es purificado mediante



cromatografía en columna de sílica y un gradiente de diclorometano y metanol como fase móvil. Se obtiene un aceite de color amarillo (31 mg, 49%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ

(ppm): 1.46 (m, 27H, H-1, H-2, H-3), 1.80-3.70 (sa + 2s, 30H, H-4 hasta 15, H-16, H-21), 4.81 (m, 4H, H-19 y H-20), 7.92 + 8.25 (2s, 1H, H-18)³, 7.94 (s, 1H, H-22).
MS, *m/z*: 514 (M⁺ - 315, 1%), 264 (L2⁺, 1%), 248 (L2⁺-17, 3%), 56 (CH₂=C(CH₃)₂, 75%), 41 (CH₂=CHCH₃, 100%), 28 (CH₂=CH₂, 42%).

4.2.1.4.2 - Síntesis del ácido 10-[[N-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L5)

Al igual que para L4, la desprotección del producto de la reacción anterior es realizada un día antes al momento del marcado con ⁶⁸Ga para garantizar su integridad. El derivado sintetizado en la reacción anterior (40 mg, 0.046 mmoles) se disuelve en cloroformo (2 mL) y se agrega un exceso de ácido trifluoroacético (0.070 mL, 0.92 mmoles) y la mezcla es calentada a reflujo bajo agitación continua. Luego de 4 horas de calentamiento, la reacción se detiene y el disolvente es evaporado bajo presión reducida.

4.2.2 – Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc

4.2.2.1 – Síntesis del precursor tricarbonílico *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ (59)

En un vial de vidrio se coloca carbonato de sodio (4.0 mg), borohidruro de sodio (5.0-7.0 mg) y tartrato de sodio y potasio (20.0 mg). A continuación, el vial es sellado y purgado con monóxido de carbono gaseoso durante 15 minutos. Posteriormente, se adiciona la solución de [^{99m}Tc]NaTcO₄ (20-50 mCi o 185-1850 MBq, 0.5-1.0 mL) eluido a partir de un generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. La mezcla es calentada a 75°C durante 20 minutos. La pureza radioquímica es determinada por HPLC empleando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 AS, acoplado a un detector γ Parken con una columna Phenomenex Luna 5 μ m C18 de 15 cm de longitud. La elución se realiza utilizando un gradiente de 1 mL/min compuesto por un buffer fosfato-trietilamina

³ Ver Discusión.

pH=2.5 (A) y metanol (B). El gradiente de ambos disolventes se muestra a continuación.

Tiempo (min)	% A	% B
0-3	100	0
3-6	100-75	0-25
6-9	75-66	25-34
9-20	66-0	34-100
20-27	0	100
27-30	0-100	100-0

Finalmente, el precursor es neutralizado con una solución de fosfato diácido de sodio (390 mg/mL). El pH se controla con tira de papel.

4.2.2.2 – Síntesis del precursor tricarbonílico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de kit comercial.

Sobre un kit liofilizado Isolink™, que contiene tetraborato de sodio (2.85 mg), carbonato de sodio (7.15 mg), tartrato de sodio (8.50 mg) y boranocarbonato de sodio (2.85 mg), se agrega $[^{99m}Tc]NaTcO_4$ (5-50 mCi ó 185-1850 MBq, 0.5-1.0 mL) eluido a partir de un generador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$. A continuación, el vial se calienta en un baño de agua a ebullición durante 20 minutos. El producto obtenido es controlado por HPLC utilizando el sistema descrito en 4.2.2.1. y antes de realizar la sustitución con los ligandos, se neutraliza de la misma manera que se describe el 4.2.2.1.

4.2.2.3 – Síntesis del complejo tricarbonílico con L1

La sustitución del precursor $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ se realiza agregando la solución del precursor neutralizado sobre un vial que contiene L1 (4.0 mg) disuelto en dimetilsulfóxido (200 μ L). A continuación, la mezcla es calentada a 75°C durante 30 minutos y la pureza radioquímica es evaluada mediante HPLC con una columna

Waters μ Bondapak™ C18 de diámetro 3.9 mm y 30 cm de longitud. La elución se realiza utilizando un gradiente de 1 mL/min compuesto por una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (v/v) en agua (A) y una solución de TFA 0.1% (v/v) en acetonitrilo (B). El gradiente de ambos disolventes se muestra a continuación:

Tiempo (min)	%A	%B
0-3	100	0
3-10	100-0	0-100
10-22	0	100
22-24	0-100	100-0

4.2.2.4 – Síntesis del complejo tricarbónico con L2

La sustitución del precursor $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ se realiza agregando la solución del precursor neutralizado sobre un vial que contiene L2 (4.0 mg) disuelto en metanol (200 μ L). A continuación, la mezcla es calentada a 75°C durante 30 minutos y la pureza radioquímica del complejo se controla mediante el sistema de HPLC descrito en 4.2.2.1.

4.2.2.5 – Síntesis del complejo tricarbónico con L3

La sustitución del precursor $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ se realiza agregando la solución del precursor neutralizado sobre un vial que contiene L3 (4.0 mg) disuelto en metanol (200 μ L). A continuación, la mezcla es calentada a 75°C durante 30 minutos y la pureza radioquímica del complejo se controla mediante el sistema de HPLC descrito en 4.2.2.1.

4.2.3 – Síntesis de los complejos de ^{68}Ga

4.2.3.1 – Síntesis del complejo con L4

Una solución de $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ eluida de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (10-20 mCi, 2.0 mL) se coloca en el vial de reacción junto con el ligando previamente disuelto en agua destilada (18-20 nmoles, 200 μL) y una solución de acetato de sodio 1.14 M (400 μL) hasta alcanzar un pH de 4.5. A continuación, la mezcla es calentada durante 15 minutos a 95°C. La pureza radioquímica del complejo se controla mediante el sistema de HPLC descrito en 4.2.2.3.

4.2.3.2 – Síntesis del complejo con L5

Una solución de $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ eluida de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (10-20 mCi, 2.0 mL) se coloca en el vial de reacción junto con el ligando previamente disuelto en agua destilada (18-20 nmoles, 200 μL) y una solución de acetato de sodio 1.14 M (400 μL) hasta alcanzar un pH de 4.5. A continuación, la mezcla es calentada durante 15 minutos a 95°C. La pureza radioquímica del complejo final es evaluada mediante HPLC utilizando el mismo sistema que se describe en 4.2.2.3.

4.2.4 – Caracterización fisicoquímica de los complejos

4.2.4.1 – Determinación de la lipofilicidad

La lipofilicidad de los complejos sintetizados es evaluada a pH = 7.4 mediante la determinación del coeficiente de partición octanol/buffer fosfato 0.1 M. Para ello, se colocan en un tubo de centrífuga la fase orgánica (octanol, 2 mL) y la fase acuosa (buffer fosfato 0.1 M, pH = 7.4, 2.0 mL). A continuación, se agrega la solución conteniendo el complejo (100 μL) y la mezcla es agitada mediante agitador vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifuga durante 5 minutos a una velocidad

de 5000 rpm en una centrífuga EVA III y una vez que ambas fases están separadas, se realizan 2 tomas de cada una de ellas (entre 2-50 μL) y se mide la actividad de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido. Se realizan 3 repeticiones de cada experiencia.

4.2.4.2 – Determinación del porcentaje de unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas es determinada mediante exclusión molecular. Para ello, se emplean columnas de exclusión molecular *GE Healthcare illustra MicroSpin G-50*. En primer lugar, el buffer de conservación de las columnas es extraído mediante centrifugación de las mismas durante 1 minuto a 4000 rpm. A continuación, se siembra sobre cada columna 50 μL de plasma incubado con el complejo a 37°C durante una hora, y luego de 2 minutos las columnas son centrifugadas nuevamente durante 1 minuto a 4000 rpm. Finalizada esta etapa, se mide la actividad eluida de la columna y la retenida en ella en un equipo de centelleo sólido.

4.2.4.3 – Determinación de la estabilidad en el medio de reacción

La estabilidad de los complejos sintetizados en el medio de reacción es evaluada mediante incubación de la mezcla a temperatura ambiente, controlando la pureza radioquímica del complejo mediante el sistema de HPLC empleado en cada caso a 1, 2, 3 y 4 horas post-inyección.

4.2.4.4 – Determinación de la estabilidad en plasma

La estabilidad en plasma es evaluada mediante la incubación de los complejos (100 μL) con un pool de plasma humano (1000 μL) a 37°C. A las 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación, se realiza una toma de muestra (200 μL) y, una vez extraída, se precipitan las proteínas plasmáticas con etanol absoluto frío (-15°C, 200 μL) seguido de incubación durante 5 minutos en freezer. Una vez completada la precipitación, las muestras son centrifugadas a 15000 rpm durante 5 minutos a 0°C. Finalmente, la

pureza radioquímica del complejo en el sobrenadante es analizada mediante HPLC bajo las mismas condiciones en las que fue evaluada la reacción de marcación para cada caso.

4.2.5 – Caracterización biológica de los complejos de ^{99m}Tc y ^{68}Ga

La caracterización biológica de los complejos fue evaluada mediante biodistribución en ratones C57 hembras de 3 meses de edad, portadores de tumores inducidos. Los animales fueron adquiridos en el Bioterio del DI.LA.VE. (Dirección de Laboratorios Veterinarios, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). La manipulación de los mismos se realiza teniendo en cuenta las normas vigentes sobre el manejo de animales de experimentación (Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria) y todo el protocolo utilizado en el trabajo de esta tesis ha sido previamente aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).

Los tumores fueron inducidos por la inoculación de 3×10^6 células de Carcinoma de Lewis de pulmón murino 3LL provistas por el Dr. Alejandro Chabalgoity y la Dra. María Moreno del Laboratorio de Vacunas Recombinantes del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Las células fueron inoculadas por vía subcutánea en el dorso sobre el miembro posterior derecho, y las biodistribuciones se realizan entre 20 a 30 días post-inoculación, cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 1.5 x 0.5 x 0.5 cm. Cabe destacar que el modelo utilizado ha sido evaluado previamente durante el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Javier Giglio (78) y los estudios histopatológicos realizados por el Prof. Dr. Veterinario José Pacheco de la Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, UdelaR, confirman la malignidad de los tumores, concordante con las características de las células inoculadas y la existencia de zonas hipóxicas.

Los estudios de biodistribución se realizan inyectando los complejos por vía intravenosa (3 animales por tiempo) y transcurrido el tiempo de biodistribución establecido (0.5, 1 y 2 horas post-inyección), los animales son sacrificados por tracción cervical. Los órganos, tejidos y muestras de interés son extraídos, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido, realizando las correcciones por geometría correspondientes para cada caso.

4.2.6 – Preparación de complejos con renio estable para los ligandos L2 y L3

Los complejos de Re(I)-tricarbonílicos fueron sintetizados mediante reacción de intercambio de ligandos utilizando *fac*-[NEt₄]₂[Re(CO)₃Br₃] como precursor.

4.2.6.1 – Síntesis del complejo precursor *fac*-[NEt₄]₂[Re(CO)₃Br₃]

4.2.6.1.1 – *Síntesis del complejo ReBr(CO)₅ (94)*

En un balón de vidrio con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se agrega el reactivo del partida Re₂(CO)₁₀ (1.0 g, 1.5 mmoles) disuelto en hexano (50 mL) y Br₂ (0.26 g, 1.6 mmoles). Inmediatamente se forma un precipitado que corresponde al producto deseado. Se continúa la agitación a temperatura ambiente hasta la desaparición del color del bromo. El hexano es removido por evaporación a presión reducida a temperatura ambiente y el precipitado es purificado mediante sublimación a presión reducida (aproximadamente 10⁻⁵ atm.) a 90°C.

4.2.6.1.2 – *Síntesis del complejo *fac*-[NEt₄]₂[Re(CO)₃Br₃] (95,96)*

Se suspende el bromuro de tetraetilamonio (1 g, 4.76 mmoles) en el disolvente 2,5,8-trioxanona (diglima) (300 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión es calentada a 80°C y se agrega el producto sintetizado en la etapa anterior, el ReBr(CO)₅ (0.85 g, 2.10 mmoles) disueltos en diglima (30 mL) caliente. La mezcla es calentada a 115°C durante 12 horas, observándose la formación de un precipitado blanco. El sólido es separado por filtración y lavado con etanol frío.

4.2.6.2 – Síntesis de los complejos Re(I) tricarbónicos de L2 y L3

Para la preparación de estos complejos se disuelve el precursor tricarbónico de renio sintetizado en la etapa anterior (49 mg, 64 nmoles) en una solución de agua:metanol (1:1) (20 mL). A continuación, se agrega el ligando correspondiente (L2 o L3, 64 nmoles) y se agita vigorosamente a 70°C. La reacción se controla mediante HPLC-UV y se detiene cuando se observa desaparición de reactivos. Las condiciones de análisis son las descritas en 4.2.2.1. En ambos casos se obtuvieron sólidos que fueron filtrados, redisolventes en metanol y analizados mediante HPLC y análisis elemental. Resultado para L2: t_R (tiempo de retención) en HPLC: 16 minutos, Análisis elemental: C: 26.31%, H: 3.05%, N: 15.50%, S: 0.00%. Resultado para L3: t_R en HPLC: 21 minutos, Análisis elemental: C: 26.56%, H: 2.30%, N: 14.25%, S: 9.13%.

5 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 – Síntesis de los ligandos

5.1.1 - Síntesis de *N*-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilamina (L2)

El diseño de este ligando tuvo por objetivo la conjugación del farmacóforo con un grupo 1,2,3-triazol, función extremadamente versátil que proporciona un átomo de nitrógeno donador (nitrógeno 3 del 1*H*-1,2,3-triazol) como lo es el nitrógeno del anillo imidazólico de la histidina, ligando de propiedades muy buenas para la coordinación en complejos Tc(I)-tricarbonílicos. La ventaja adicional de este heterociclo consiste en su sencilla síntesis por medio de la reacción de cicloadición [4+2] de Huisgen, catalizada por el Cu⁺ (97). Esta reacción es la más representativa del concepto *Click Chemistry*, que involucra a un conjunto de reacciones rápidas, de alta selectividad y confiabilidad (98). La cicloadición [4+2] de Huisgen entre azidas y alquinos terminales catalizada por Cu⁺ ha sido utilizada ampliamente para la síntesis de 1,2,3-triazol-1,4-disustituidos (99):

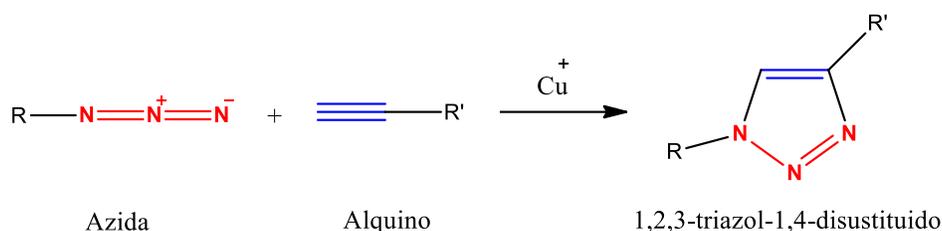


Fig. 35. Cicloadición [4+2] de Huisgen.

Existen en la literatura antecedentes del uso de dicha reacción en la síntesis de ligandos para este tipo de complejos (100). El objetivo que se persigue en estos casos es la utilización de dicha reacción como herramienta para la incorporación sobre el farmacóforo de átomos donores que puedan coordinar al metal. Para ello, en una primera instancia se incorpora a la molécula que contiene el farmacóforo, a través de

un conector, un grupo azida y posteriormente, se realiza la cicloadición con un alquino que contenga otras funciones ricas en electrones que también actúen como átomos donores en el complejo final (figura 36). Existe una segunda opción, que consiste en incorporar el triple enlace sobre la molécula que contiene al farmacóforo.

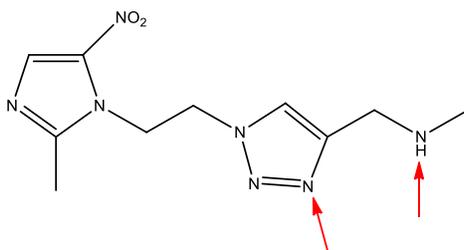


Fig. 36. Átomos donores de electrones en L2.

A modo de síntesis, las principales ventajas de esta reacción se pueden resumir de la siguiente manera:

- Es una reacción de gran eficiencia.
- La selectividad de reacción entre azidas y alquinos es muy elevada, lo cual minimiza las reacciones cruzadas.

Para la preparación de este ligando, la estrategia fue la sustitución del grupo hidroxilo del metronidazol por un grupo azida y su posterior cicloadición a una molécula de *N*-metilpropargilamina (figura 37). De esta manera, se estarían incorporando dos posibles átomos donores: un N del triazol y el N del grupo amina secundaria, lo que conduciría a un ligando del tipo bidentado como se indica en la figura 36.

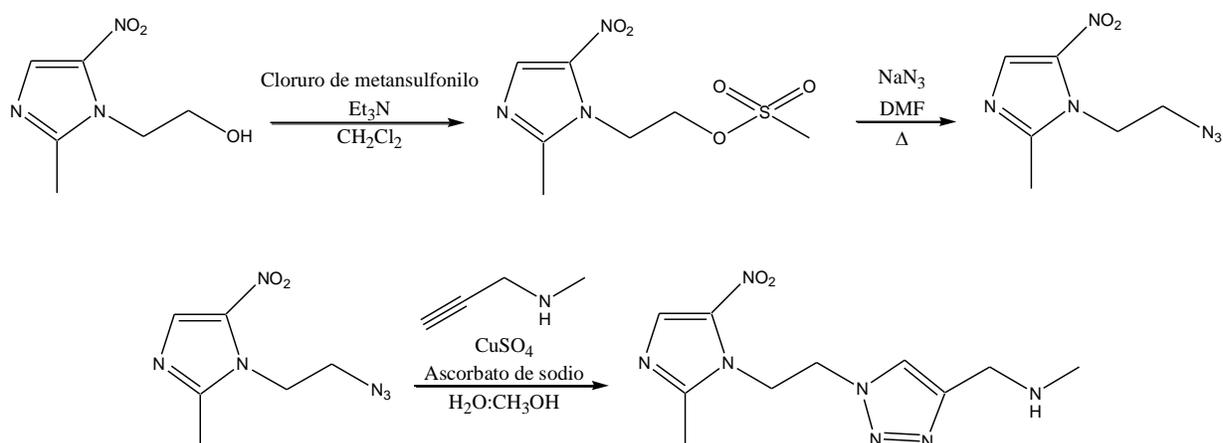


Fig. 37. Ruta sintética para la preparación de L2.

El agrupamiento azida fue incorporado sobre el metronidazol de acuerdo a la técnica propuesta por Hay et. al. (93) en la que el alcohol es transformado en el correspondiente metansulfonato, lo cual favorece el ataque nucleofílico de la azida de sodio en una segunda instancia. La ruta de síntesis se muestra en la figura 37.

La cicloadición es catalizada por Cu(I), que se genera *in situ* por reducción del Cu(II) en presencia de ascorbato de sodio.

La caracterización estructural de L2 se realizó mediante el empleo de espectroscopía ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, así como también experimentos COSY, HSQC y HMBC. A modo de ejemplo, se muestra a continuación el análisis de los espectros obtenidos para este ligando.

La figura 38 muestra el espectro de ^1H -RMN para el producto obtenido. Se pueden observar las señales integradas y asignadas a cada uno de los grupos de protones de la molécula. Los dos grupos de protones metílicos de la estructura aparecen, como es esperable, en la región de δ bajos. La asignación de ambas señales se realizó teniendo en cuenta que el C-1 (según numeración en figura 38) está unido a un heteroátomo (N), por lo que sus protones están más desblindados, y por lo tanto, se necesita menor campo magnético externo para que éstos resuenen. Como consecuencia, la señal aparece a δ mayores. Los protones metilénicos de la molécula pertenecen a tres carbonos: C-2, C-5 y C-6. Estos dos últimos se encuentran en entornos químicos similares, por lo que sus señales son muy cercanas. Los protones de C-6 aparecen como un triplete a 4.87 ppm. Esta señal se correlaciona con la señal

del C-6 (46.1 ppm), hecho que se manifiesta en el experimento HSQC (figura 39a). Adicionalmente, el experimento de HMBC (figura 40) muestra la correlación de estos protones con las señales de C-10 y C-8. Por otro lado, la señal de los protones de C-5 aparece superpuesta con la señal del agua presente en el disolvente. Este hecho se confirma a través de los experimentos de HSQC (donde la señal está acoplada a la del C-5, ver figura 39b) y HMBC (donde se correlacionaba con la señal de C-4). De no superponerse, no habría acoplamiento en ninguno de los dos casos.

En la región de protones aromáticos, se observan dos señales, correspondientes a H-4 (7.79 ppm) y H-9 (7.98 ppm). La asignación de estas dos señales se explica mediante el experimento de HMBC, en el que el protón a 7.79 ppm se encuentra correlacionado con el C-3, y el protón de 7.98 ppm se correlaciona con C-10 y C-8. Es importante destacar que la presencia del protón H-4 es el factor determinante para confirmar que la reacción efectivamente tuvo lugar y el triazol fue formado.

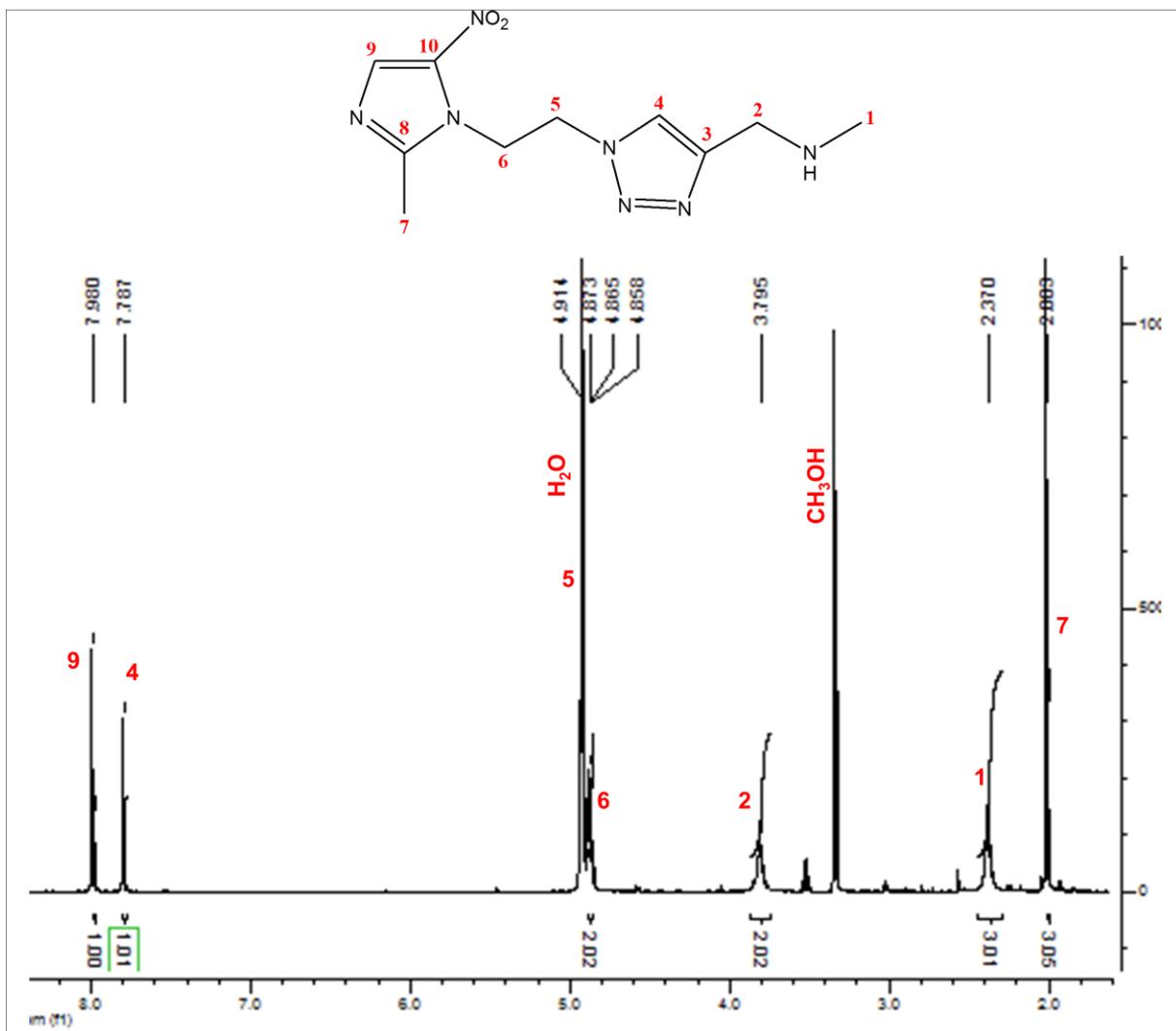


Fig. 38. Espectro de ¹H-RMN para L2 (la numeración ha sido arbitrariamente asignada).

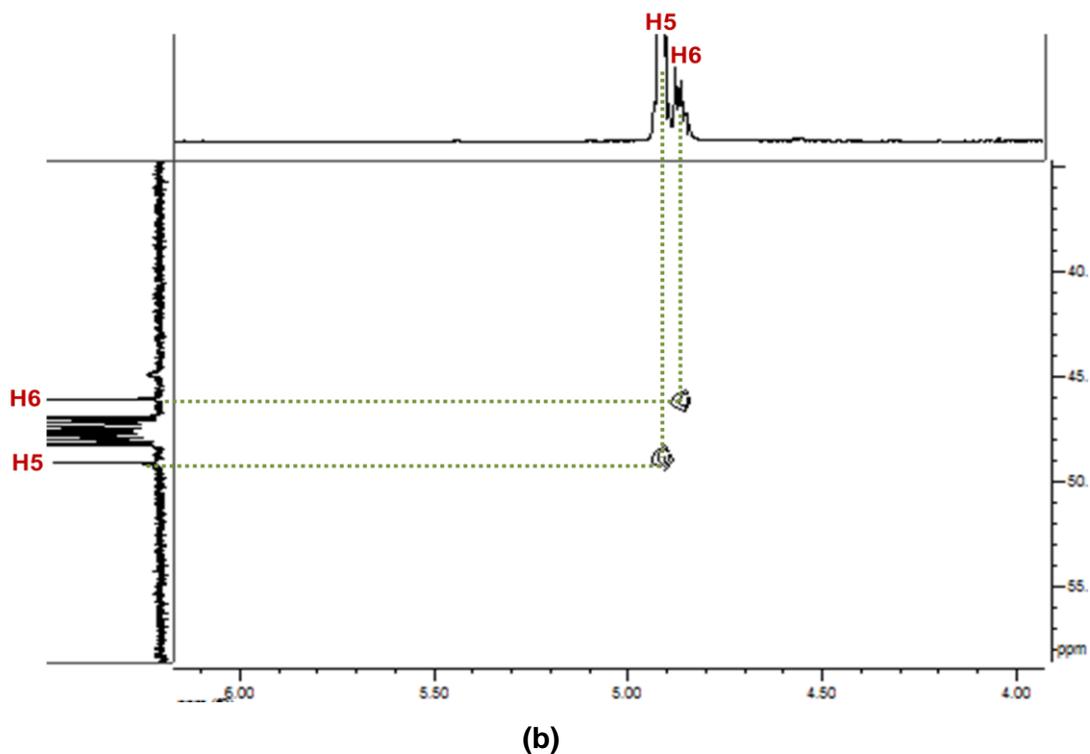
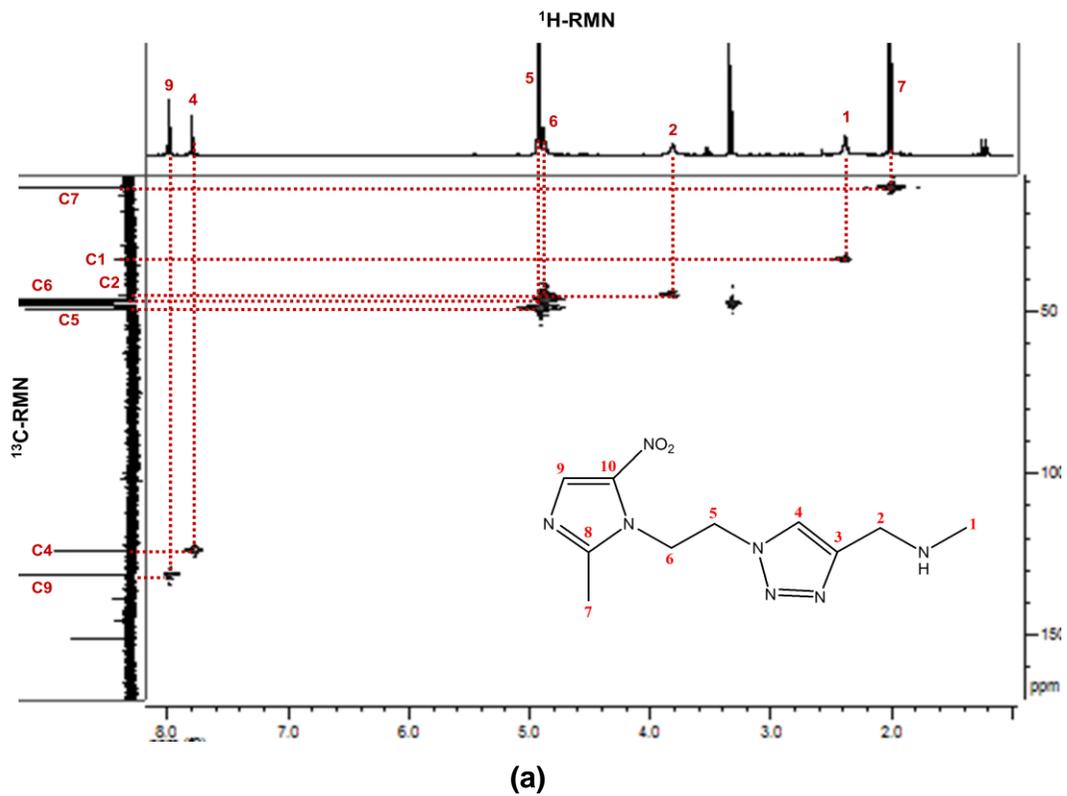


Fig. 39. (a) Experimento HSQC de L2. Las líneas punteadas indican claramente las señales correlacionadas. **(b)** Ampliación del HSQC, donde se muestra claramente que la señal de un grupo de protones metilénicos (H5) se superpone a la señal del agua del disolvente, y presenta acoplamiento con un C del producto.

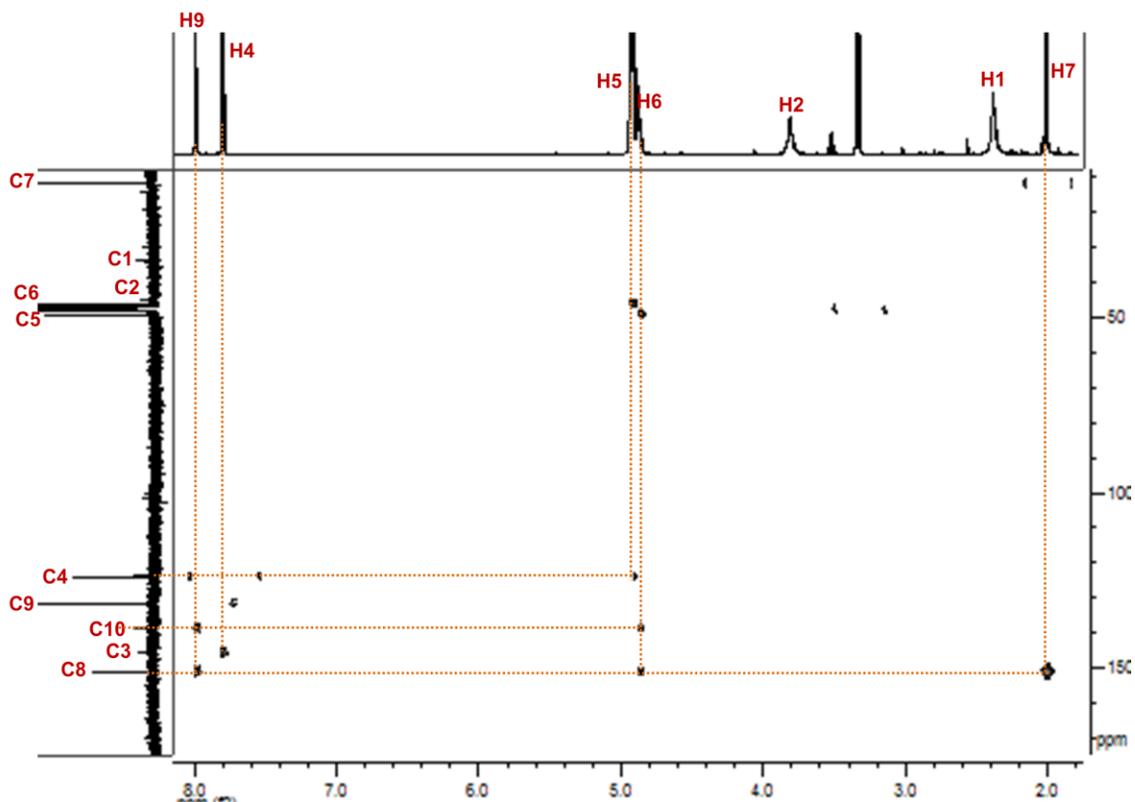


Fig. 40. Experimento de HMBC de L2.

Los experimentos HSQC y HMBC son útiles para la confirmar la correcta asignación estructural realizada a partir del ^1H -RMN así como para asignar señales en el ^{13}C -RMN. En la figura 41 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN.

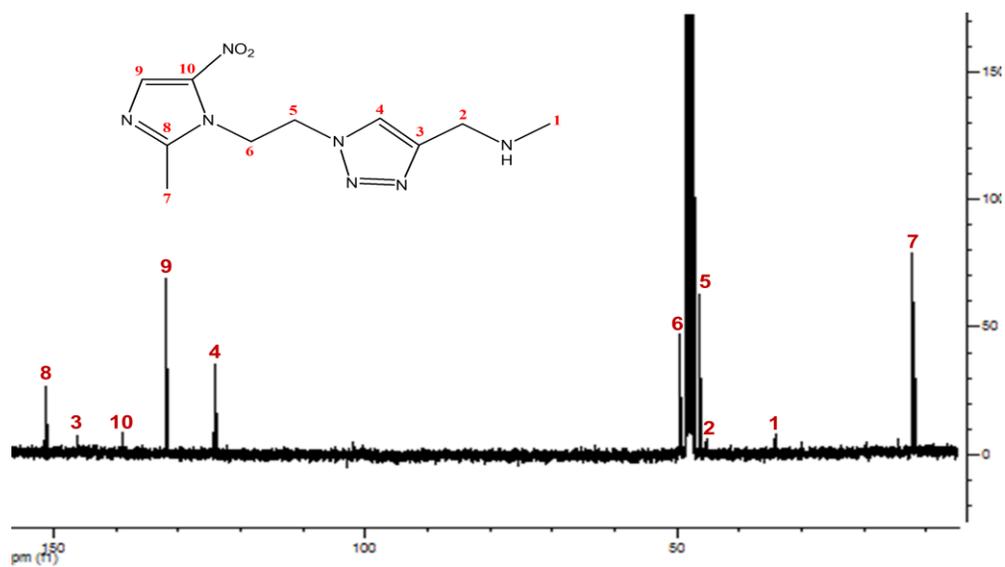


Fig. 41. Espectro ^{13}C -RMN de L2.

Otro experimento que ha sido utilizado para la completa caracterización estructural es el $^1\text{H-COSY}$, que pone en manifiesto acoplamiento protón-protón de carbonos adyacentes. Para el caso de L2, el único acoplamiento que debería observarse es el que ocurre entre los protones en posición 5 y 6.

La espectrometría de masas de este compuesto no permite observar la presencia del ion molecular de $m/z = 265$. Sin embargo, se observan varios fragmentos que indican la presencia del producto. La figura 42 muestra algunos de ellos con su correspondiente abundancia.

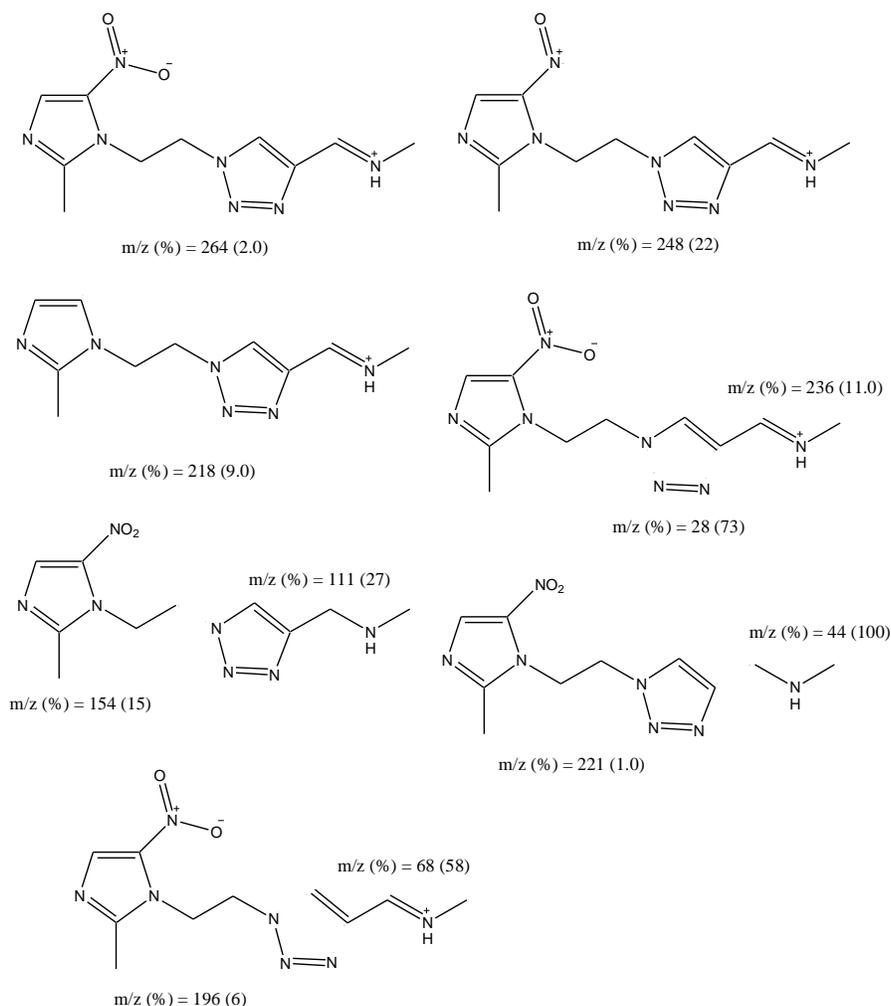


Fig. 42. Algunos fragmentos de L2 generados en el experimento de espectrometría de masas.

La cicloadición [4+2] puede ocurrir bajo diferentes condiciones de reacción, catalizada por metales o modificación térmica, pero en el primer caso, la reacción transcurre en

forma regioselectiva dando lugar a un único triazol (de los dos posibles) en un porcentaje mayor al 90%. Si bien podría esperarse en un principio la formación de dos triazoles disustituídos isómeros (triazoles 1,4- y 1,5-disustituídos), hay evidencias previas de que el catión Cu^+ favorece específicamente la obtención del isómero 1,4-disustituído (101-102). En la figura 43 se muestran los posibles isómeros del L2.

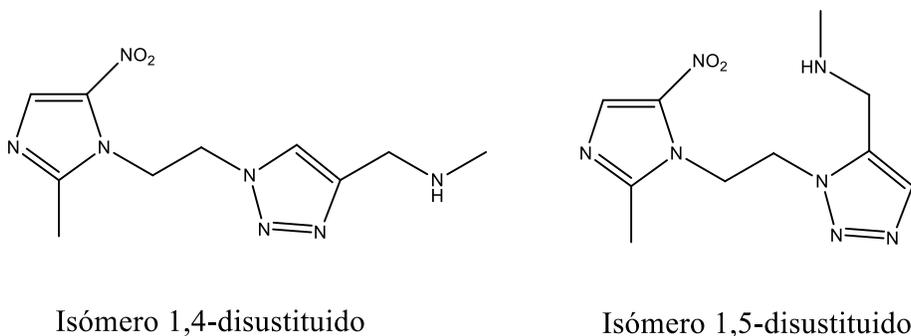


Fig. 43. Isómeros de L2.

Estudios de NOE-diff (Nuclear Overhauser Effect Difference) irradiando diferentes protones de la molécula (protón del triazol y protones del metileno unido a la amina alifática) demuestran que el isómero obtenido en la reacción es el 1,4-disustituído, que en el caso del presente trabajo es el isómero apto para una correcta coordinación posterior del $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Por ello, es adecuado este tipo de catálisis para el L2.

El experimento NOE-diff ha sido tradicionalmente muy utilizado para la determinación de interacciones ^1H - ^1H (efecto NOE) a través del espacio en moléculas de tamaño pequeño y mediano. En el caso de L2, es esperable que las interacciones entre determinados protones se manifiesten de manera diferencial dependiendo del isómero que esté presente. Esto significa que es posible que en un isómero particular, las conformaciones que puede adoptar la molécula permitan que ciertos protones se acerquen en el espacio y sean evidenciados en estudios de NOE-diff. Este fenómeno es lo que le aporta la utilidad al estudio y permite evaluar la presencia de formas isoméricas o conformacionales.

El experimento se basa en la adquisición de dos espectros de protón por separado, uno en el que durante un largo periodo de relajación se irradia una resonancia de protón en concreto, y en el segundo donde se irradia una zona vacía del espectro. El

resultado de restar estos dos espectros muestra los cambios en intensidad producidos por el efecto NOE en aquellas señales cercanas en el espacio al protón irradiado.

Para L2, diversos experimentos de NOE-diff fueron realizados en los que se irradiaron diferentes protones a fin de determinar qué isómeros estaban presentes. Los resultados más relevantes se describen a continuación.

Cuando el protón irradiado es el H-4 (protón del triazol), se espera que presente efecto NOE con aquellos protones que espacialmente estén más cercanos teniendo en cuenta el isómero presente y las conformaciones que la molécula pueda adoptar en cada caso. La figura 44 muestra estas posibles interacciones.

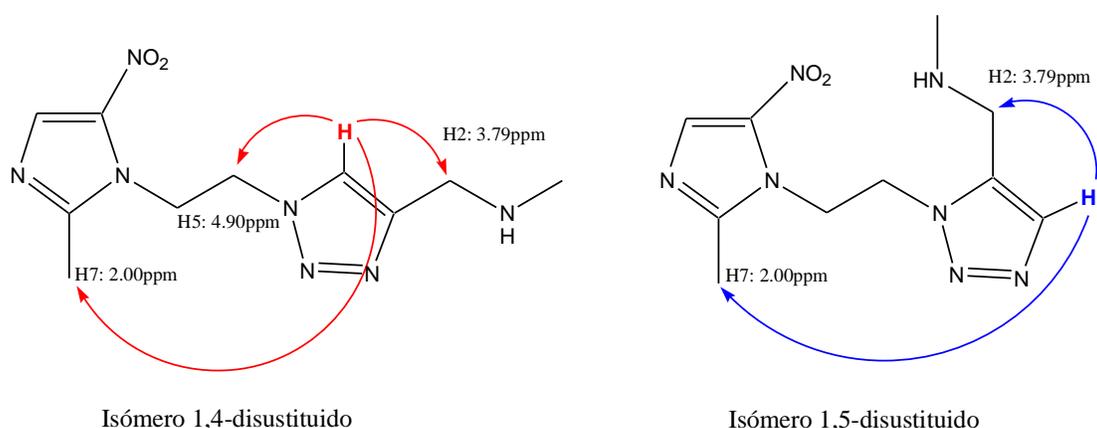


Fig. 44. Interacciones protón-protón esperadas para cada isómero en un experimento de NOE-diff al irradiar H-4 en el ligando L2.

Como se puede observar, se espera que en ambos isómeros aparezca un efecto NOE con los protones H-7 y H-2. Sin embargo, si el isómero 1,4-disustituido estuviera presente, también debería esperarse un efecto con los protones H-5. Efectivamente, al realizar el experimento a tres tiempos de mezclado diferentes (250, 500 y 750 ms), se observan los tres efectos NOE. Se puede concluir, por lo tanto, que el isómero 1,4-disustituido está presente, pero no se puede afirmar sobre la presencia o ausencia del otro isómero, por lo que fue necesario irradiar otros protones de la molécula. La figura 45 muestra las interacciones esperadas para cada isómero cuando los protones irradiados son H-2.

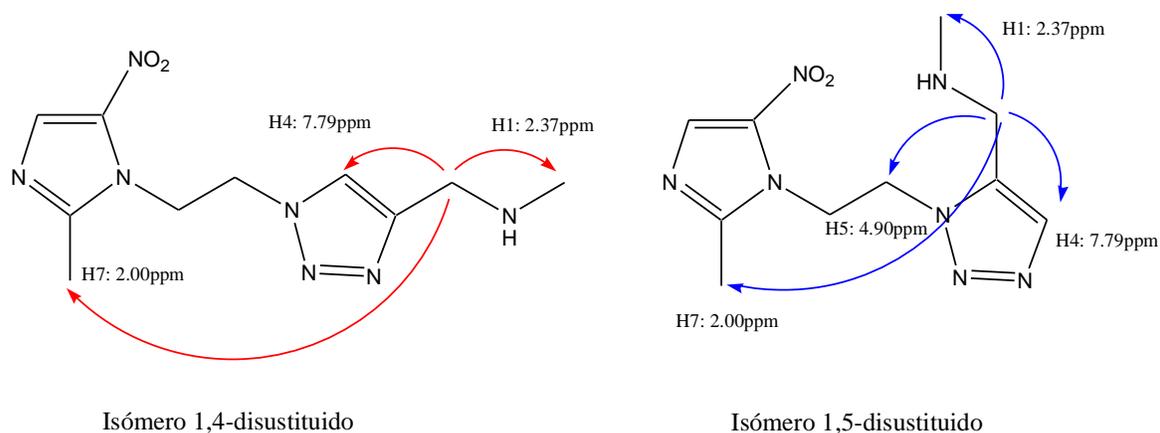


Fig. 45. Interacciones protón-protón esperadas para cada isómero en un experimento de NOE-diff al irradiar H-2 en el ligando L2.

En este caso, si el isómero 1,5-disustituido estuviera presente, debería observarse efecto NOE entre los protones H-2 y los protones H-5. En el experimento, esta señal está ausente y solamente se observan las otras tres señaladas en la figura. La conclusión que se puede extraer es que no hay evidencia de que el isómero 1,5-disustituido esté presente, lo cual coincide con antecedentes bibliográficos sobre la catálisis por cobre.

Para verificar este resultado, se irradió un tercer grupo de protones, H-5. La figura 46 muestra las interacciones esperadas por efecto NOE para este caso.

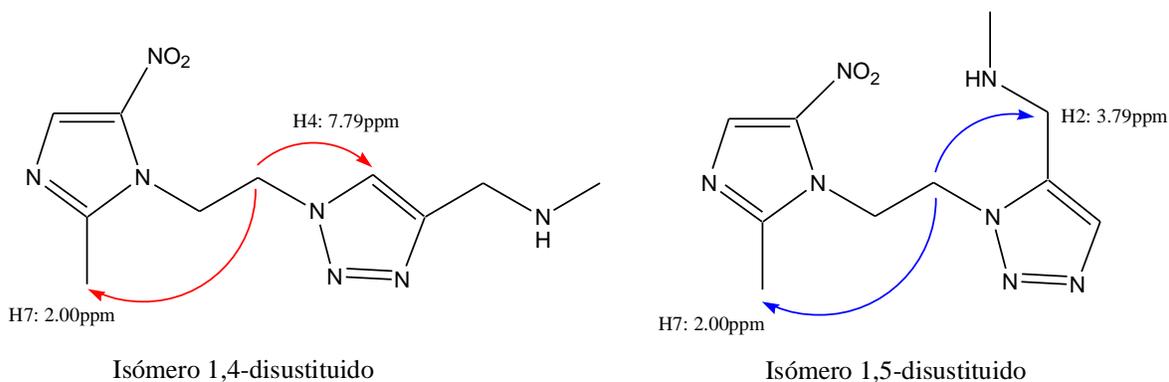


Fig. 46. Interacciones protón-protón esperadas para cada isómero en un experimento de NOE-diff al irradiar H-5 en el ligando L2.

En este caso, la interacción esperada para el isómero 1,5-disustituido con H-2 no se observa a ningún tiempo de mezclado, por lo que este experimento permite reafirmar la conclusión obtenida en el caso anterior.

Por lo tanto, los estudios de NOE-diff realizados permiten concluir que la cicloadición [4+2] catalizada por Cu^+ transcurre en forma regioselectiva, como ha sido descrito previamente.

5.1.2 - Síntesis de la sal sódica del ácido *N*-metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilditiocarbámico (L3)

Este ligando contiene un grupo ditiocarbamato capaz de formar complejos con tecnecio. Como fue mencionado previamente en la introducción, la principal aplicación de esta unidad quelante en radiofarmacia ha sido para la formación del complejos de Tc(V)-nitrido. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizará para la formación de un complejo Tc(I)-tricarbonílico debido a que también la sal del ditiocarbamato es capaz de coordinar al metal de esta forma.

En la síntesis, se toma como reactivo de partida el ligando L2 sobre el cual se incorpora el grupo ditiocarbamato en la amina secundaria. Para esta reacción se procede según la técnica descrita por Goubert y col. (103) levemente modificada, cuyo esquema se muestra a continuación.

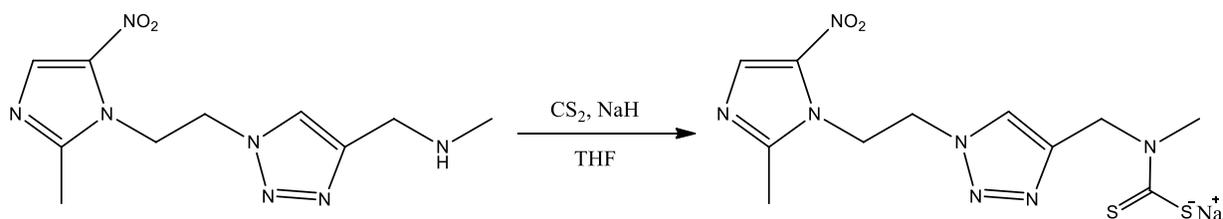
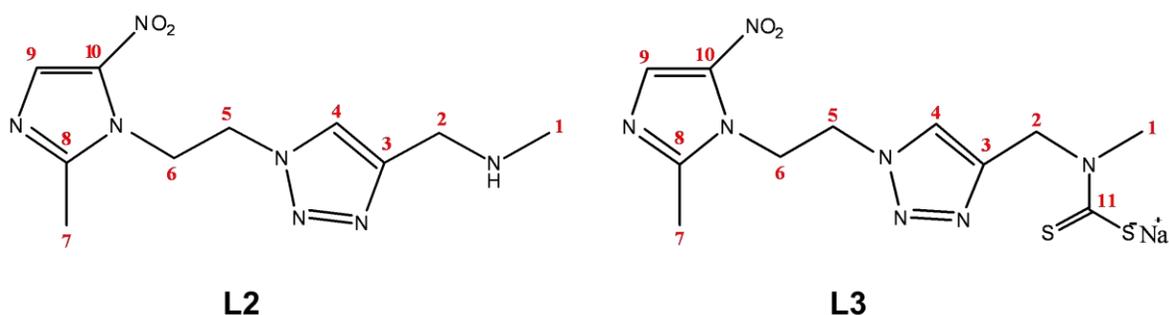


Fig. 47. Esquema de síntesis de L3.

La mezcla de reacción, una vez completada la misma, se evapora para eliminar el disolvente junto con el exceso de disulfuro de carbono obteniéndose el producto como un sólido marrón claro. El producto es caracterizado mediante técnicas espectroscópicas.

Los espectros obtenidos se analizaron de manera similar que para el caso de L2. Dado que el grupo químico incorporado no aporta nuevos grupos de protones a la molécula, en el espectro de ^1H -RMN no se observa la aparición de nuevas señales.

Sin embargo, se observa un claro corrimiento de aquellos protones metálicos y metilénicos adyacentes al nitrógeno sobre el cual se introdujo el tiocarbonilo, así como también del protón aromático del triazol. La figura 48 permite realizar una comparación de todas las señales en dichos espectros.



Señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ para ambos compuestos (ppm)

	L2	L3
H-1	2.37	3.50
H-2	3.80	5.48
H-4	7.79	8.05
H-5	4.91	4.90
H-6	4.87	4.85
H-7	2.00	1.98
H-9	7.98	7.97

Fig. 48. Comparación de las señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ para los ligandos L2 y L3. Se observa un claro corrimiento de los protones cercanos al N donde se incorporó el grupo tiocarbonilo, esto es, H-1, H-2 y H-4.

El corrimiento de estas señales es indicador de la modificación química introducida en la molécula, pero no confirma la generación del grupo ditiocarbamato como tal, ya que éste no aporta nuevos protones. Si bien en el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ es esperable una nueva señal correspondiente a C-11 (numeración según figura 48), en este caso, dicha señal no se observa. La falta de señal para el carbono tiocarbonílico puede ser el resultado de un mayor tiempo de relajación para dicho carbono, por la presencia de los átomos pesados de S. Aunque no se debe descartar la presencia de equilibrios conformacionales, tióxido-tiocarbonilo, que conduce a señales anchas que puedan ser detectadas en el experimento de carbono 13.

Por este motivo, se recurrió a la espectroscopía IR para verificar la presencia del nuevo grupo incorporado. La figura 49 muestra los resultados. En ella, se observa una superposición de una región ampliada de ambos espectros IR.

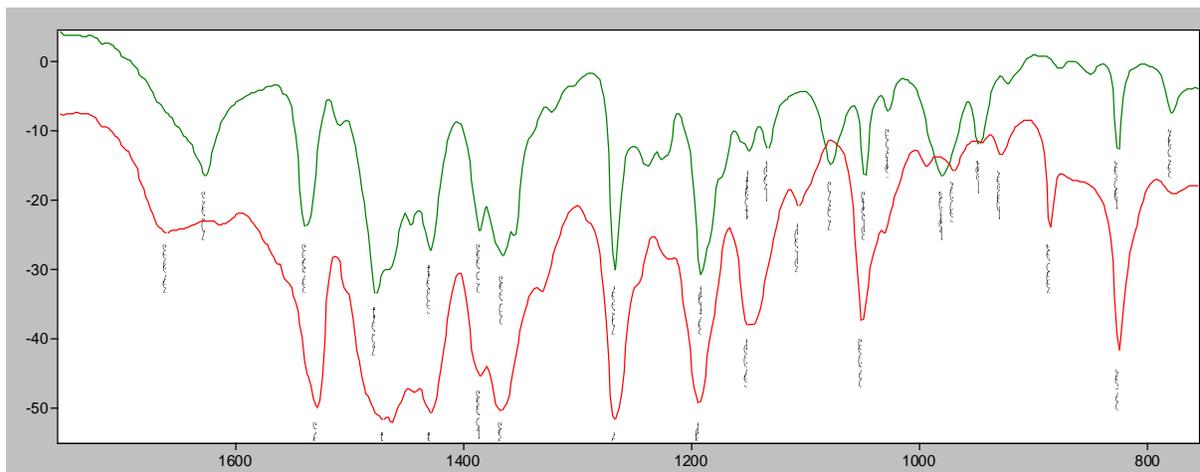


Fig. 49. Superposición de la región entre 800-1700 cm^{-1} de los espectros IR de L2 (verde) y L3 (rojo). Las bandas en el entorno de 1050 y 1150 cm^{-1} confirman la presencia del grupo ditiocarbamato.

La banda de absorción característica del enlace C-S en el agrupamiento S-CS-N suele aparecer en el entorno de 1050 cm^{-1} . A su vez, la banda de absorción del enlace C-N, para el mismo agrupamiento, puede aparecer en el rango 1000-1400 cm^{-1} . En la figura 49 se observa que en el espectro de L3 aparecen dos bandas de absorción a 1050.22 y 1150.76 cm^{-1} que no se aprecian en el espectro de L2. Estas bandas pueden ser adjudicadas, por lo tanto, a la presencia del grupo ditiocarbamato en la molécula.

5.1.3 - Síntesis del ácido 10-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilaminocarbonilmetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L4)

Para el caso de galio, se han propuesto una gran variedad de grupos quelantes tanto de cadena abierta como macrociclos. En su gran mayoría se trata de compuestos hexadentados debido a que la química del galio en solución acuosa se reduce al estado de oxidación III, metal que contiene 6 posiciones de coordinación.

Los quelantes macrocíclicos, en particular los ligandos tri- y tetra-aza, muestran una elevada selectividad (conformacional y de tamaño) hacia muchos iones metálicos. La estabilidad termodinámica de estos ligandos se debe a que el pequeño catión, en este caso, galio, se aloja adecuadamente en la cavidad cíclica, quedando éste aislado de especies competitivas. Esto se comprueba al observar las constantes de disociación típicas de los complejos macrocíclicos con el Ga(III), que presentan valores 10^5 - 10^7 veces mayores que aquellos de cadena abierta. Es por esta razón que se ha seleccionado el DOTA como agente bifuncional para coordinar al ^{68}Ga (figura 50).

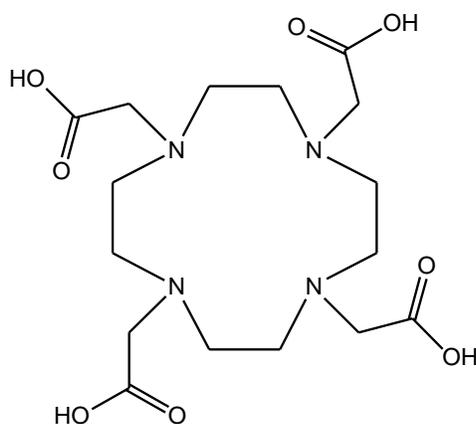


Fig. 50. Estructura química del agente bifuncional DOTA.

La molécula contiene grupos ácidos carboxílicos, por lo que la estrategia empleada para acoplarlo al ligando nitroimidazólico es mediante la formación de un enlace amida. Para ello, se contó con un derivado de metronidazol disponible en nuestro grupo de investigación, sintetizado en el marco de la tesis doctoral del Dr. Javier Giglio (78), que contiene una amina primaria en lugar del grupo hidroxilo, como se muestra en la figura 51.

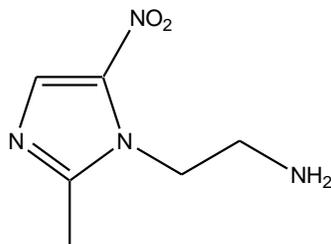


Fig. 51. Estructura del derivado de metronidazol con grupo amina.

La formación del enlace amida ocurre por ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina sobre un grupo acilo activado. Una de las estrategias más empleadas para la síntesis de este reactivo es por activación *in situ* del ácido carboxílico mediante el empleo de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de *N*-hidroxisuccinimida (NHS).

La DCC genera una *O*-acilisourea altamente reactiva capaz de ser atacada nucleofílicamente. Este ataque puede ser directamente por la amina, sin embargo, este procedimiento puede traer como inconveniente la formación de *N*-acilurea como producto secundario no deseado (figura 52).

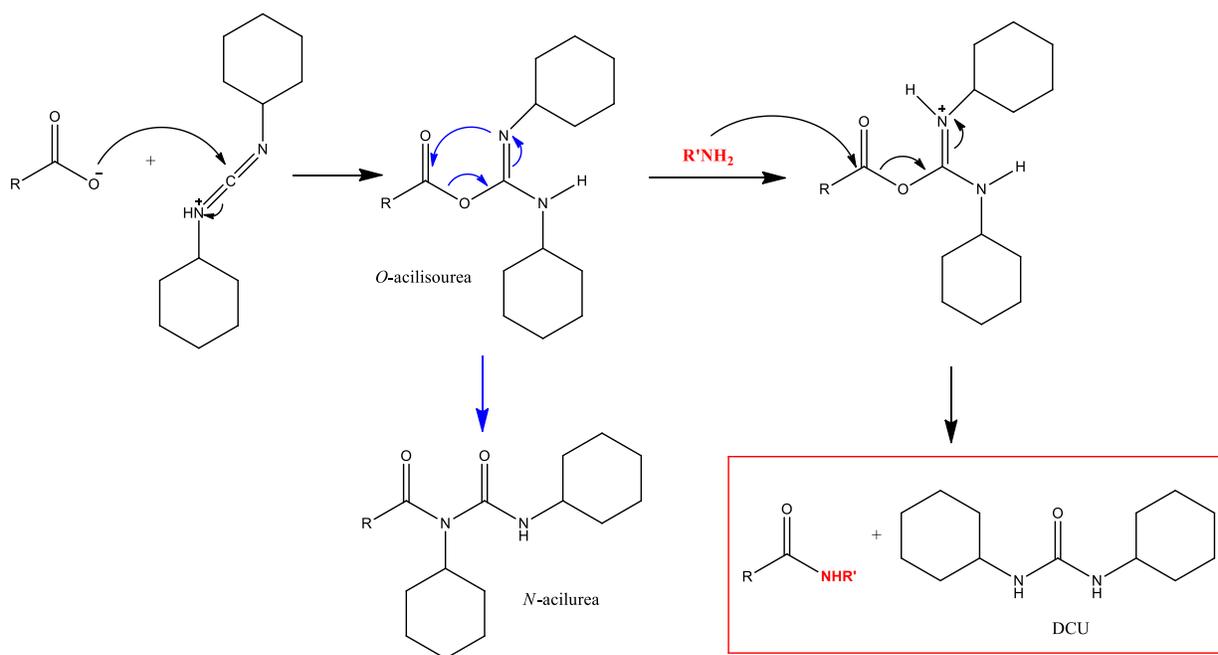


Fig. 52. Formación de amidas con agente de acoplamiento DCC.

Por esta razón, se utilizan nucleófilos que compitan con el rearreglo de la *O*-acilisourea y que permitan la formación de un intermedio lo suficientemente reactivo frente al agregado de la amina. Uno de ellos es la NHS, que se muestra en la figura 53.

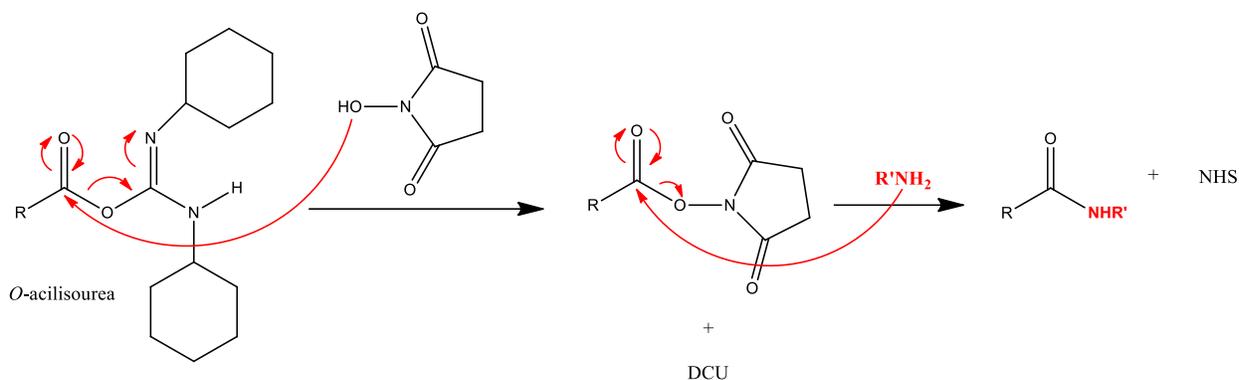


Fig. 53. Formación de amidas con los agentes de acoplamiento DCC y NHS.

Sin embargo, esta reacción no evolucionó adecuadamente ya que se obtuvieron en todos los casos productos polisustituidos de difícil purificación. En la figura 54 se muestra la ruta de síntesis propuesta y en la tabla 3 se indican las condiciones ensayadas. En todos los casos, los reactivos utilizados fueron DOTA, DCC, NHS y la amina (que se agrega en una segunda etapa). La solución de DCC fue agregada gota a gota manteniendo la reacción en baño de hielo y las relaciones molares se mantuvieron en todos los casos en 1.

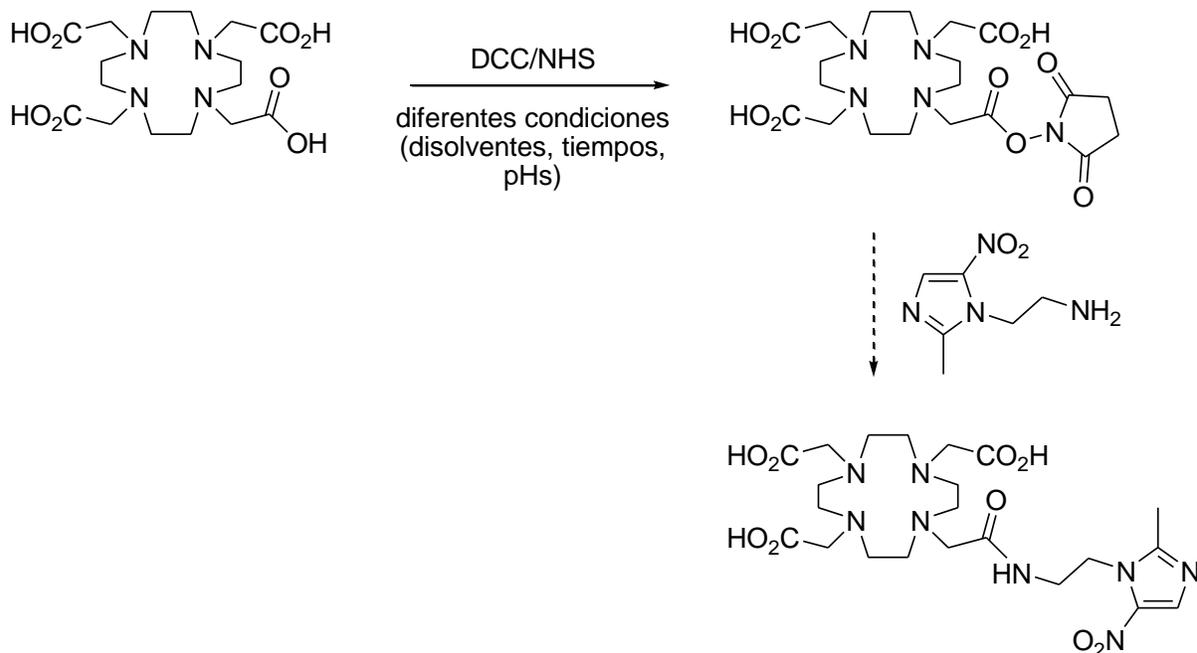


Fig. 54. Ruta de síntesis propuesta para L4.

Reactivos	Disolvente	Ajuste de pH	Temperatura y tiempos de reacción	Observaciones y Resultados
DOTA, DCC, NHS, Amina	THF	-	20°C. A los 6 días de reacción, se agregó la amina y luego, se dejó 24 horas más	Se purificó por cromatografía en columna. Resultados: Productos polisustituídos
	THF	Se agregó trietilamina	20°C. A las 24 horas de reacción, se agregó la amina y luego, se dejó 4 días más	Resultados: Productos polisustituídos
	H ₂ O	Se agregó trietilamina	20°C. A las 24 horas de reacción, se agregó la amina y luego, se dejó 5 días más	Se purificó por cromatografía en columna. Resultados: Productos polisustituídos
	CH ₂ Cl ₂ /DMF	-	20°C. A las 24 horas de reacción, se agregó la amina y luego, se dejó 4 días más	Resultados: Productos polisustituídos
	CH ₂ Cl ₂ /DMF	-	20°C. A las 24 horas de reacción, se agregó la amina y luego, se dejó 4 días más	Se purificó por cromatografía en columna. Resultados: Productos polisustituídos

Tabla 3. Condiciones ensayadas para la activación y derivatización del DOTA.

Debido a esto, la conjugación del farmacóforo a la unidad quelante se ha llevado a cabo a través del uso de reactivos derivados de la molécula de DOTA, mostrados en la figura 55.

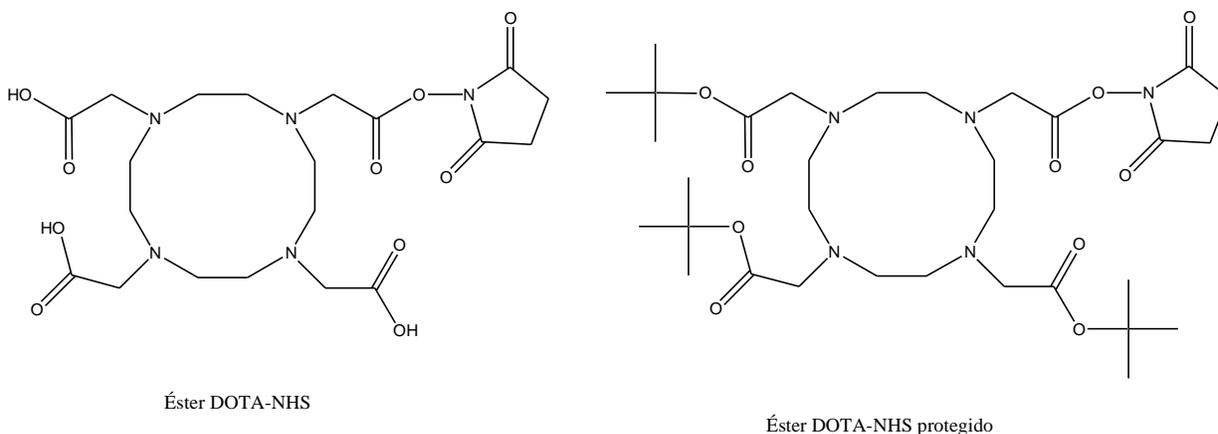


Fig. 55. Derivados de DOTA.

Se trata de dos reactivos disponibles comercialmente en los que uno de los cuatro grupos ácidos se encuentra ya activado con una unidad de NHS. Dichos reactivos ya

son susceptibles de ser atacados por un nucleófilo como la amina para formar el enlace amida. La diferencia entre ambos reactivos es que uno de ellos posee el resto de las funciones ácidas protegidas con grupos *tert*-butilos.

La mayor dificultad que se ha presentado en las reacciones con el éster DOTA-NHS (figura 55) ha sido su baja solubilidad en disolventes orgánicos, como el diclorometano. Los grupos amina y ácidos carboxílicos en la molécula hacen que el reactivo se disuelva muy bien en agua pero no así en disolventes orgánicos, lo contrario de lo que ocurre con las aminas derivadas del metronidazol, cuya solubilidad en la fase acuosa es limitada, en especial cuando el grupo amino se encuentra mayoritariamente en su forma neutra, única forma capaz de realizar el ataque nucleofílico durante el acoplamiento con el DOTA.

En este sentido, el éster DOTA-NHS protegido (figura 55), con sus grupos ácidos carboxílicos protegidos bajo la forma de grupos ésteres *tert*-butilicos, ofrece la ventaja de ser soluble en diclorometano, al igual que las aminas reactivos. Así, el acoplamiento de este compuesto con la amina primaria derivada del metronidazol se ha llevado a cabo en diclorometano bajo agitación continua a 25°C durante 48 horas, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento de 45% luego de una purificación en columna de alúmina y un gradiente de diclorometano-metanol como fase móvil. La reacción se esquematiza en la figura 56.

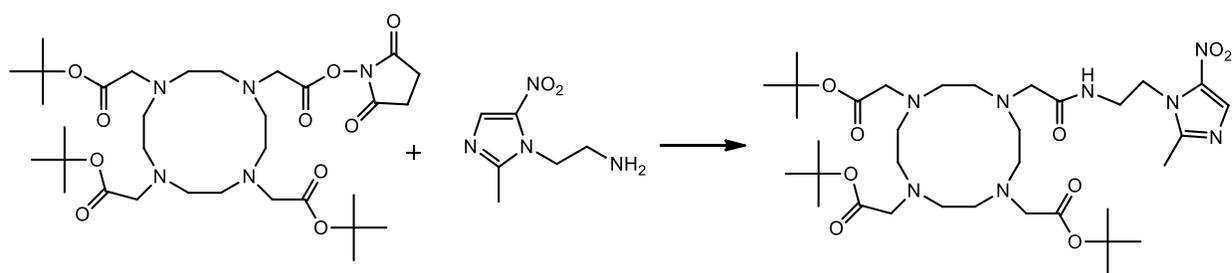


Fig. 56. Primera etapa de la síntesis de L4.

La espectroscopía de ^1H -RMN para este compuesto confirma su identidad, aunque no ha sido posible asignar cada una de las señales a los diferentes grupos de protones, debido a que las múltiples conformaciones de la molécula generan señales poco definidas, anchas. De todas maneras, se verifica la formación del producto debido al

corrimiento de las señales de los protones metilénicos de la amina de partida (comparando con el espectro ^1H -RMN realizado por el Dr. Javier Giglio bajo las mismas condiciones y disolvente) y por la presencia a 6.80 ppm de un triplete correspondiente al protón del grupo amida formado.

Dado que en la formación del complejo entre el DOTA y el ^{68}Ga están implicados, además de los átomos de nitrógeno del anillo, dos de los grupos ácidos carboxílicos, es preciso realizar la desprotección del compuesto antes de la marcación (figura 57).

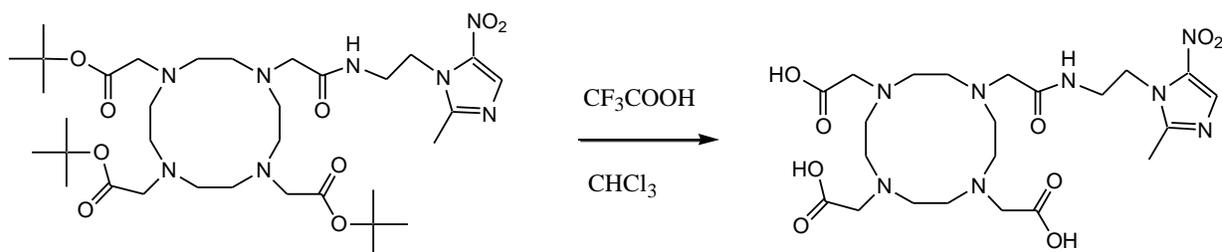


Fig. 57. Segunda etapa de la síntesis de L4.

Para ello, el producto de la reacción anterior se hizo reaccionar con un exceso de ácido trifluoroacético en cloroformo. Esta desprotección es realizada inmediatamente antes de la marcación del ligando, a fin de garantizar la integridad del mismo. La espectroscopía de ^1H -RMN mostró que los grupos *tert*-butilos fueron removidos en este proceso.

5.1.4 – Síntesis del ácido 10- $\{[N$ -metil-1-[1-(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metilaminocarbonilmetil}-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (L5)

Este ligando, al igual que L4, contiene una unidad de DOTA como agente quelante para la coordinación del ^{68}Ga . La conjugación al farmacóforo nitroimidazol también se logró mediante la formación de un grupo amina. Para esto, se utilizaron como reactivos de partida el éster DOTA-NHS (figura 55) y L2, que contiene una amina secundaria a través de la cual se da la unión (figura 58).

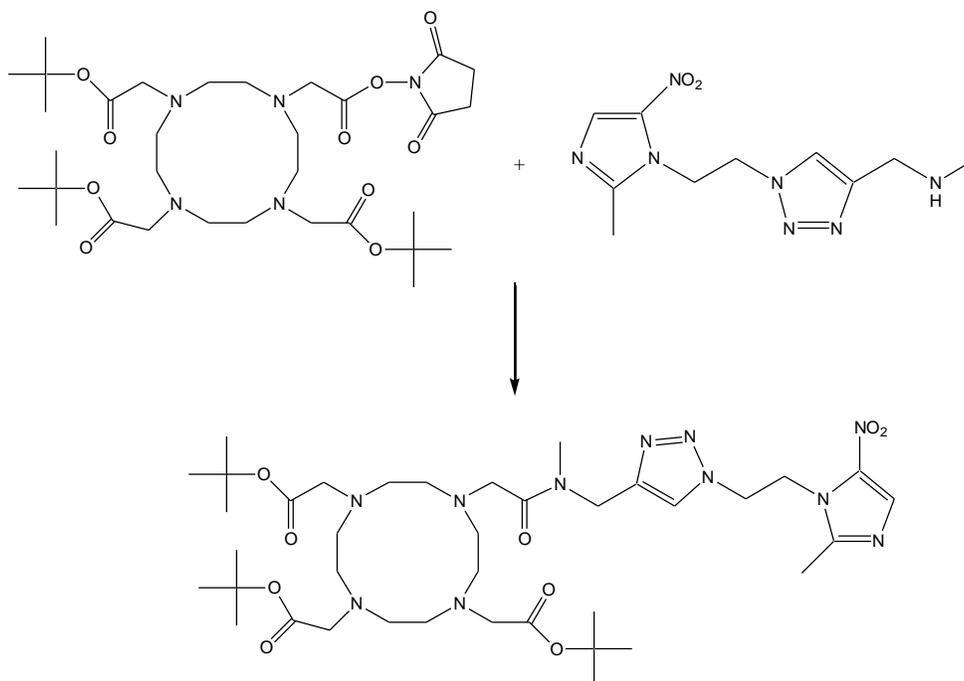


Fig. 58. Primera etapa de la síntesis de L5.

Esta reacción ocurre a temperatura ambiente en diclorometano, y se obtiene el producto deseado con un rendimiento de 50% siguiendo la técnica descrita anteriormente.

La caracterización estructural del producto fue realizada mediante ^1H -RMN obteniéndose, al igual que para el ligando anterior, un espectro con señales anchas correspondientes a los protones metilénicos del macrociclo y que se superponen con los singuletes de los protones metílicos o metilénicos de la porción imidazólica que fue conjugada. Estas señales anchas que se observan están probablemente vinculadas a la presencia de numerosas conformaciones del macrociclo en solución. Sin embargo, este espectro posee otra particularidad. En la región de protones aromáticos se observa, como lo muestra la figura 59, que las señales correspondientes a los protones del triazol y del imidazol aparecen como varios singuletes en la región 7.90-8.25 ppm.

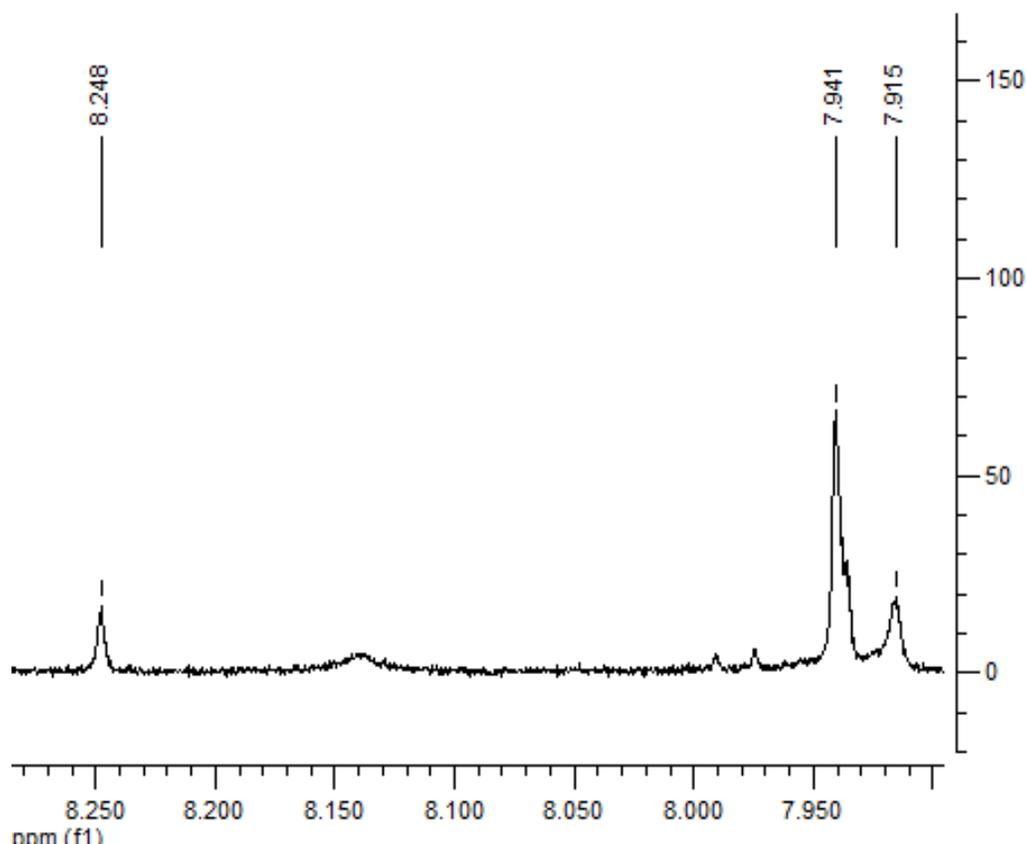


Fig. 59. Espectro ^1H -RMN de L5. Ampliación de la región de protones aromáticos. Estas señales se corresponden a los protones imidazólico y triazólico de las distintas conformaciones.

Si se hubiera comprobado la presencia de los dos regioisómeros posibles de L2, este fenómeno podría estar asociado a la reacción del DOTA tanto con el triazol 1,4-disustituido como con el 1,5-disustituido. En ese sentido, el entorno del protón del triazol se vería sensiblemente modificado entre un caso y otro y, por lo tanto, las señales en el espectro serían diferentes para ambos isómeros. Sin embargo, los experimentos presentados anteriormente en la discusión permiten afirmar que el derivado 1,5-disustituido no se formó durante la reacción catalizada por Cu^+ . De hecho, si esto fuera real, se podría haber esperado un patrón similar en el ^1H -RMN del propio L2, aunque también es cierto que tal vez, la conjugación con DOTA sea el factor que aporte ese entorno significativamente diferente para ambos isómeros que haga que se manifieste en este espectro.

Debido a ello, se decidió evaluar si este hecho se podía explicar por la presencia de diferentes conformaciones de la molécula, el mismo motivo por el cual se atribuye las

señales anchas de los espectros tanto de L4 como L5. Para ello, se llevó a cabo el mismo espectro ^1H -RMN a baja temperatura, a fin de minimizar el equilibrio conformacional, que permite analizar cada conformación. La figura 60 muestra la misma región del espectro que la figura anterior, pero realizado a -10°C .

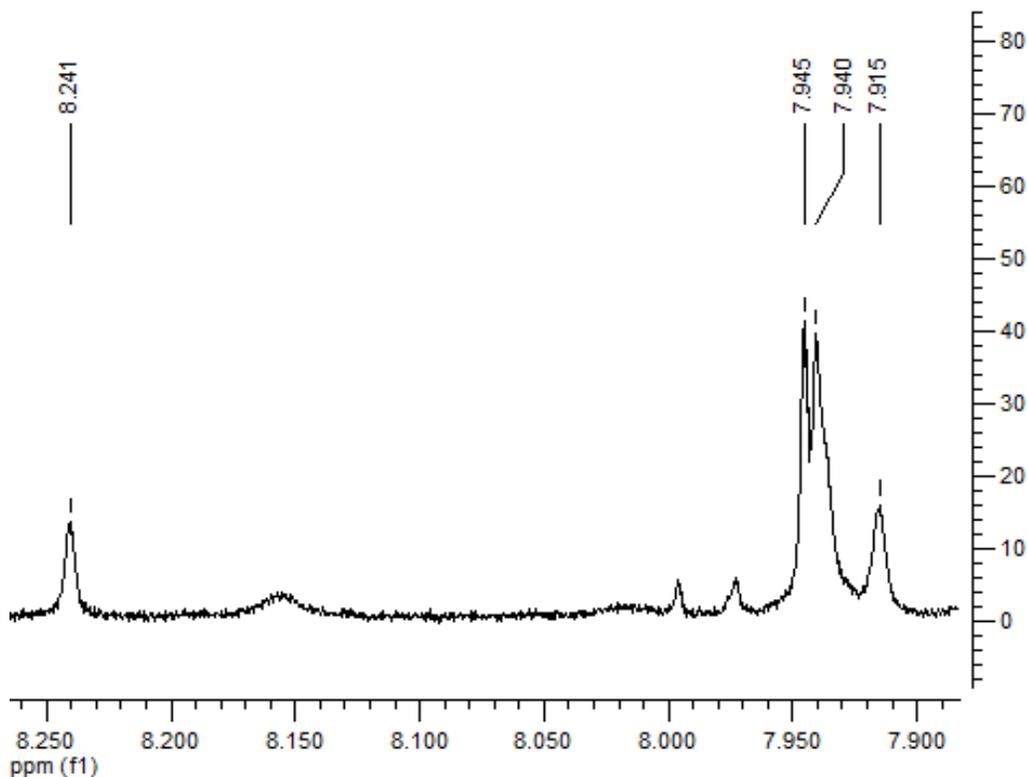


Fig. 60. Espectro ^1H -RMN de L5, realizado a -10°C .

Como se puede observar, señales envolventes, al bajar la temperatura comienzan a definirse en nuevos singuletes, lo que indica que a esta temperatura, las diferentes conformaciones se definen mejor ya que disminuye la velocidad de intercambio entre las distintas especies. Por lo tanto, y a modo de conclusión, se puede decir que L5 posee un equilibrio conformacional responsable de las particularidades mencionadas en su espectro.

La desprotección de los grupos ácidos carboxílicos fue realizada de la misma manera que para L4 inmediatamente antes de la marcación con ^{68}Ga , a fin de garantizar la integridad del mismo (figura 60). Al igual que en el caso anterior, la espectroscopía de ^1H -RMN mostró que los grupos *tert*-butilos fueron removidos en este proceso.

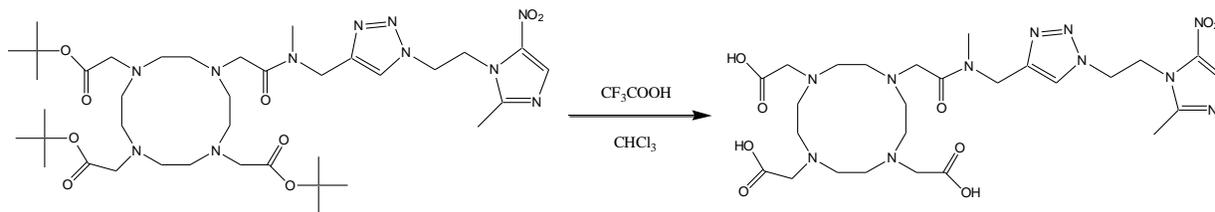


Fig. 60. Segunda etapa de la síntesis de L5.

5.2 - Síntesis de los complejos de ^{99m}Tc

5.2.1 – Síntesis del precursor tricarbónico $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

La primera etapa en la síntesis de los complejos tricarbónicos de ^{99m}Tc consiste en la preparación del acuo-complejo conteniendo el core tricarbónico con el metal en el estado de oxidación +1, el $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Éste se utiliza como complejo precursor o complejo intermedio dado que las tres moléculas de agua coordinan al metal a través de enlaces lábiles, lo cual permite una sencilla sustitución por ligandos que contengan grupos adecuados para coordinar al metal en ese estado de oxidación. La síntesis de este precursor puede realizarse de dos maneras diferentes. Una de ellas parte de monóxido de carbono gaseoso en presencia de un reductor, borohidruro de sodio, en un medio de reacción fuertemente alcalino dado por tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio. La segunda posibilidad emplea un kit comercial que contiene boranocarbonato de sodio que actúa como dador de CO *in situ* y como reductor al mismo tiempo. El contenido liofilizado del kit también contiene carbonato de sodio para generar el medio alcalino. Ambas alternativas se basan en el mismo principio, únicamente se modifica el reductor y la fuente de CO y han resultado de gran utilidad ya que son capaces de dar una reacción cuantitativa a presión atmosférica, a diferencia del procedimiento tradicional de preparación de estos complejos que requiere altas presiones y altas temperaturas. Por el contrario, en estos casos, la reacción ocurre a presión atmosférica y a temperaturas entre 75 y 100 °C,

debido a la baja concentración del metal y la alta afinidad del centro metálico para capturar tres moléculas de monóxido de carbono como forma de estabilizar el estado de oxidación +1.

Una vez sintetizado dicho precursor, la pureza radioquímica es controlada a través de un sistema de HPLC de fase reversa. El perfil de elución obtenido es el que se muestra en la figura 61.

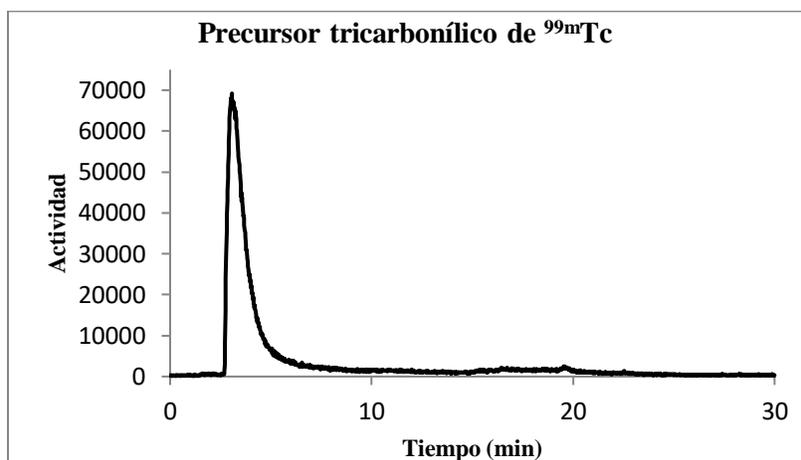


Fig. 61. Perfil cromatográfico (HPLC) del precursor tricarbónico $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

A partir del cromatograma de la figura 61, se puede concluir que la reacción ocurre en forma cuantitativa, ya que se obtiene un único pico de pureza radioquímica mayor a 90% con un tiempo de retención de 4 minutos (78), correspondiente al acuo-complejo tricarbónico. El análisis evidencia la ausencia de pertechnetato (potencial impureza, reactivo de partida) el cual tiene un tiempo de retención de 12 minutos en idénticas condiciones cromatográficas.

5.2.2 - Síntesis del complejo tricarbónico con L1

El ligando L1 contiene en su estructura un grupo ditiocarbamato. Este grupo ha sido introducido al metronidazol por síntesis química en el marco de la tesis doctoral del Dr. Javier Giglio (78) con el fin de coordinar el tecnecio mediante la formación de nitrido-complejos de Tc(V). En este caso, se aprovecha el mismo ligando para la formación

del complejo tricarbónico, como una nueva estrategia de marcación. Los grupos donores de electrones son dos azufres.. Por ello, la estructura propuesta contiene a L1 actuando como ligando bidentado, sustituyendo dos moléculas de agua del precursor, como se muestra en la figura 62.

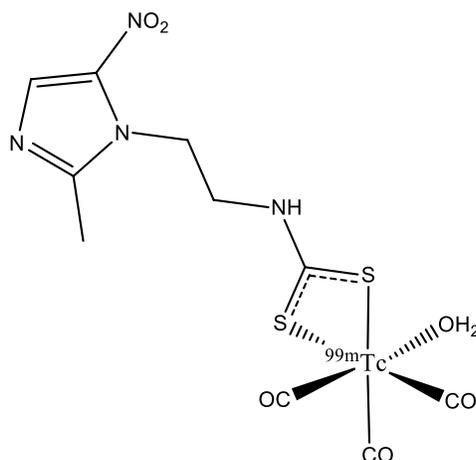


Fig. 62. Estructura propuesta para el complejo tricarbónico con L1.

La sustitución del precursor con este ligando da lugar a una especie con una pureza radioquímica mayor al 80%. En los casos en los que su pureza resultó entre 80 y 90%, se realizó la purificación de la misma mediante extracción del pico cromatográfico obtenido por HPLC. La figura 63 muestra un cromatograma del complejo obtenido.

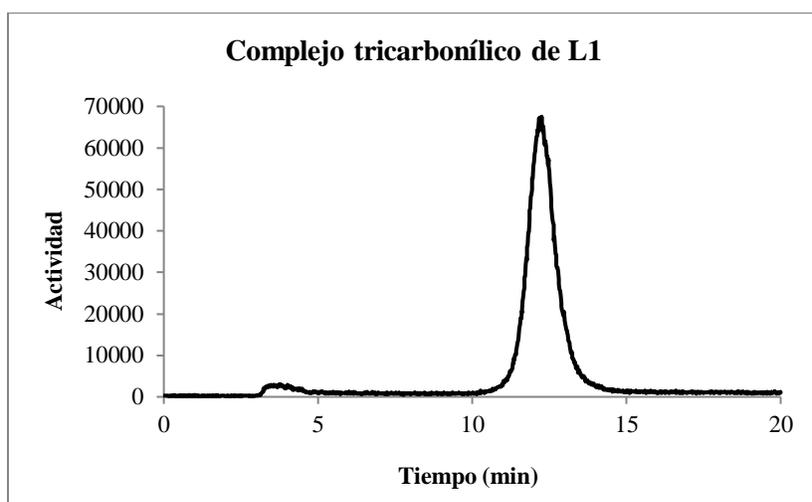


Fig. 63. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo tricarbónico de L1.

5.2.3 - Síntesis del complejo tricarbónico con L2

El ligando L2 contiene en su estructura como grupos donores de electrones para la coordinación a un nitrógeno del grupo 1,2,3-triazol y el nitrógeno de la amina secundaria. La estructura propuesta para este caso involucra a L2 actuando como ligando bidentado, y se muestra en la figura 64.

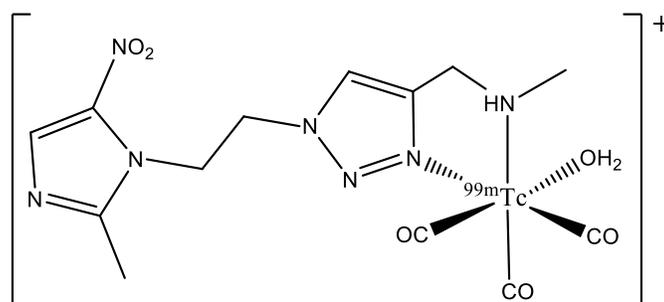


Fig. 64. Estructura propuesta para el complejo tricarbónico con L2.

La sustitución del precursor con este ligando da lugar a dos especies mayoritarias, con tiempos de retención de 15 y 16 minutos en el sistema de HPLC descrito previamente. Entre ambas especies, la pureza radioquímica alcanzó en todos los casos valores por encima del 90%, siendo la de mayor tiempo de retención la que se forma en mayor proporción, con una relación aproximada de 2,5:1. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 65.

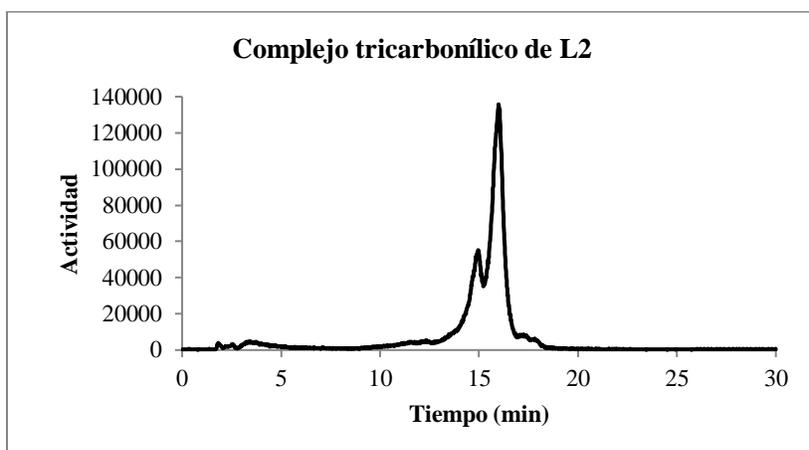


Fig. 65. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo tricarbónico de L2.

Cuando se purifica la especie mayoritaria ($t_R=16$ min) por aislamiento del pico cromatográfico de HPLC, los controles de estabilidad en el tiempo demuestran la aparición nuevamente de la especie minoritaria, $t_R = 15$ min. Esto se muestra en la figura 66.

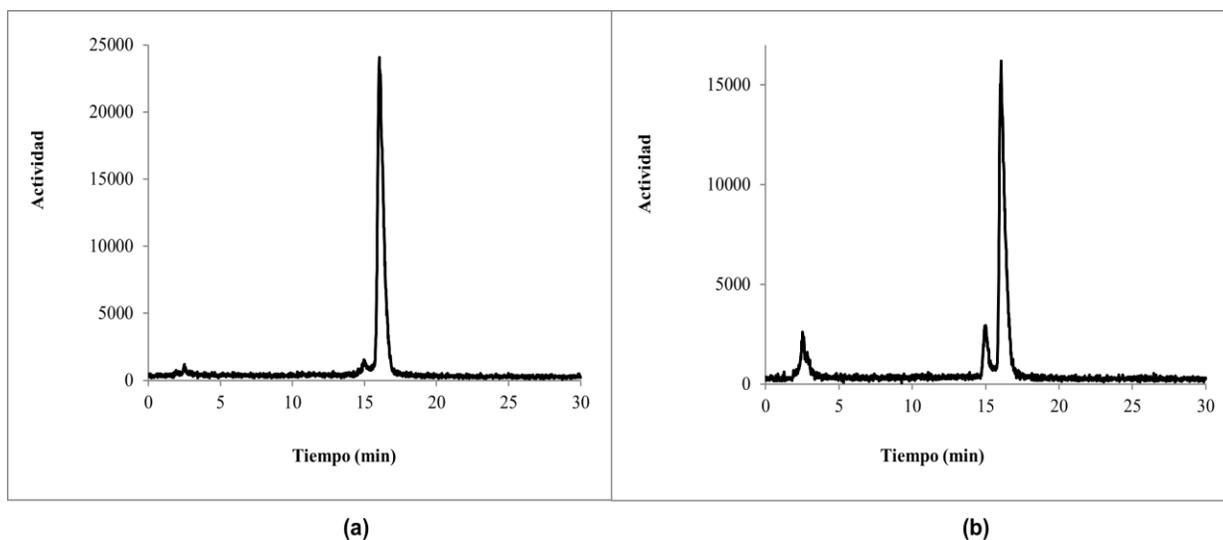


Fig. 66. (a) Perfil cromatográfico de la especie mayoritaria luego de su purificación mediante HPLC. **(b)** Perfil cromatográfico de la especie mayoritaria purificada, 4 horas post-purificación. Se puede observar la aparición de la segunda especie minoritaria.

Estos resultados indican que la especie mayoritaria se interconvierte en la especie minoritaria, y éstas podrían corresponder a diferentes maneras de coordinación del ligando. Por lo tanto, toda la caracterización fisicoquímica y biológica del complejo se ha realizado tomando el total de la actividad, sin purificar.

En el cromatograma de la figura 66b se puede observar también la aparición de una especie con menor tiempo de retención, correspondiente al complejo precursor ($fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$). Durante la reacción de marcación, el ligando siempre se encuentra en exceso frente al radiometal que, en este caso, está bajo la forma de precursor tricarbónílico. Cuando se realiza la purificación del complejo obtenido mediante extracción del pico cromatográfico, se consigue separar la especie radiomarcada deseada del resto de las especies (marcadas o no) con tiempos de retención diferentes. Esto implica la separación también del ligando en exceso que no

se encuentra formando parte del complejo, ya que posee un tiempo de retención diferente (7.2 minutos, determinado mediante UV). Por lo tanto, la aparición de precursor tricarbónico puede explicarse por el hecho de que una vez purificado el complejo, ya no se tiene exceso de ligando, y las moléculas de agua del disolvente logran desplazar parte del ligando que estaba formando la esfera de coordinación.

5.2.4 - Síntesis del complejo tricarbónico con L3

En este caso se trata de otro agrupamiento ditiocarbamato como coordinante, por lo que al igual que para los complejos anteriores, la estructura propuesta involucra a L3 actuando como ligando bidentado a través del grupo ditiocarbamato, aunque se sabe que en la estructura del ligando existen otros grupos donores de electrones capaces de coordinar al metal (figura 67).

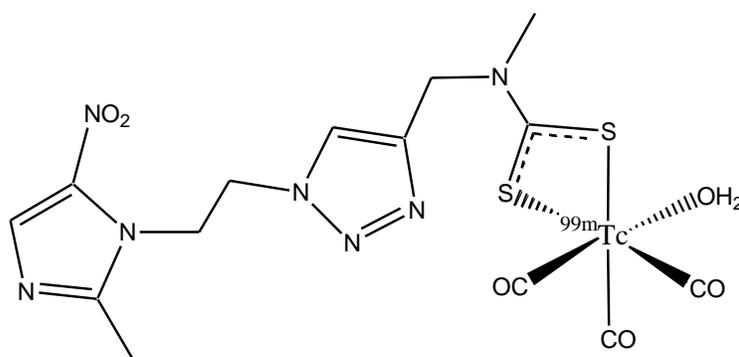


Fig. 67. Estructura propuesta para el complejo $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbónico con L3.

La sustitución del precursor con este ligando da lugar a dos especies mayoritarias, con tiempos de retención de 21 y 22 minutos en el sistema de HPLC descrito previamente. Entre ambas especies, la pureza radioquímica alcanzó en todos los casos valores por encima del 90%, siendo la de menor tiempo de retención la que se forma en mayor proporción. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 68.

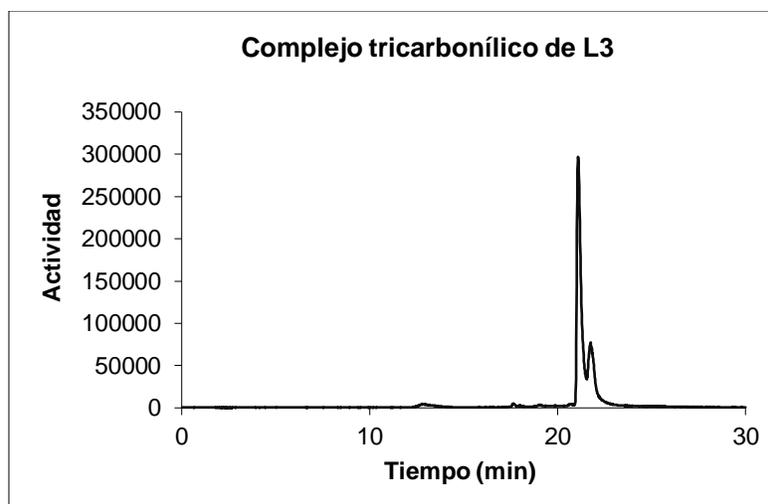


Fig. 68. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo tricarbonílico de L3.

Al igual que para el complejo anterior, la especie minoritaria es generada a partir de la especie mayoritaria, hecho que se ha puesto de manifiesto al intentar separarlas mediante extracción del pico por HPLC. Por lo tanto, la caracterización fisicoquímica y biológica se ha llevado a cabo con ambos picos.

5.3 - Síntesis de los complejos de ^{68}Ga

5.3.1 - Síntesis del complejo con L4

Como ya fue discutido anteriormente, el DOTA es uno de los agentes bifuncionales más utilizados para la marcación con galio, y las marcaciones con este tipo de agentes macrocíclicos en general involucran procesos de calentamiento, como en este caso, 15 minutos a 95 °C. Otro factor importante a la hora de la marcación es el ajuste de pH.

El índice de coordinación para el galio es 6, por lo que el DOTA forma el complejo de coordinación a través de los cuatro átomos de nitrógeno del macrociclo y dos de sus grupos carboxilatos libres. La estructura propuesta para el complejo se muestra en la figura 67.

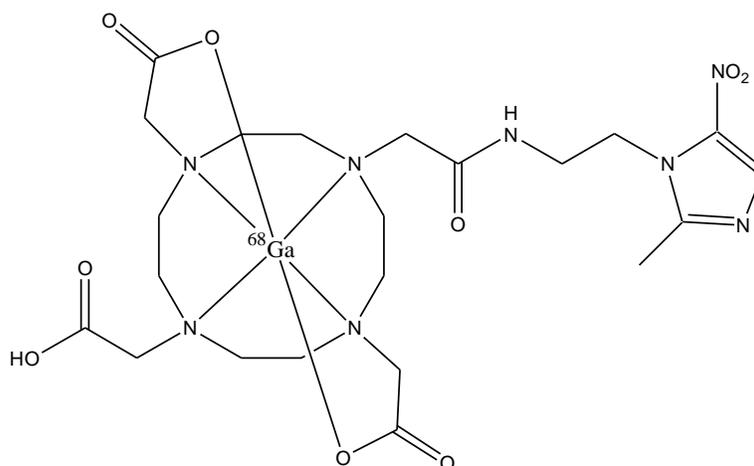


Fig. 67. Estructura propuesta para el complejo con L4.

Luego de la marcación, la pureza radioquímica del complejo fue evaluada mediante HPLC, obteniéndose una única especie con tiempo de retención de 10.1 minutos con una pureza mayor a 90% en todas las oportunidades. En la figura 68 se muestra el perfil cromatográfico del producto obtenido y del reactivo de partida: $^{68}\text{GaCl}_3$.

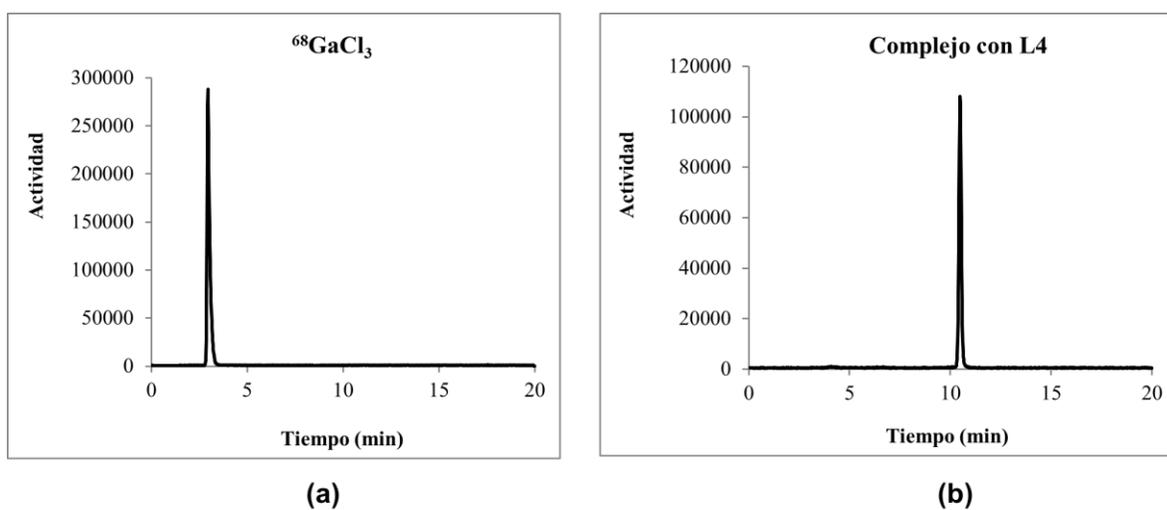


Fig. 68. (a) Perfil cromatográfico (HPLC) para el reactivo de partida, tricloruro de galio. (b) Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo de Ga(III) con L4.

5.3.2 - Síntesis del complejo con L5

Al igual que para el complejo anterior, la reacción de marcación de este ligando requiere un período de calentamiento a 95°C con pH controlado.

La estructura propuesta para el complejo formado se muestra en la figura 69.

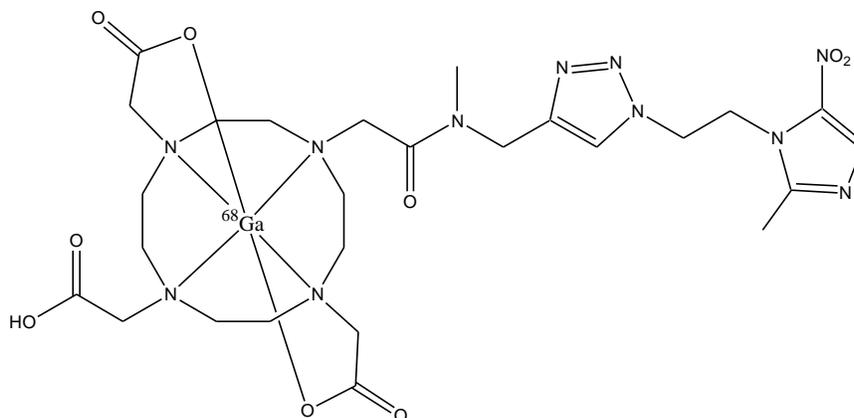


Fig. 69. Estructura propuesta para el compuesto con L5.

Una vez finalizada la reacción de marcación, se realizó el control por HPLC, donde se observó la formación de una única especie con un tiempo de retención de 10.8 minutos y pureza radioquímica mayor a 90% en todos los casos (figura 70).

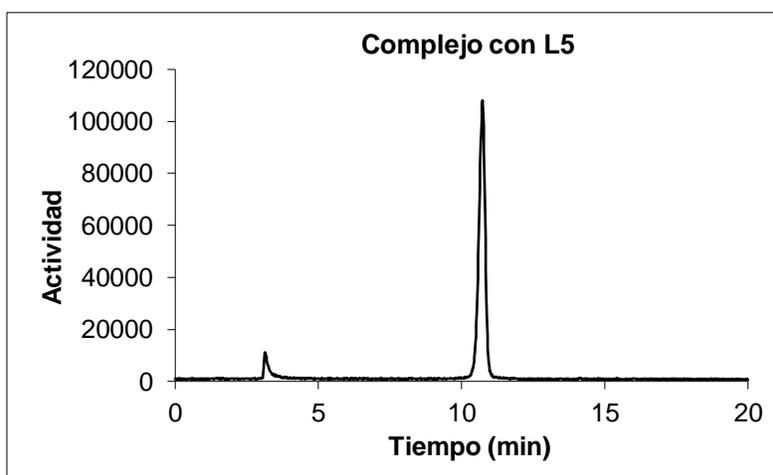


Fig. 70. Perfil cromatográfico (HPLC) para el complejo formado con L5.

5.4 - Caracterización fisicoquímica de los complejos

5.4.1 – Lipofilicidad

La lipofilicidad se expresa como el coeficiente de partición del complejo entre un buffer fosfato 0.1 M pH = 7.4 y octanol. En la tabla 4 figuran los valores de logP obtenidos para los cinco complejos preparados que serán denominados a partir de ahora C1 a C5, siendo C1, C2 y C3 los complejos ^{99m}Tc(I)-tricarbonílicos con L1, L2 y L3, respectivamente. C4 y C5 corresponden a los complejos de ⁶⁸Ga con L4 y L5, también respectivamente.

Tabla 4. Lipofilicidad

Complejo	logP (n=3)
C1	-0.16 ± 0.06
C2	-0.82 ± 0.02
C3	1.47 ± 0.11
C4	-1.65 ± 0.05
C5	-3.30 ± 0.10

La lipofilicidad es un parámetro muy importante en un fármaco ya que la misma es el resultado de la interacción de los diferentes átomos con el medio y condiciona muchos parámetros de interés biológico. Estos complejos de coordinación no poseen un transportador que les posibilite atravesar la membrana celular, por lo que su llegada al citoplasma es mediante la difusión pasiva a través de la membrana. Para ello, el complejo debe tener una lipofilia adecuada de modo de favorecer ese pasaje, el cual está determinado por la ley de Fick:

$$dQ/dt = -D.A.K/h (C_i - C_e)$$

en donde la cantidad del complejo que atraviesa la membrana depende de factores como el coeficiente de partición octanol/buffer (K), la difusión (D), el área (A), el espesor de la membrana (h) y las concentraciones hacia ambos lados de la misma (C_i: interior, C_e: exterior).

No es aconsejable que la lipofilia de un complejo sea excesivamente alta, porque en ese caso tendría una baja eliminación renal y una alta eliminación hepatobiliar.

Además, presentará una lenta depuración de los tejidos no blanco. En general, los valores de logP entre -0.5 y 2 a pH = 7.4 se consideran óptimos para un buen pasaje a través de una membrana biológica (104).

Los resultados obtenidos para los complejos evaluados son consecuentes con lo esperado de acuerdo a las estructuras propuestas para ellos. La baja lipofilia de C2 concuerda con el hecho de tratarse de un complejo cargado positivamente, mientras que la elevada lipofilia de C3 correlaciona adecuadamente con la característica de ser un complejo neutro. El complejo C1 resultó ser levemente hidrofílico. Si bien la estructura propuesta es neutra y una lipofilia mayor podría esperarse, el resultado obtenido es un valor intermedio y razonable. Evidentemente, la diferencia estructural entre ambos complejos, que radica en la presencia del 1,2,3-triazol en C3, incide en la lipofilia. Por otro lado, los complejos de ^{68}Ga , C4 y C5 presentan elevada hidrofiliadad, lo cual también es esperable teniendo en cuenta que se trata de una característica común a muchos complejos con DOTA por contar con un agrupamiento ácido carboxílico, ionizable al pH de estudio, que incide en esta propiedad fisicoquímica. Es razonable por lo tanto, esperar que los estudios biológicos de los complejos de ^{68}Ga muestren una elevada eliminación renal, así como una alta depuración de los tejidos. Si bien los valores de lipofilia obtenidos podrían predecir que dichos complejos no atravesarán adecuadamente las membranas biológicas, dicho parámetro no es el único que está involucrado en el proceso y se debe tener presente que su influencia deberá determinarse con los datos biológicos.

La correlación de la lipofilia de los compuestos con el comportamiento biológico se discute más adelante.

5.4.2 – Unión a proteínas plasmáticas

La determinación de la unión a proteínas plasmáticas (UPP) se realizó mediante el método de exclusión molecular por tratarse de un procedimiento rápido y reproducible. En general, es deseable que los valores de UPP sean bajos, debido a que únicamente la fracción libre del complejo será capaz de atravesar las membranas celulares (103). Además, la UPP es uno de los factores determinantes en la depuración sanguínea,

siendo ésta generalmente más lenta para aquellos compuestos que presentan elevadas UPP. Esto significa que si el complejo presenta un valor elevado de UPP, en general, no se encontrará disponible para permear hacia las células y tendrá una lenta depuración sanguínea. Para los complejos sintetizados, los resultados de UPP se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Unión a proteínas plasmáticas

Complejo	% UPP (n=6)
C1	83.8 ± 1.1
C2	51.5 ± 0.9
C3	67.1 ± 2.1
C4	2.3 ± 0.1
C5	4.1 ± 0.2

Claramente, los complejos de ^{99m}Tc poseen una elevada unión a proteínas, siendo la mayor para C1.

Es importante considerar que la UPP puede originarse por dos fenómenos. Uno de ellos sucede cuando el complejo simplemente presenta una elevada afinidad por las proteínas plasmáticas, así como lo presentan el resto de los fármacos. El otro fenómeno implica que esta UPP esté dada por una baja estabilidad del complejo, lo cual lleva a una transquelación del metal. Esto significa que el ligando es desplazado por grupos donores de electrones de las proteínas. Como consecuencia, el radionucleido queda unido a ellas y el complejo se descompone.

Si bien existen varios ejemplos en la bibliografía en los que se destacan complejos estables de $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbonílicos con ligandos bidentados, también está citado que en algunos casos pueden ser inestables debido a la permanencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación. Dado que ésta continúa siendo un ligando lábil para el metal, la elevada UPP podría deberse a su desplazamiento por grupos donores presentes en las proteínas, como por ejemplo, histidina (excelente ligando para complejos tricarbonílicos) y cisteína. Esta es la principal desventaja que presenta el uso de ligandos bidentados en algunos casos y es lo que explicaría los resultados obtenidos de UPP.

En cuanto a los complejos C4 y C5, el valor de UPP resultó ser muy bajo, lo cual confirma la elevada estabilidad del complejo con DOTA.

5.4.3 – Estabilidad en el medio de reacción

La estabilidad de los complejos en el medio de reacción fue evaluada hasta 4 horas post-marcación, resultando ser mayor a 90% en todos los casos.

5.4.4 – Estabilidad en plasma

El ensayo se realiza a fin de predecir la estabilidad de los complejos frente a un medio fuertemente competitivo como el biológico. El método implica la incubación de la muestra con un pool de plasma humano a 37 °C y el control de la pureza radioquímica a diferentes tiempos utilizando el sistema de HPLC asociado a cada complejo. Para esto, es necesario precipitar las proteínas plasmáticas y por lo tanto, solamente se determina la estabilidad de la fracción libre del complejo.

Salvo para C2, todos los complejos resultaron ser 100% estables en plasma en el período evaluado. En el caso de C2, la estabilidad fue menor, siendo de un 85% luego de las 2 horas post-marcación.

5.5 – Caracterización biológica de los complejos de ^{99m}Tc y ⁶⁸Ga

5.5.1 – Biodistribución en animales portadores de tumores inducidos

La biodistribución en animales portadores de tumores fue realizada en ratones C57 inoculados subcutáneamente con células 3LL (carcinoma de Lewis murino) y los tiempos de biodistribución fueron 0.5, 1 y 2 horas post-inyección del complejo por vía intravascular. Dicho modelo biológico fue seleccionado por tratarse de la única línea celular murina disponible que origina zonas hipóxicas. La hipoxia fue confirmada

mediante el estudio de anatomía patológica durante el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Javier Giglio (78).

5.5.1.1 – Complejos de ^{99m}Tc

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los complejos C1, C2 y C3. Para cada uno, se informa el porcentaje de dosis inyectada captada en cada órgano, así como el porcentaje de dosis inyectada por gramo y las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$, $n=3$).

Complejo 1

Tabla 6(a)			
% Actividad en órgano			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	4.48 ± 0.16	5.19 ± 0.67	5.1 ± 1.1
Hígado	40.10 ± 3.60	37.90 ± 9.80	31.80 ± 5.70
Corazón	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.01
Pulmón	1.37 ± 0.05	1.50 ± 0.35	1.53 ± 0.04
Bazo	3.90 ± 0.56	2.71 ± 0.89	3.96 ± 0.24
Riñón	3.93 ± 0.79	3.90 ± 1.20	5.00 ± 1.50
Tiroides	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Músculo	3.47 ± 0.62	3.57 ± 0.60	2.69 ± 0.62
Tumor	1.61 ± 0.35	1.79 ± 0.16	1.97 ± 0.30
Ves. Biliar	1.01 ± 0.02	2.09 ± 0.60	1.41 ± 0.92
Estómago	1.03 ± 0.60	1.10 ± 0.55	1.06 ± 0.05
Intestino	12.10 ± 1.50	15.90 ± 1.90	17.20 ± 6.60
Vejiga + Orina	21.90 ± 3.90	21.40 ± 7.20	26.10 ± 4.90

Tabla 6(b)			
% Actividad / gramo			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	3.08 ± 0.15	3.69 ± 0.50	3.50 ± 1.00
Músculo	0.39 ± 0.07	0.41 ± 0.07	0.30 ± 0.09
Tumor	0.77 ± 0.17	0.89 ± 0.06	0.93 ± 0.21

Tabla 6(c)			
Relaciones			
Relación	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Tumor/Músculo	2.05 ± 0.67	2.19 ± 0.37	3.19 ± 0.26
Tumor/Sangre	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.27 ± 0.02

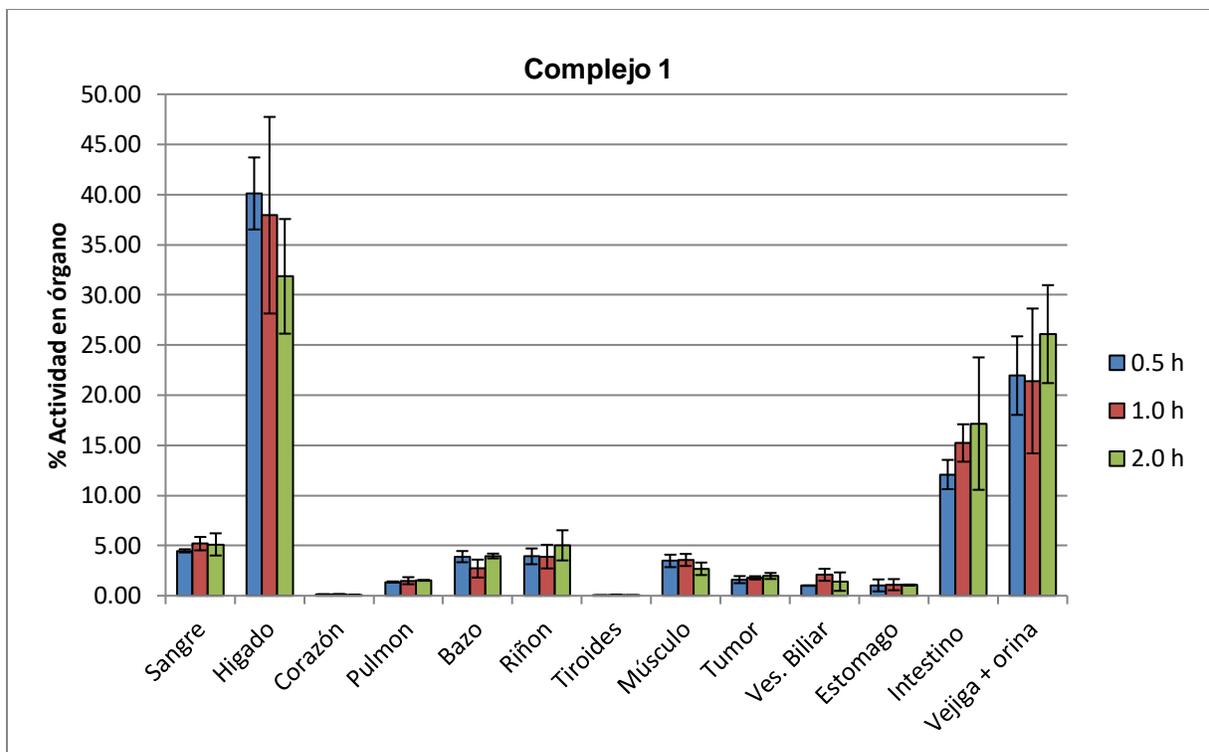


Fig. 71. Gráfico de biodistribución del Complejo $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbonílico de L1 (Complejo 1).

De la tabla 6(a) y del gráfico se desprende que el complejo 1 posee una moderada depuración sanguínea con una elevada captación hepática. La captación en el resto de los órganos es baja (menos del 5%) y su eliminación se da de manera combinada por vía hepatobiliar (17.2 ± 6.6 % a las 2 horas) y urinaria (26.1 ± 4.9 % a las 2 horas). La captación tumoral fue moderada para todos los tiempos, siendo máxima para 2 horas post-inyección (0.93 ± 0.21 %/gramo). Dado que la captación en músculo resultó ser baja (0.39 ± 0.07 %/gramo a 0.5 horas y 0.30 ± 0.10 %/gramo a 2 horas), las relaciones tumor/músculo son favorables para todos los tiempos estudiados, llegando a 3.19 ± 0.26 a las 2 horas, cuando la captación en músculo es mínima. Sin embargo, la relación tumor/sangre es desfavorable para todo el período evaluado (0.25 ± 0.06 a 0.5 horas y 0.27 ± 0.02 a 2 horas) debido a que la actividad sanguínea es moderada (3.08 ± 0.15 %/gramo a 0.5 horas) y no hay depuración significativa durante el período del estudio.

Es importante resaltar que a pesar de que la captación tumoral no es alta, habría una retención selectiva ya que la actividad en tumor se mantiene constante, y debido a ellos, la relación tumor/músculo crece con el tiempo.

Como conclusión, se trata de un complejo con un perfil de biodistribución poco adecuado para su uso como radiofármaco, dado que la elevada captación hepática y baja relación tumor/sangre permitirían obtener una pobre imagen tumoral.

Es importante recordar que el ligando L1 utilizado para la formación de este complejo fue sintetizado por el Dr. Javier Giglio durante sus estudios de doctorado (78), llevando a cabo su marcación mediante la formación de un complejo $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitrido. El comportamiento biológico de dicho complejo en el mismo modelo animal reveló una captación hepática mucho menor (menor al 10% en todo el período), aunque su eliminación también fue combinada por vía hepatobiliar y urinaria. La captación tumoral se mantuvo alrededor del 1.0% en todo el período evaluado, lo cual es comparable con el complejo presentado en este trabajo. Las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre también presentan diferencias. En el primer caso, el complejo $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbónico posee valores significativamente mejores (3.19 ± 0.26 a 2 horas) que el complejo $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitrido (1.15 ± 0.32), mientras que para la relación tumor/sangre, la situación es la inversa, presentando éste último valores un poco mayores (0.65 ± 0.21). Por lo tanto, la conclusión que se puede tomar es que la marcación del mismo ligando utilizando estrategias diferentes (distintos cores de tecnecio) afecta significativamente el comportamiento biológico final, y por ello, constituye una herramienta interesante para modular las propiedades de estos radiofármacos.

Complejo 2

Tabla 7(a)			
% Actividad en órgano			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	7.42 ± 0.86	8.6 ± 1.2	4.70 ± 1.30
Hígado	27.10 ± 4.90	28.7 ± 4.6	17.04 ± 0.56
Corazón	0.26 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.03
Pulmón	0.74 ± 0.13	0.65 ± 0.13	0.44 ± 0.04
Bazo	0.49 ± 0.18	0.44 ± 0.26	0.27 ± 0.04
Riñón	6.92 ± 0.54	7.17 ± 0.14	4.89 ± 0.94
Tiroides	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.03
Músculo	9.00 ± 1.60	7.81 ± 0.24	6.28 ± 0.49
Tumor	2.40 ± 0.28	1.89 ± 0.60	2.85 ± 0.69
Ves. Biliar	0.70 ± 0.25	0.90 ± 0.30	2.35 ± 0.96
Estómago	2.67 ± 0.40	5.25 ± 0.72	3.11 ± 0.53
Intestino	21.70 ± 2.90	32.00 ± 1.40	27.10 ± 0.81
Vejiga + Orina	24.20 ± 7.00	6.33 ± 0.88	31.20 ± 3.10

Tabla 7(b)			
% Actividad / gramo			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	4.83 ± 0.43	5.5 ± 1.1	3.11 ± 0.74
Músculo	0.96 ± 0.15	0.82 ± 0.02	0.69 ± 0.10
Tumor	1.10 ± 0.20	0.85 ± 0.22	1.33 ± 0.32

Tabla 7(c)			
Relaciones			
Relación	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Tumor/Músculo	1.17 ± 0.27	1.04 ± 0.30	1.93 ± 0.34
Tumor/Sangre	0.23 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.44 ± 0.15

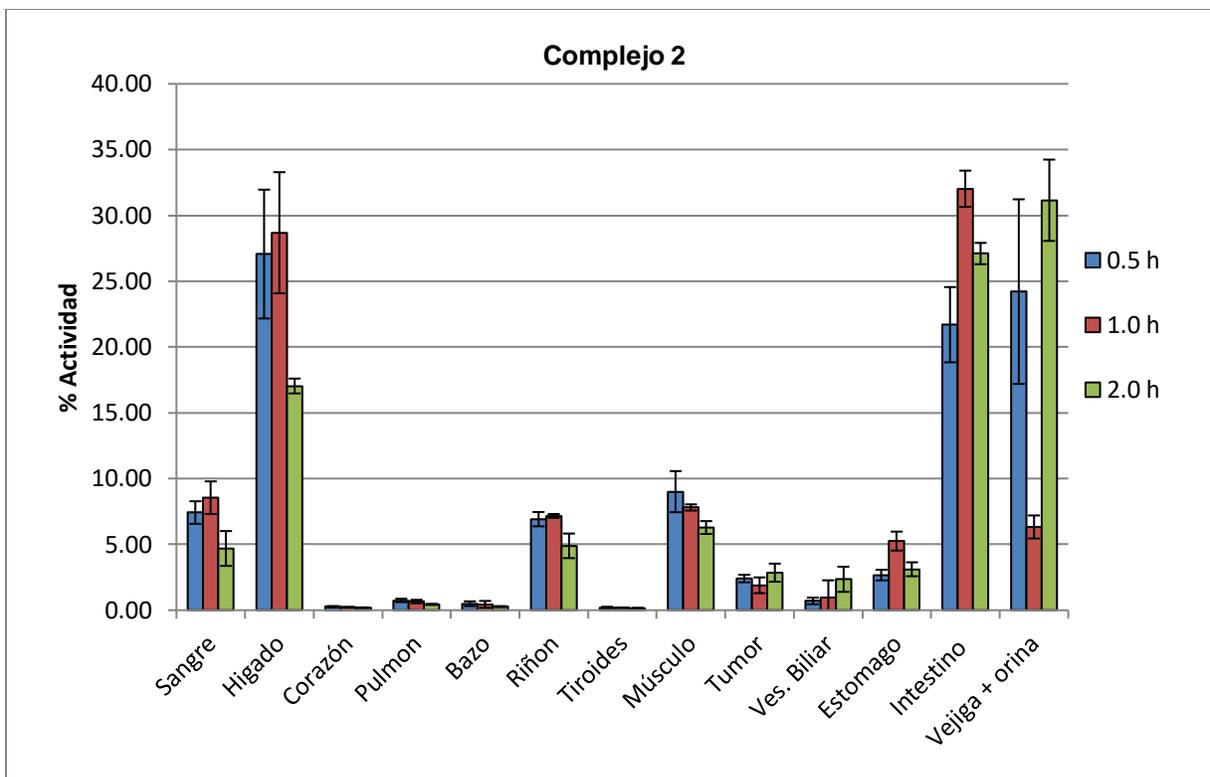


Fig. 72. Gráfico de biodistribución del Complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonílico de L2 (Complejo 2).

Como se puede apreciar, el complejo 2 presenta una elevada captación hepática, así como alta captación a nivel renal y muscular. En cuanto a la captación tumoral, su comportamiento es levemente mejor que C1, llegando a un valor de 1.33 ± 0.32 %/gramo a las 2 horas post-inyección. La relación tumor/músculo, sin embargo, no es tan favorable, siendo de 1.93 ± 0.34 a las 2 horas. Esto es debido a que el músculo presenta el doble de %actividad/gramo que el complejo 1, 0.69 ± 0.10 . Su relación tumor/sangre mejora con el tiempo, desde 0.23 ± 0.05 a 0.5 h hasta 0.44 ± 0.15 a 2 horas, debido a la depuración sanguínea. Sin embargo, continúa siendo un valor poco favorable.

Como conclusión, este complejo también presenta un comportamiento biológico poco adecuado, principalmente por su elevada captación hepática y baja depuración de sangre y tejido muscular.

Comparativamente, el complejo 2 presenta una mayor captación sanguínea y una eliminación más rápida que el complejo 1, tanto por vía hepatobiliar como urinaria. Estos hechos concuerdan con una menor lipofilicidad.

Complejo 3

Tabla 8(a)			
% Actividad en órgano			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	3.08 ± 0.65	1.91 ± 0.56	0.83 ± 0.21
Hígado	50.60 ± 1.60	53.77 ± 0.28	64.10 ± 7.00
Corazón	0.39 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.22 ± 0.03
Pulmón	2.14 ± 0.15	1.87 ± 0.16	1.34 ± 0.34
Bazo	3.55 ± 0.37	3.77 ± 0.73	3.00 ± 0.64
Riñón	1.97 ± 0.04	1.53 ± 0.14	1.14 ± 0.23
Tiroides	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Músculo	7.50 ± 1.10	6.00 ± 0.67	3.16 ± 0.59
Tumor	0.50 ± 0.36	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.20
Ves. Biliar	0.95 ± 0.03	2.52 ± 0.54	0.96 ± 0.09
Estómago	2.70 ± 1.60	2.69 ± 0.19	1.80 ± 1.40
Intestino	17.80 ± 1.90	18.50 ± 1.20	17.70 ± 2.20
Vejiga + Orina	2.04 ± 0.09	1.80 ± 1.20	1.26 ± 0.27

Tabla 8(b)			
% Actividad / gramo			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	2.02 ± 0.61	1.32 ± 0.41	0.54 ± 0.15
Músculo	0.80 ± 0.09	0.67 ± 0.06	0.32 ± 0.06
Tumor	0.75 ± 0.08	0.65 ± 0.01	0.43 ± 0.08

Tabla 8(c)			
Relaciones			
Relación	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Tumor/Músculo	0.97 ± 0.22	0.98 ± 0.10	1.41 ± 0.54
Tumor/Sangre	0.40 ± 0.15	0.52 ± 0.15	0.90 ± 0.41

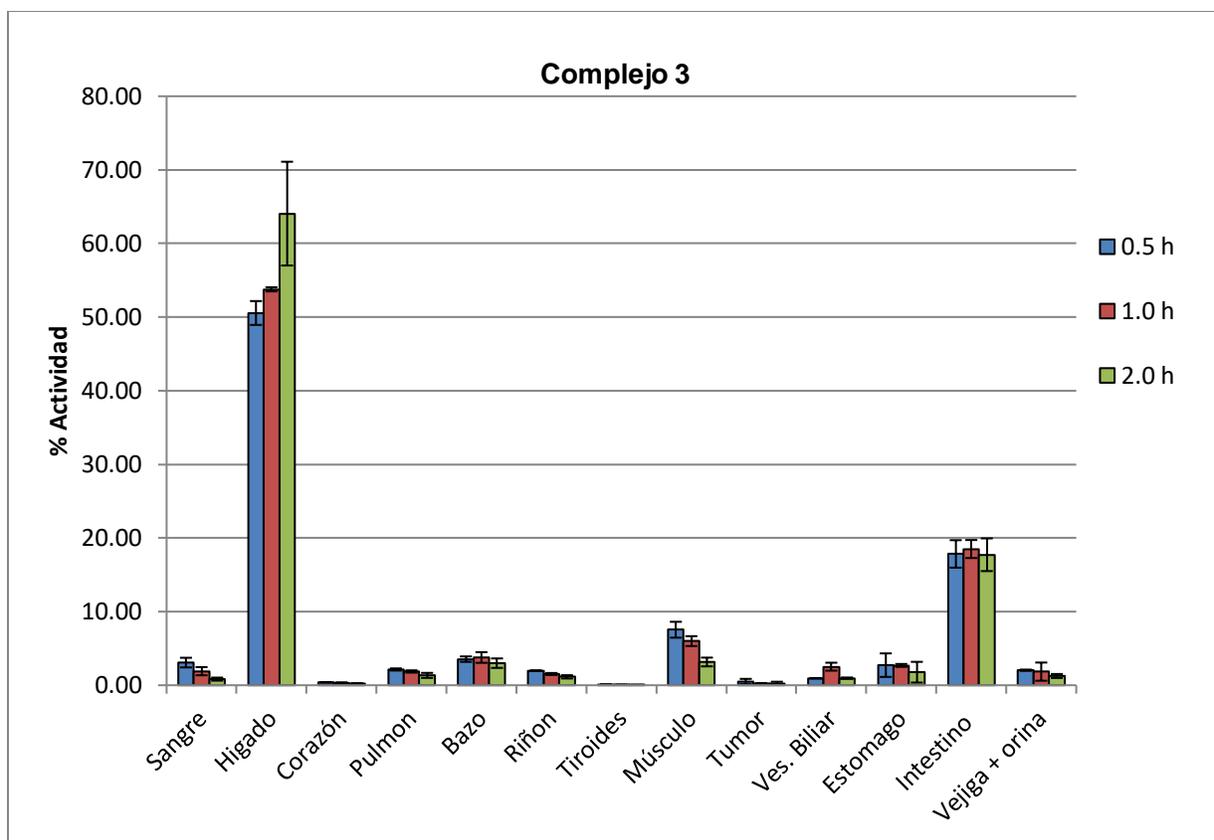


Fig. 73. Gráfico de biodistribución del Complejo $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbonílico de L3 (Complejo 3).

Este complejo presenta una captación sanguínea intermedia, de 3.08 ± 0.65 % a 0.5 horas, que disminuye hasta 0.83 ± 0.21 % a las 2 horas post-inyección. La eliminación principalmente por vía hepatobiliar, concuerda con su alta lipofilia. Presenta, además, una muy elevada captación hepática.

A diferencia de los complejos C1 y C2, la captación tumoral es máxima a 0.5 horas (0.75 ± 0.01 % actividad/gramo) y disminuye con el tiempo (0.65 ± 0.01 %/g a 1 hora y 0.43 ± 0.08 %/g a 2 horas). Presenta la menor relación tumor/músculo debido a la baja captación tumoral (1.41 ± 0.54 a 2 horas). Sin embargo, a causa de la baja captación sanguínea (0.54 ± 0.15 % actividad/gramo a 2 horas), tiene una mejor relación tumor/sangre que los anteriores, aunque aún insuficiente (0.90 ± 0.41 a 2 horas).

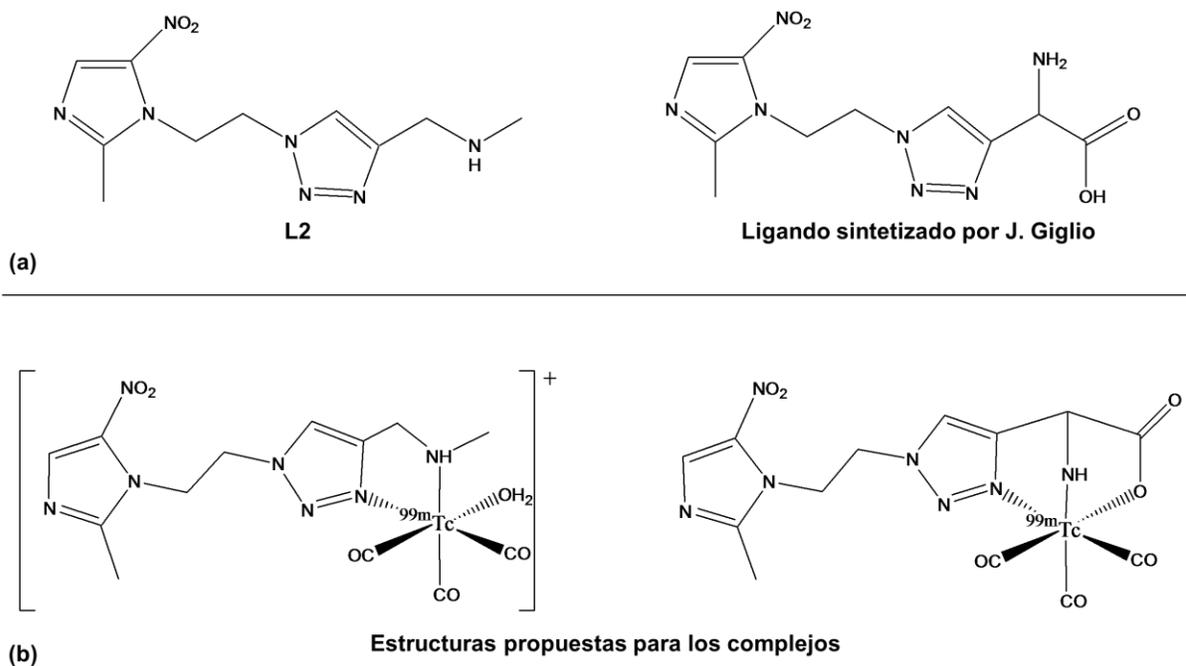
Por lo tanto, a modo de conclusión sobre los resultados de biodistribuciones de los tres complejos de ^{99m}Tc , se puede mencionar que todos ellos presentan como

principal desventaja una elevada captación hepática, así como moderada captación tumoral. C1 es el que muestra mejor relación tumor/músculo, pero las relaciones tumor/sangre son bajas para los tres casos.

Una consideración especial se debe hacer acerca de los niveles tan elevados de actividad en hígado y el vínculo que pueda tener esto con la tasa de unión a proteínas plasmáticas.

Estudios de Schibli et. al. (105) acerca de la influencia de la denticidad del ligando, indican que los complejos formados con quelantes bidentados son más susceptibles de permanecer retenidos en hígado y riñones que los correspondientes complejos con quelantes tridentados. La razón que explica este comportamiento está relacionada con la molécula de agua que queda formando parte del complejo en el caso de utilizar ligandos bidentados. El enlace de coordinación lábil que mantiene con el metal hace que sea susceptible de intercambio con grupos dadores de electrones presentes en proteínas plasmáticas (105,106). Este fenómeno es lo que podría explicar los valores tan elevados de unión a proteínas plasmáticas que presentan los tres complejos, y por ende, la captación hepática.

La figura 74 compara L2 con un ligando sintetizado en el marco de la tesis doctoral del Dr. Javier Giglio (78). La diferencia entre ambos compuestos es la presencia de un grupo carboxílico que convierte al segundo en un ligando tridentado capaz de desplazar las tres moléculas de agua del precursor tricarbónico.



Comparación entre ambos complejos ^{99m} Tc(I)-tricarbonylicos		
Propiedad	Con L2	Con ligando tridentado
% UPP	51.5 ± 0.9	13 ± 3
Captación hepática*	27.10 ± 4.90	9.42 ± 2.30
Captación renal [†]	6.92 ± 0.54	1.12 ± 0.27

*Valores obtenidos a 0.5 horas post-inyección en el modelo biológico previamente mencionado.

(c)

Fig. 74. (a) Estructuras de los ligandos bidentado (L2) y tridentado (sintetizado por Javier Giglio, en el marco de su tesis doctoral, 78). **(b)** Estructuras propuestas para los complejos de ^{99m}Tc(I)-tricarbonylicos con ambos ligandos. **(c)** Comparación de algunas propiedades biológicas de ambos complejos.

Lo que se puede observar es que el complejo con el ligando tridentado posee una tasa de unión a proteínas plasmáticas significativamente más baja, así como una captación hepática y renal menor. Estos datos apoyan la teoría que explica el comportamiento biológico de L2 a través de la denticidad del ligando y la presencia de una molécula de agua unida lábilmemente al metal.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto, una vía de modulación de las propiedades de un radiofármaco del tipo de C1, C2 y C3 consiste en agregar al ligando un tercer grupo químico que actúe como donador de electrones y permita una coordinación del metal de manera tridentada.

Existe también una segunda alternativa que consiste en la formación de complejos Tc(I)-tricarbonílicos mixtos del tipo [2+1] (107), en los cuales las 3 moléculas de agua del precursor son sustituidas por la acción simultánea de un ligando bidentado y uno monodentado. La unidad farmacofórica puede estar incluida en cualquiera de los dos ligandos, como se muestra en la figura 75. Este concepto aporta una mayor versatilidad y flexibilidad al diseño.

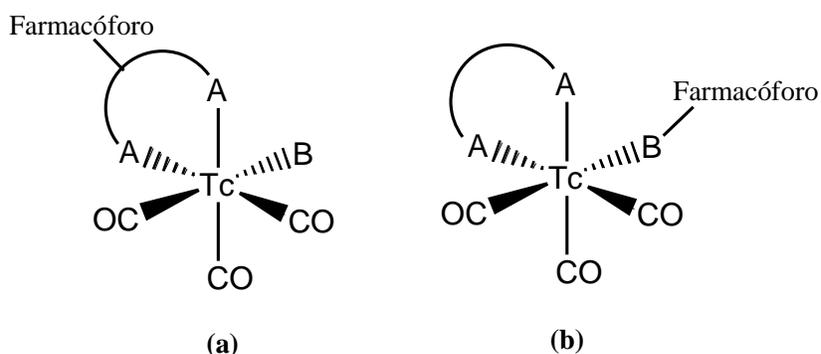


Fig. 75. Esquema de complejos de Tc(I)-tricarbonílicos mixtos del tipo [2+1]. **(a)** El farmacóforo se encuentra en la unidad bidentada. **(b)** El farmacóforo se encuentra en la unidad monodentada.

En la literatura se pueden encontrar numerosos trabajos que utilizan esta estrategia (108-111) y constituye un punto de partida para continuar profundizando con este tipo de ligandos.

5.5.1.2 – Complejos de ⁶⁸Ga

Complejo 4

<i>Tabla 9(a)</i>			
<i>% Actividad en órgano</i>			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	4.03 ± 1.92	1.89 ± 0.75	0.34 ± 0.07
Hígado	1.11 ± 0.20	0.68 ± 0.25	0.22 ± 0.06
Músculo	2.98 ± 0.78	2.03 ± 0.29	0.52 ± 0.21
Tumor	1.31 ± 0.93	1.31 ± 0.64	0.70 ± 0.25
Intestino	1.28 ± 0.54	1.02 ± 0.13	0.47 ± 0.07
Vejiga + Orina	87.40 ± 5.20	88.00 ± 13.80	91.40 ± 0.40

<i>Tabla 9(b)</i>			
<i>% Actividad / gramo</i>			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Sangre	3.20 ± 1.30	1.24 ± 0.41	0.26 ± 0.06
Músculo	0.46 ± 0.26	0.22 ± 0.02	0.09 ± 0.03
Tumor	1.11 ± 0.46	0.84 ± 0.26	0.66 ± 0.59

<i>Tabla 9(c)</i>			
<i>Relaciones</i>			
Relación	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Tumor/Músculo	2.47 ± 0.98	4.26 ± 0.54	4.96 ± 1.97
Tumor/Sangre	0.30 ± 0.08	0.70 ± 0.21	1.20 ± 0.43

Si bien se extrajeron los mismos órganos que para los complejos de ^{99m}Tc, los que presentaron porcentajes de dosis inyectada menores a 0.50% no se muestran por considerarse captación insignificante. La figura 76 muestra de manera gráfica los datos de la tabla 9(a).

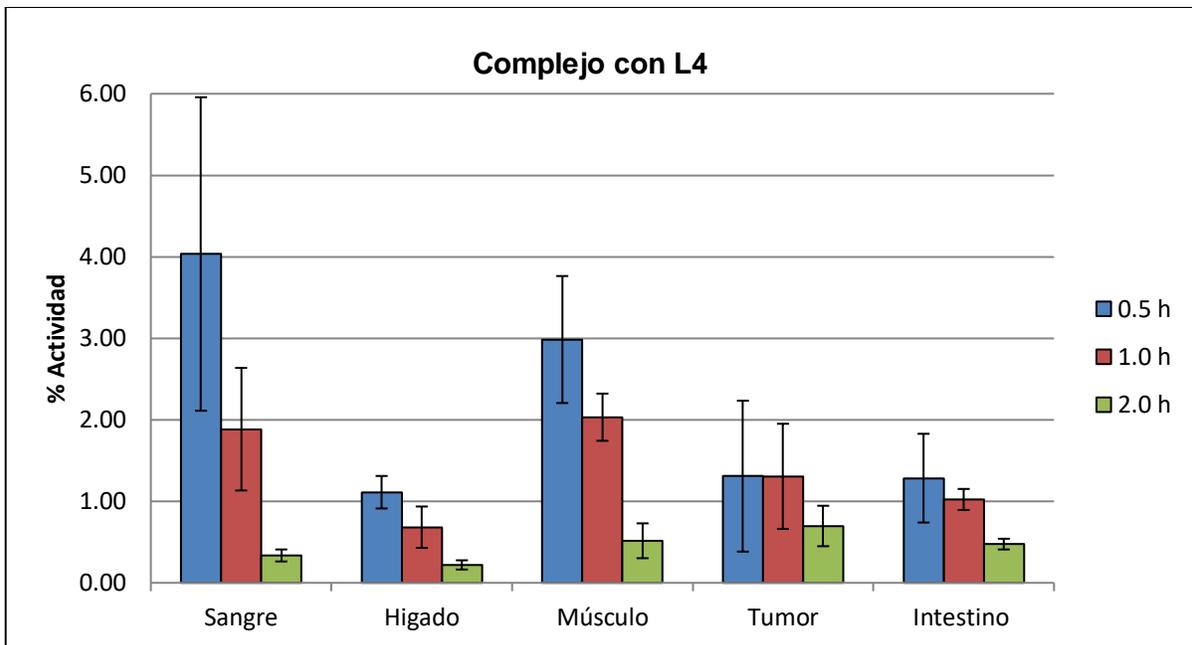


Fig. 76. Gráfico de biodistribución del Complejo ⁶⁸Ga-L4 (Complejo 4).

El complejo 4 presenta una baja captación sanguínea y hepática que disminuyen con el tiempo hasta valores menores al 1%. Su eliminación es completamente por vía urinaria, eliminándose ya el 87.4 ± 5.2 % a la media hora post-inyección. Esto se correlaciona muy bien con la elevada hidrofilia del complejo. La captación muscular también es baja y el porcentaje de dosis inyectada en tumor se mantiene constante durante la primera hora, disminuyendo levemente a las dos horas post-inyección.

El porcentaje de actividad por gramo de tumor es máximo para la media hora (1.11 ± 0.46 %). Sin embargo, la relación tumor/músculo mejora a medida que pasa el tiempo (alcanzando un valor de 4.96 ± 1.97 a 2 horas) ya que la captación en músculo disminuye significativamente. Por otro lado, la relación tumor/sangre se vuelve favorable recién a las 2 horas, donde llega a 1.20 ± 0.43 .

Como conclusión, se trata de un complejo con un perfil biológico que presenta captación moderada en el tumor, buenas relaciones tumor/músculo y tumor/sangre y rápida eliminación por vía urinaria.

Complejo 5

Tabla 10(a)			
% Actividad en órgano			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.*	2 hs.*
Sangre	1.58 ± 0.27	25.54 ± 1.67	30.25 ± 3.44
Hígado	1.03 ± 0.04	5.27 ± 1.46	5.56 ± 0.76
Corazón	0.12 ± 0.03	0.92 ± 0.21	1.32 ± 0.18
Pulmón	0.11 ± 0.02	1.41 ± 0.03	1.77 ± 0.13
Bazo	0.11 ± 0.03	0.64 ± 0.09	0.58 ± 0.06
Riñón	0.82 ± 0.10	21.86 ± 1.29	13.70 ± 6.12
Músculo	1.43 ± 0.25	21.64 ± 4.54	23.03 ± 2.73
Tumor	0.79 ± 0.43	9.76 ± 2.68	10.27 ± 0.07
Vesícula biliar	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.03
Estómago	0.06 ± 0.01	0.87 ± 0.29	1.09 ± 0.20
Intestino	0.95 ± 0.28	5.21 ± 0.91	7.58 ± 0.54
Vejiga + Orina	90.55 ± 1.85	3.42 ± 1.82	0.89 ± 0.14

Tabla 10(b)			
% Actividad / gramo			
Órgano	0.5 hs.	1 hs.*	2 hs.*
Sangre	1.16 ± 0.13	15.00 ± 1.04	17 ± 2.7
Músculo	0.17 ± 0.02	2.07 ± 0.42	2.11 ± 0.35
Tumor	0.83 ± 0.16	3.91 ± 1.15	3.24 ± 1.52

Tabla 10(c)			
Relaciones			
Relación	0.5 hs.	1 hs.	2 hs.
Tumor/Músculo	4.93 ± 1.51	-	-
Tumor/Sangre	0.73 ± 0.22	-	-

* Ver discusión.

Los resultados de biodistribución para este complejo llaman claramente la atención debido a que a 1 hora y 2 horas post-inyección, el patrón del comportamiento

biológico cambia significativamente, aumentando su captación en sangre y órganos muy vascularizados. La primera conclusión a la cual se arriba es que el complejo experimenta un metabolismo intenso que altera la integridad del compuesto y, por lo tanto, modifica claramente su patrón de biodistribución. A fin de verificar esta hipótesis, se realiza un nuevo experimento de biodistribución en animales normales. Para esto, se utilizan cuatro ratones CD1, hembras, de tres meses de edad. Cabe destacar que para este estudio se utiliza una cepa diferente (el modelo utilizado para todo el trabajo implicó ratones C57). Salvo por este punto, el procedimiento fue llevado a cabo en idénticas condiciones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11(a)	
% Actividad en órgano	
Órgano	1.0 hs.
Sangre	1.46 ± 0.71
Hígado	0.79 ± 0.19
Corazón	0.06 ± 0.03
Pulmón	0.15 ± 0.03
Bazo	0.03 ± 0.01
Riñón	0.84 ± 0.16
Músculo	1.46 ± 0.43
Vesícula biliar	0.01 ± 0.01
Estómago	0.11 ± 0.06
Intestino	1.30 ± 0.41
Vejiga + Orina	92.11 ± 1.91

Tabla 11(b)	
% Actividad / gramo	
Órgano	1.0 hs.
Sangre	0.77 ± 0.36
Músculo	0.12 ± 0.03

Claramente el patrón de biodistribución es diferente si se compara con el patrón obtenido para el mismo tiempo en el estudio anterior con animales portadores de

tumor. En este caso, se puede observar una captación muy baja en sangre y músculo, e insignificante para el resto de los órganos, junto con una elevada eliminación renal. Esto significa que la hipótesis acerca del metabolismo del complejo no explica el patrón observado. De lo contrario, se podría esperar que en los ratones normales se observara el mismo fenómeno.

Con el fin de encontrar una nueva hipótesis para explicar este hecho, se analizó el modelo biológico utilizado. La inoculación de células de carcinoma de Lewis murino 3LL en ratones C57 genera el desarrollo de un tumor palpable alrededor de 20-30 días luego de la inoculación. Este tumor desarrolla una región hipóxica que permite su utilización como modelo para evaluar los complejos desarrollados durante este trabajo. Sin embargo, se ha observado que el crecimiento de los tumores es muy variable, obteniéndose un rango de tamaños bastante amplio. Esto no sólo afecta la extensión de la hipoxia generada, sino también la homeostasis general del animal, modificando incluso determinados procesos bioquímicos. Durante el trabajo se ha observado que los ratones cuyo patrón de biodistribución se altera significativamente poseen tumores de gran tamaño (mayor a 2.0 gramos), mientras que el resto de los animales poseen tumores pequeños, no mayores a 1.5 g. La razón por la cual este factor pudiera estar vinculado al patrón de biodistribución alterado no se ha encontrado. Sin embargo, otros hallazgos permiten suponer que el tamaño del tumor influye, por ejemplo, dos animales cuyos tumores superaron los 3.0 gramos de peso, utilizados durante los estudios para el complejo C4, han tenido que ser descartados por presentar valores igualmente modificados, mientras que un ratón del grupo de 2 horas post-inyección para C5 presentó una biodistribución similar a los de 0.5 horas, presentando un tumor de menos de 1.0 gramos de peso. Sin embargo, al contar sólo con un ratón, su dato también ha debido ser descartado. Por lo tanto, la conclusión final es que los datos de 1 y 2 horas no son significativos y deberán repetirse, prestando especial atención al tamaño de los tumores. Esto no se ha podido llevar a cabo por falta de disponibilidad de animales C57 pero representa un punto de partida para la continuación del trabajo a futuro.

La figura 77 muestra de manera gráfica los principales resultados de la biodistribución del complejo C5 a la media hora post-inyección.

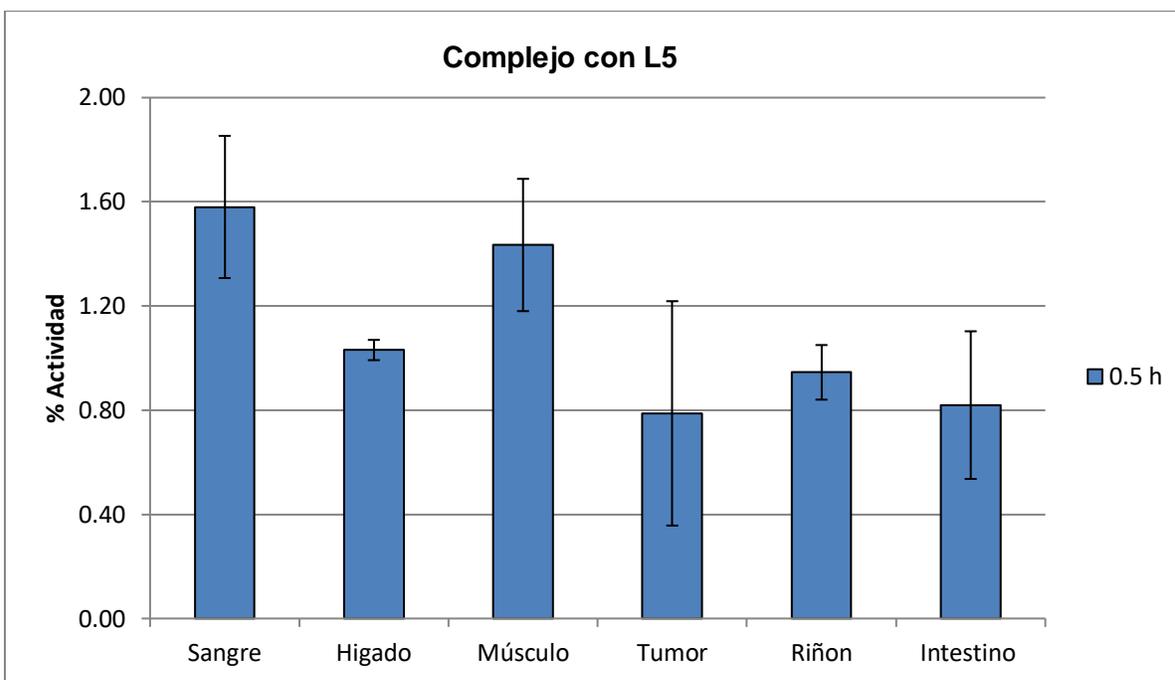


Fig. 77. Gráfico de biodistribución del complejo $^{68}\text{Ga-L5}$ (Complejo C5).

Se trata de un complejo similar al anterior, con baja captación hepática, muscular y renal, así como una rápida depuración sanguínea y elevada eliminación renal, factor que correlaciona muy bien con su elevada hidrofilia.

A este tiempo corto, presenta una muy buena relación tumor/músculo (4.93 ± 1.51) y, si bien la relación tumor/sangre no es adecuada (0.73 ± 0.22), deberán evaluarse a tiempos más largo para estudiar su evolución.

Como conclusión, se trata de un complejo que deberá evaluarse *in vivo* nuevamente, pero los datos preliminares de 0.5 horas indican que su perfil puede ser adecuado para su uso como radiofármaco.

5.5.2 – Correlación entre parámetros fisicoquímicos y biológicos

En muchos casos, los parámetros fisicoquímicos son una herramienta muy útil para predecir el comportamiento biológico de un compuesto, principalmente su ruta de eliminación y su capacidad de atravesar membranas biológicas.

Si bien el número de complejos es bajo, el siguiente análisis vincula los datos de UPP y lipofilidad con la tasa de eliminación en las biodistribuciones.

La figura 78 muestra la correlación entre la unión a proteínas plasmáticas y el porcentaje de eliminación total de los complejos (por vía urinaria y hepatobiliar).

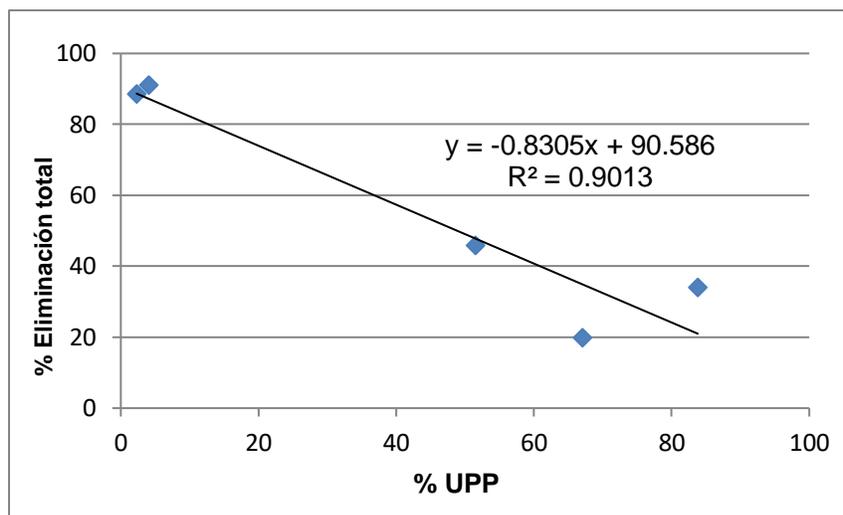


Fig. 78. Correlación entre la unión a proteínas plasmáticas (UPP) y la eliminación total de los complejos a 0.5 horas post-inyección.

Tal como se puede apreciar, existe una correlación lineal de manera tal que a mayor unión a proteínas plasmáticas, menor es la eliminación del complejo. Esto sucede debido a que únicamente la fracción libre de los compuestos es capaz de ser eliminada, ya sea por vía renal como por vía hepatobiliar.

La mejor correlación entre la lipofilidad y la eliminación se observa a las 2 horas. La figura 79 muestra dicha relación.

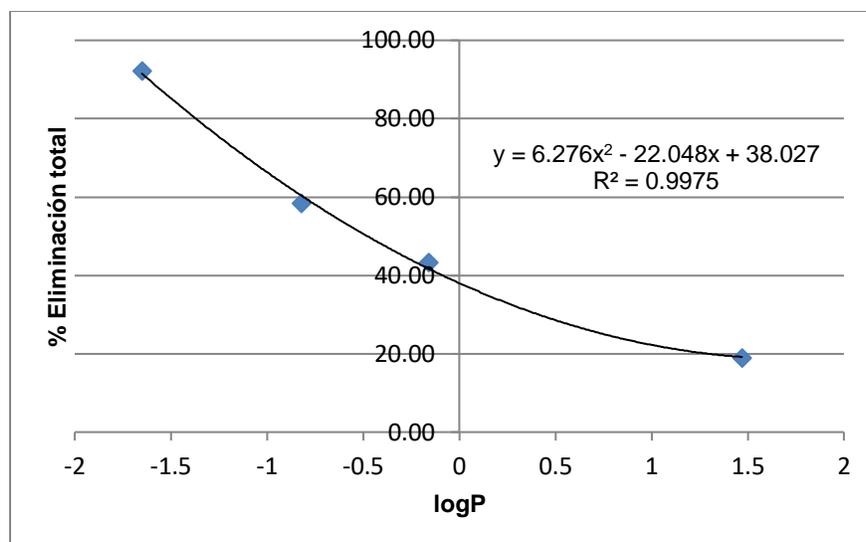


Fig. 79. Correlación entre la lipofilia y la eliminación total de los complejos a las 2.0 horas post-inyección.

La figura 79 muestra un comportamiento cuadrático típico de los parámetros dependientes de la lipofilia. En este caso, los complejos más hidrofílicos se eliminan más rápidamente que aquellos con menor hidrofiliencia. Sin embargo, si la lipofilia aumentara aún más, la eliminación podría verse incrementada debido a un aumento de la eliminación hepatobiliar.

Si se vincula la lipofilia con la eliminación exclusivamente por vía urinaria, se observa la tendencia esperada: los complejos más hidrofílicos presentan mayor eliminación, mientras que los más lipofílicos, se eliminan en menor proporción a través de la orina. Sin embargo, no se ha encontrado para este caso una correlación matemática que se ajuste al modelo, quizás por falta de datos, ya que el n para este caso es bajo.

5.6 – Preparación de complejos con renio estable para los ligandos L2 y L3

Como se mencionó anteriormente, no es posible predecir con certeza las estructuras de los complejos de ^{99m}Tc debido a que los ligandos presentan varios átomos donores de electrones que son capaces de coordinar al metal.

Para realizar la elucidación estructural de estos complejos, no es posible trabajar con ^{99m}Tc , ya que se obtiene del generador en concentraciones entre 10^{-7} y 10^{-10} M. Dado que no existe un isótopo del tecnecio estable, se debe recurrir a otra estrategia. Una de las posibilidades es utilizar el ^{99}Tc , que si bien es un emisor β^- , posee un período de semidesintegración de 2.1×10^5 años y puede manipularse en cantidades de miligramos, siempre y cuando se disponga de un laboratorio equipado para la manipulación de radionucleidos en estado sólido. La segunda estrategia consiste en la preparación de complejos análogos de renio estable. El renio es un metal de la tercera serie de transición y pertenece al mismo grupo que el tecnecio. Por otra parte, debido al fenómeno de contracción lantánida, los radios atómicos de ambos metales son muy semejantes entre sí, siendo de 136 pm para el tecnecio y 137 pm para el renio. Por todo ello, las propiedades químicas de ambos metales son casi idénticas. Teniendo en cuenta estos hechos, puede anticiparse con alta probabilidad que complejos análogos de Tc y Re van a tener el mismo tamaño, estructura, momento dipolar, carga formal y lipofilicidad en casi todos los casos.

En este trabajo, se ha comenzado con la caracterización estructural de los complejos para los ligandos L2 y L3. Esta etapa incluyó la síntesis del complejo precursor tricarbónico de renio, análogo al complejo precursor de ^{99m}Tc , la sustitución con el ligando correspondiente y estudios de análisis elemental.

5.6.1 – Preparación del complejo precursor $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$

El complejo precursor de renio, al igual que el de tecnecio, contiene al metal en estado de oxidación I coordinado por tres ligandos carbonilo. En lugar de moléculas de agua, éste contiene átomos de bromo, ya que su síntesis no es llevada a cabo en solución acuosa. Son ellos quienes, en la etapa de sustitución, serán desplazados por los ligandos. La carga formal es -2, ya que los átomos de bromo poseen carga negativa, y por lo tanto, como contraión de este complejo aparecen dos iones de tetraetilamonio. La ruta sintética se esquematiza en la figura 80.

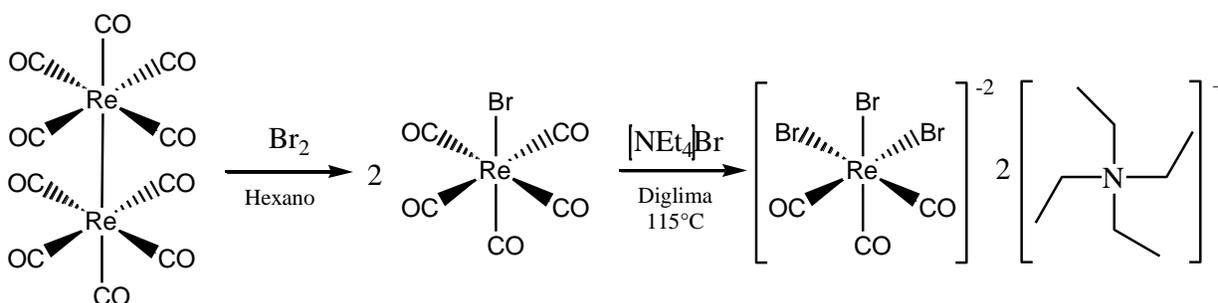


Fig. 80. Ruta de síntesis del complejo precursor de Re(I)-tricarbónico.

La síntesis del complejo transcurrió en dos etapas. La primera de ellas toma como reactivo de partida el complejo $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$. En este paso ocurre una sustitución nucleofílica que da lugar a $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ cuya purificación se realiza mediante sublimación y su estructura fue confirmada mediante espectroscopía IR.

La segunda etapa consiste en la reacción de este complejo intermedio con bromuro de tetraetilamonio para incorporar dos átomos de bromo por medio de la sustitución de dos carbonilos. De esta manera se consigue obtener el producto deseado, cuya estructura fue confirmada mediante espectroscopía IR.

5.6.2 – Complejo de renio con L2

La sustitución del complejo precursor con L2 fue realizada con cantidades equimoleculares de ambos reactivos disueltos en una solución de agua:metanol 1:1 bajo agitación continua y calentamiento a 75°C durante 3 horas.

El control de la reacción fue llevado a cabo mediante HPLC-UV utilizando el sistema descrito anteriormente en la parte experimental. La figura 81 muestra los cromatogramas, con detección UV, de los reactivos de partida.

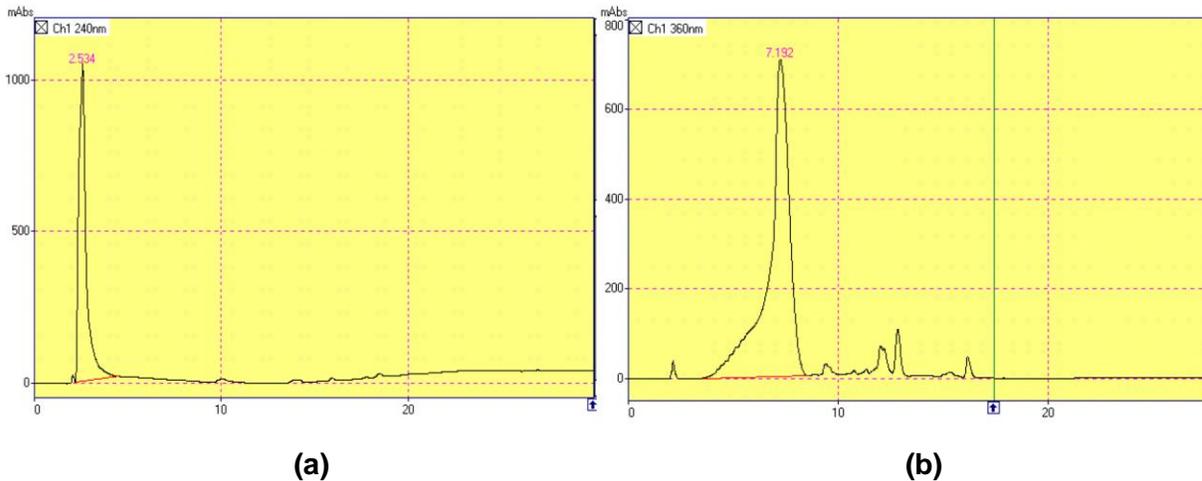


Fig. 81. Cromatogramas UV de los reactivos de partida. **(a)** Precursor Re(I)-tricarbonílico. **(b)** Ligando L2.

A las tres horas de reacción, ambos reactivos se han consumido casi por completo, y el cromatograma obtenido es el que se muestra en la figura 82.

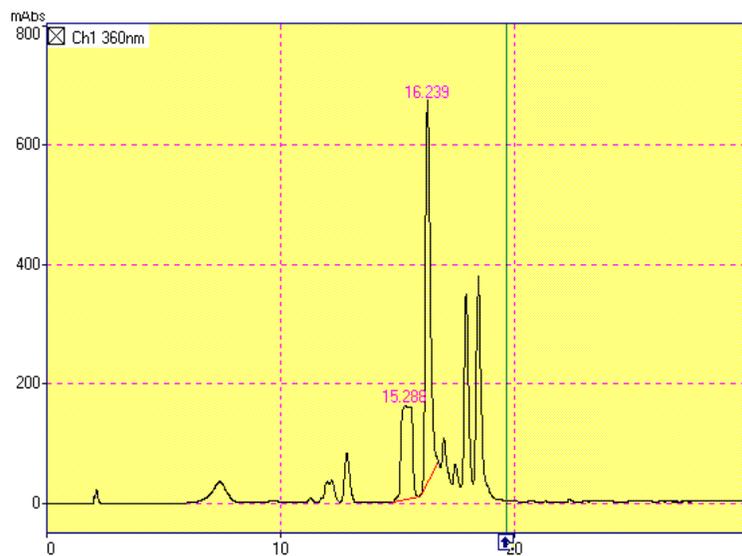
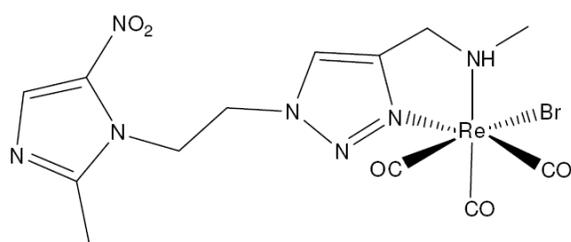


Fig. 82. Cromatograma HPLC-UV para el crudo de reacción luego de 3 horas de agitación a 75 °C.

Como se observa, a este tiempo prácticamente no se evidencia la presencia de ligando o de precursor. Los diferentes productos formados aparecen con mayores tiempos de retención y entre ellos, se destacan dos especies con $t_R = 15.2$ y 16.2 minutos, los mismos tiempos que las especies obtenidas con el complejo de ^{99m}Tc

(figura 65). Es esperable, dado lo explicado anteriormente, que se trate de complejos análogos.

Además de esta observación, al finalizar la reacción se observó la presencia de un sólido en el balón de reacción, el cual fue filtrado, lavado con agua y secado en estufa a 40°C. Este sólido fue evaluado por medio de análisis elemental y los resultados se comparan con los valores teóricos de la estructura propuesta en la figura 83.



Estructura propuesta

Análisis elemental		
Porcentaje	Valores teóricos	Valores experimentales
C	25.25	26.31
H	2.93	3.05
N	15.85	15.50
S	0.00	0.00

Fig. 83. Valores experimentales de análisis elemental para el sólido obtenido en la reacción de sustitución con L2. Comparación con los valores teóricos para la estructura propuesta.

Lo que se puede observar es que los valores experimentales obtenidos para el sólido son muy similares a los calculados de manera teórica para la estructura propuesta, en la que el ligando actúa como bidentado. Si se comparan los valores obtenidos con los teóricos para otras estructuras, por ejemplo, en la que el ligando actúa como monodentado, o en la que hay más de una molécula de ligando por core, lo que se observa es una diferencia significativa entre los datos experimentales y los teóricos para cada estructura. Por lo tanto, este estudio preliminar indica que la sustitución ocurrió satisfactoriamente, y es altamente probable que el complejo formado contenga una molécula de ligando por core, y éste actúa como ligando bidentado, permaneciendo un átomo de bromo en la esfera de coordinación. Es imposible mediante este análisis establecer qué átomos están involucrados en los enlaces de

coordinación, sin embargo, resulta una aproximación y un primer paso en la elucidación estructural del complejo C2. Se requerirán nuevos análisis, como RMN, espectroscopía IR, espectrometría de masa y cristalografía de rayos X (en caso de obtener el complejo bajo la forma de cristales) para confirmar la estructura.

5.6.3 – Complejo de renio con L3

La sustitución con L3 fue realizada de la misma manera que para el caso de L2. Dado que esta reacción también se controló mediante el mismo sistema de HPLC-UV, la figura 84 muestra el cromatograma obtenido para el ligando. Para el precursor de Re(I)-tricarbonílico, el perfil cromatográfico corresponde al mostrado en la figura 81.

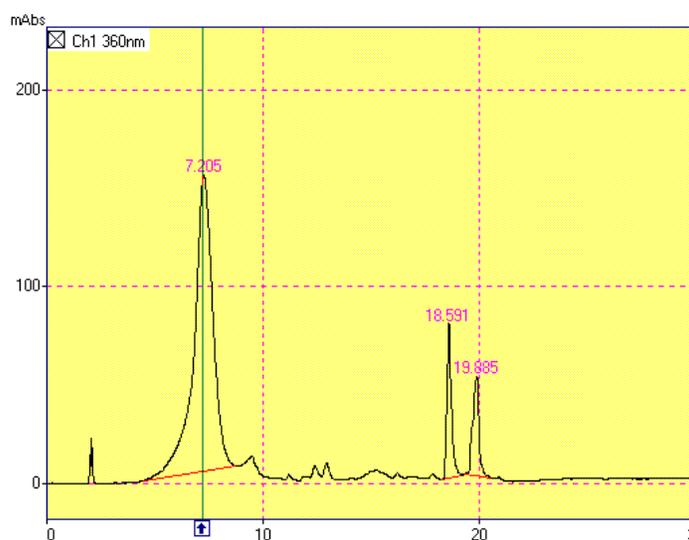


Fig. 84. Cromatograma HPLC-UV de L3.

Luego de 3 horas de reacción, los reactivos se consumieron casi totalmente, y el cromatograma que se obtuvo al controlar la mezcla se muestra en la figura 85.

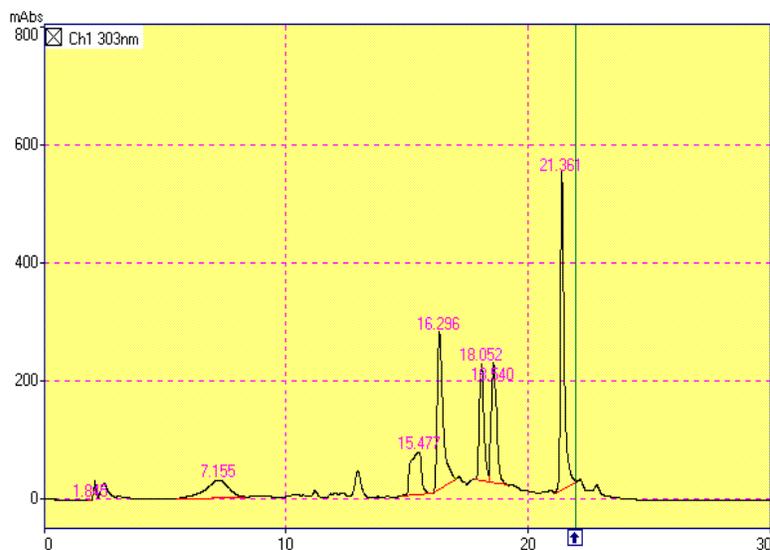


Fig. 85. Cromatograma HPLC-UV de la mezcla de reacción luego de 3 horas de agitación a 75°C.

En este cromatograma se puede observar una especie con un tiempo de retención de 21 minutos, al igual que la especie mayoritaria que se formaba durante la marcación con ^{99m}Tc .

En este caso también se formó un sólido durante la reacción. Éste fue filtrado, lavado con agua y secado en estufa a 40°C. Una pequeña parte fue redisuelta en metanol y controlada mediante el mismo sistema de HPLC-UV, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la figura 86.

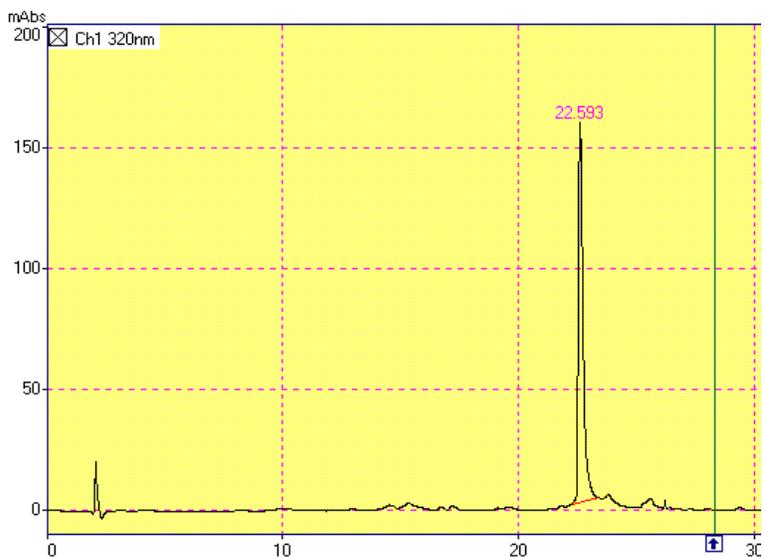
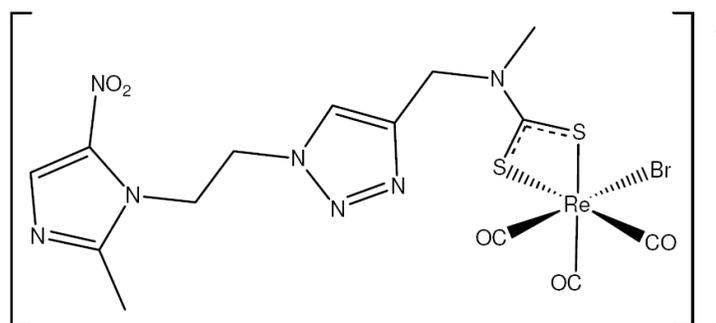


Fig. 86. Cromatograma HPLC-UV del sólido obtenido en la reacción entre el precursor de renio y L3.

Dado que el sólido coincide con la especie que se forma durante la marcación con ^{99m}Tc , se le realizó un análisis elemental para poder obtener más información sobre su estructura.

La figura 87 muestra la comparación de los resultados obtenidos con los valores teóricos de la estructura propuesta para este caso.

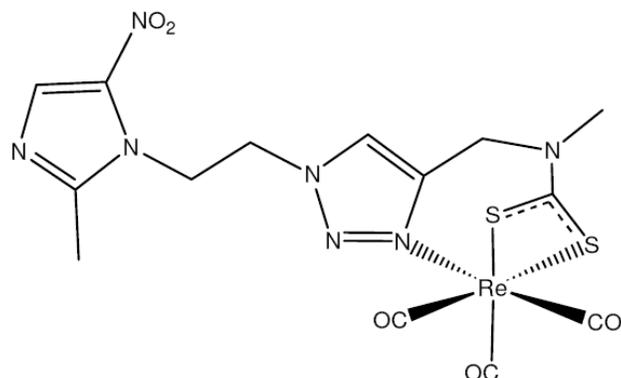


**Estructura propuesta
(L3 actuando como ligando bidentado)**

Análisis elemental		
Porcentaje	Valores teóricos	Valores experimentales
C	24.35	26.56
H	2.04	2.30
N	14.20	14.25
S	9.29	9.13

Fig. 87. Valores experimentales de análisis elemental para el sólido obtenido en la reacción de sustitución con L3. Comparación con los valores teóricos para la estructura propuesta.

En este caso, si bien hay una diferencia en el %C, para el resto de los elementos el resultado muestra una similitud entre los datos experimentales y los teóricos calculados para la estructura propuesta. Los valores teóricos para otras estructuras en las que el ligando coordina de manera monodentada o hay más de una molécula de ligado por core, se apartan significativamente de los datos experimentales. Sin embargo, al comparar estos datos con los valores teóricos para el complejo donde el ligando actúa de manera tridentada (figura 88), se observa que también para este caso existe una similitud.



**Estructura alternativa
(L3 actuando como ligando tridentado)**

Análisis elemental		
Porcentaje	Valores teóricos	Valores experimentales
C	27.54	26.56
H	2.31	2.30
N	16.06	14.25
S	10.50	9.13

Fig. 88. Valores experimentales de análisis elemental para el sólido obtenido en la reacción de sustitución con L3. Comparación con los valores teóricos para la estructura alternativa (L3 actuando como ligando tridentado).

Si bien los valores de %N se apartan, los de %C presentan mayor similitud. Por lo tanto, estos datos no permiten concluir acerca de la denticidad del ligando en el complejo preparado. La estructura propuesta originalmente correlaciona mejor con los resultados de UPP y biodistribución, debido a las razones previamente mencionadas. Sin embargo, es necesario continuar con esta etapa de caracterización estructural para poder extraer conclusiones.

6 – CONCLUSIONES

En el marco de la maestría se han sintetizado con éxito cuatro nuevos ligandos conteniendo el grupo 5-nitroimidazol como farmacóforo para su marcación con ^{99m}Tc o ^{68}Ga . Todas las rutas de síntesis han partido del metronidazol, comercialmente disponible, y sobre él, se llevaron a cabo modificaciones químicas necesarias para incorporar grupos de átomos donores adecuados para la formación de complejos de coordinación con uno u otro metal. Todas las estructuras generadas fueron confirmadas mediante espectroscopía de RMN y, en algunos casos, espectroscopía IR y espectrometría de masas.

Las marcaciones de L1, L2 y L3 se realizaron mediante la formación de complejos $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbonílicos. Para el caso del primer ligando, los resultados mostraron la formación de una única especie con elevada pureza radioquímica, estable por al menos 4 horas, mientras que para el segundo ligando, se obtuvieron dos especies que se encuentran en equilibrio en solución y que juntas poseen una elevada pureza radioquímica. Para L3 se obtuvieron nuevamente dos especies en equilibrio. La estabilidad para estos casos también resultó ser mayor al 90% por al menos 4 horas.

Las marcaciones de L4 y L5 con ^{68}Ga resultaron en la formación de una única especie de elevada pureza radioquímica, estables durante las 4 horas post-marcación.

La evaluación fisicoquímica de los complejos se realizó mediante la determinación de lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. Este último parámetro resultó ser elevado para los complejos de tecnecio, mientras que para los complejos de ^{68}Ga presentaron una baja unión.

En cuanto a la lipofilicidad, los complejos de ^{68}Ga resultaron ser los más hidrofílicos (-1.65 ± 0.05 para el complejo 4, -3.30 ± 0.10 para el complejo 5), mientras que los complejos de ^{99m}Tc mostraron un valor de logP intermedio (-0.82 ± 0.02 para el complejo 2, -0.16 ± 0.06 para el complejo 1) o moderado (1.47 ± 0.11 para el complejo 3), que correlacionan con las cargas formales de los complejos.

Los resultados de los estudios de comportamiento biológico en animales portadores de tumor revelaron que los tres complejos de ^{99m}Tc presentan una muy elevada captación hepática, siendo una desventaja para su utilización como radiofármacos. La

captación tumoral es moderada para los complejos 1 y 2 (0.93 ± 0.21 %/g y 1.33 ± 0.32 %/g, respectivamente a las 2 horas) y más baja para el complejo 3 (0.75 ± 0.08 %/g a 0.5 horas, disminuyendo con el tiempo). Si bien para todos los casos la relación tumor/músculo fue buena (3.19 ± 0.26 , 1.93 ± 0.34 y 1.41 ± 0.54 para C1, C2 y C3, respectivamente a las 2 horas), en ningún caso las relaciones tumor/sangre fueron favorables, resultando en todos los casos menor a la unidad. Por lo tanto, los estudios desarrollados hasta el momento indican que estos complejos no resultarían adecuados para ser utilizados como radiofármacos, y deberían introducirse cambios químicos que permitan modular las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico de manera de disminuir la captación hepática y favorecer la depuración sanguínea.

Para el complejo de ^{68}Ga con L4, los estudios de biodistribuciones mostraron una captación hepática muy baja ($0.34 \pm 0.07\%$) así como una rápida depuración sanguínea ($0.34 \pm 0.07\%$) y alta eliminación por vía renal ($91.40 \pm 0.40\%$) a las 2 horas post-inyección, hecho que correlaciona muy bien con su elevada hidrofilia. Las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre son favorables (4.96 ± 1.97 y 1.20 ± 0.43 , respectivamente), mientras que la captación tumoral es levemente menor que para los complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (0.66 ± 0.59 %/g). Las biodistribuciones del complejo de ^{68}Ga con L5 muestran un patrón muy similar al otro complejo de ^{68}Ga , 0.5 horas post-inyección aunque a mayores tiempos el patrón se ve significativamente modificado, aumentando la captación en sangre y los órganos más vascularizados. Se ha atribuido este hecho a la variabilidad del modelo experimental, encontrándose que estos datos alterados están vinculados con un tamaño tumoral por encima de 2.5 gramos. Estudios en animales normales apoyan la hipótesis ya que el patrón de biodistribución se modifica completamente.

Finalmente, se ha comenzado con la etapa de elucidación estructural de los complejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mediante la síntesis de los complejos análogos de Re(I) -tricarbonílicos. Tanto para L2 como L3 se obtuvieron productos que fueron aislados y estudiados mediante análisis elemental. Para el primer caso, el análisis confirmó la estructura propuesta, donde se considera a L2 como ligando bidentado, mientras que para el caso de L3, los datos experimentales no permiten concluir acerca de la denticidad del ligando

pudiendo tratarse de un complejo bidentado o tridentado. Si bien los resultados del análisis elemental no permiten establecer qué átomos participan en los enlaces de coordinación, representa un comienzo y un punto de partida para futuros análisis de RMN, espectroscopía IR, espectrometría de masas y cristalografía de rayos X.

Como conclusión final, a lo largo de este posgrado, se ha trabajado en todas las etapas básicas del desarrollo de un radiofármaco, desde la selección del farmacóforo y la síntesis de los ligandos, pasando por el proceso de marcación, de caracterización fisicoquímica y biológica y comenzando con la elucidación estructural.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos han generado una base sobre la cual continuar nuevos estudios. Las principales perspectivas futuras de este trabajo se describen brevemente a continuación:

- ❖ Resulta fundamental continuar el trabajo de elucidación estructural de los complejos con renio estable a fin de confirmar los hallazgos preliminares sobre la denticidad del ligando y la coordinación del metal.
- ❖ Como se discutió anteriormente, la elevada unión a proteínas plasmáticas de los complejos de ^{99m}Tc puede estar vinculada a una transquelación del metal por parte de grupos donores de electrones presentes en dichas proteínas. Dicho fenómeno, si se comprobase, estaría alterando la integridad de los complejos y podría ser la causa de un comportamiento biológico no deseado. Estudios mediante espectrometría de masas de los experimentos de unión a proteínas podrían aportar información útil acerca del modo en que los complejos se unen a las proteínas plasmáticas.
- ❖ Para una adecuada comprensión del comportamiento biológico de los compuestos, se propone realizar ensayos de estabilidad frente a homogenatos de hígado, principalmente para los complejos de ^{99m}Tc , para los cuales la captación ha sido elevada. Si bien este hecho puede vincularse a la elevada unión a proteínas plasmáticas, nuevos ensayos permitirán establecer si existe o no metabolismo de los complejos preparados.
- ❖ A fin de generar complejos de ^{99m}Tc más estables y evitar la transquelación con grupos proteicos, se deberían realizar esfuerzos para emplear la estrategia [2+1] utilizando coligandos monodentados que sustituyan la molécula de agua que queda formando parte de la esfera de coordinación. Para esto, se deberá optimizar la formación de los nuevos complejos y caracterizarlos a fin de comparar las propiedades. La segunda estrategia que podrá ser utilizada, es el diseño de ligandos análogos a los de la presente tesis, con un tercer grupo de átomos donores de electrones, de manera de obtener ligandos tridentados.

- ❖ Los estudios de biodistribución del complejo de ^{68}Ga con L5 deberán ser profundizados, prestando especial atención al tamaño de los tumores desarrollados para establecer si existe relación entre éstos y el patrón obtenido de biodistribución.
- ❖ Estudios con cultivos celulares en condiciones de oxia e hipoxia permitirán confirmar la selectividad de los mejores complejos por células con baja presión de oxígeno. Para ello, existen varios modelos a utilizar, entre los cuales se destacan los cultivos en monocapa (como el desarrollado por el Dr. Javier Giglio en el marco de su tesis doctoral, 78) y los esferoides, modelos tumorales tridimensionales que desarrollan gradientes de presión parcial de O_2 dando lugar a regiones hipóxicas. Los esferoides constituyen un excelente modelo para evaluar este tipo de complejos, y si bien actualmente no se encuentran disponibles en nuestro país, se podrá contar con ellos próximamente a través del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular.

8 – REFERENCIAS

1. Wilson W.R., Hay M.P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Review Cancer* 11, 393-410 (2011).
2. Caramelo P., Peña J., Castilla A., Justo S., De Solís A.J., Neira F., Peñate S., González-Pacheco F.R. Respuesta a la hipoxia. *Medicina* 66, 155-164 (2006).
3. Decohirst M.W., Cao Y., Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Review Cancer* 8, 425-437 (2008).
4. Berne R.M., Levy M.N. Skeletal physiology. Berne R.M., Levy M.N., ed. *Physiology*, 3rd. edition St. Louis, Mosby Yearbook, 292-308 (1993).
5. Berne R.M., Levy M.N. The peripheral circulation and its control. Berne R.M., Levy M.N., ed. *Physiology*, 3rd. edition St. Louis, Mosby Yearbook, 478-493 (1993).
6. Straub N.C. Transport of oxygen and carbon dioxide tissue oxygenation. Berne R.M., Levy M.N., ed. *Physiology*, 3rd. edition St. Louis, Mosby Yearbook, 590-598 (1993).
7. Miyata T., Takizawa S., van Ypersele de Striha C. Hypoxia 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *American Journal Physiology-Cell Physiology* 300, C226-231 (2011).
8. Roland H., Wenger. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hidroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*, 16, 1151-1162 (2002).
9. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. Cellular injury and adaptation. 4th edition, Phyladelphia: W.B. Saunders, 1-38 (1989).
10. Webster L.T. Drugs used in chemotherapy of protozoal infections. *The pharmacological basis of therapeutics*, 8th edition New York: Pergamon, 1002-1004 (1990).
11. Edwards D.I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanism. Mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31, 9-20 (1993).
12. Brown J.M. Hypoxic cell radiosensitizers: Where next?. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 16, 987-993 (1989).

13. Chapman J.D., Franko A.J., Sharplin J. A marker for hypoxic cells in tumors with potential clinical applicability. *British Journal of Cancer* 43, 546-550 (1981).
14. Kederris G.L., Miwa G.T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metabolism Review* 19, 33-62 (1988).
15. Sasai K., Iwai H., Yoshizawa T., Nishimoto S., Shibamoto Y., Kitakabu Y., Oya N., Takahashi M., Abe M. Pharmacokinetics of fluorinated 2-nitroimidazole hypoxic cell radiosensitizers in murine peripheral nervous tissue. *International Journal of Radiation Biology* 62, 221-227 (1992).
16. Liu R., Kiess M.C., Okada R.D., Block P.C., Strauss H.W., Pohost G.M., Boucher C.A. The persistent defect on exercise thallium imaging and its fate after myocardial revascularization: Does it represent scar or ischemia? *American Heart Association* 110, 996-1001 (1985).
17. Straub N.C. Transport of oxygen and carbon dioxide tissue oxygenation. Berne R.M., Levy M.N., ed. *Physiology*, 3rd. edition St. Louis, Mosby Yearbook, 590-598 (1993).
18. Buxton R.B., Alpert N.M., Babikian V., Weise S., Correia J.A., Ackerman R.H. Evaluation of the $^{11}\text{CO}_2$ positron emission tomographic method for measuring brain pH changes measured in states of altered pCO₂. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 6, 709-719 (1987).
19. Olive P.L., Durand R.E. Misonidazole binding in SCCVII tumors in relation to the tumor blood supply. *International Journal Radiation Oncology Biology Physics* 16, 755-761 (1989).
20. Connet R.J. Honig C.G., Gayeski E., Brooks G.A. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetic and intracellular PO₂. *Journal of Applied Physiology* 68, 833-842 (1990).
21. Kabayashi M., Nakagawa K. Metastasis and hypoxia-inducible factor. *Gan To Kagaku Ryoho* 37, 11, 2047-2051 (2010).
22. Brizel D.M., Scully S.P., Harrelson J.M., Layfield L.J., Bean J.M., Prosnitz L.R., Dewhirst M.W. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Research* 56, 941-943 (1996).

23. Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T. Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379, 88-91 (1969).
24. Reynolds T.Y., Rockwell S., Glazer P.M. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Research* 56, 5754-5757 (1996).
25. Wilson W.R., Hay M.P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Review Cancer* 11, 393-410 (2011).
26. Mohindra J.K., Rauth A. M. Increased cell killing by metronidazole and nitrofurazone of hypoxic compared to aerobic mammalian cells. *Cancer Research* 36, 930–936 (1976).
27. Adams G.E., Dische S., Fowler J.F., Thomlinson R.H. Hypoxic cell sensitizers in radiotherapy. *Lancet* 1, 186–188 (1976).
28. Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clinical Oncology* 19, 397–417 (2007).
29. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Review Cancer* 3, 721–732 (2003).
30. Poon E., Harris A.L., Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Review Molecular Medicine* 11, e26 (2009).
31. Vaupel P., Hockel M., Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxidants and Redox Signaling* 9, 1221–1235 (2007).
32. Hoogsteen I.J. Hypoxia in larynx carcinomas assessed by pimonidazole binding and the value of CA-IX and vascularity as surrogate markers of hypoxia. *European Journal Cancer* 45, 2906–2914 (2009).
33. Tatum J.L. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *International Journal Radiation Biology* 82, 699–757 (2006).
34. Jubb A M., Buffa F.M., Harris A.L. Assessment of tumor hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 18–29 (2010).
35. Mees G., Dierckx R., Vangestel C., Van De W.C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36, 1674–1686 (2009).

36. Mason R P. Multimodality imaging of hypoxia in preclinical settings. *Quaternary Journal Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 54, 259–280 (2010).
37. Early P., Sodee D. *Principles and practices of Nuclear Medicine*. Mosby Yearbook (1995).
38. Kowalski R., Falen S. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine*. 2nd ed. American Pharmacists Association (2004).
39. *Radiopharmaceuticals*. Final Text for addition to the international Pharmacopoeia. November (2008).
40. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews* 33, 445-446 (2004).
41. Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomoléculas and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1347-1370 (2008).
42. Dizio J., Anderson C., Davison. Technetium and Rhenium-labeled progestins: synthesis, receptor binding and in vivo distribution of an 11 β -substituted progestin labeled with technetium-99m and rhenium-186. *Journal of Nuclear Medicine* 33, 558-569 (1992).
43. Arano Y. Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Annual Nuclear Medicine* 16, 79-93 (2002).
44. Ginj M., Chen J., Walter M., Eltschinger V., Reubi J., Maecke H. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 11, 1136-1140 (2005).
45. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Review* 33, 445-446 (2004).
46. Rey A. Estrategias de marcación. Repartido teórico correspondiente al curso de Radiofarmacia, dictado por la Cátedra de Radioquímica, Facultad de Química, Udelar (2010).
47. Catafau A.M. Brain SPECT in clinical practice. *Journal Nuclear Medicine* 42, 259-271 (2001).

48. Baldas J., Bonnyman J. Substitution reactions of $^{99m}\text{TcNCl}_4$: a new route to a new class of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. *International Journal Applied Radiation Isotopes* 36, 133-139 (1985).
49. Boschi A., Duatti A., Uccelli L. Development of technetium-99m and rhenium-188 radiopharmaceuticals containing a terminal metal-nitrido multiple bond of diagnosis and therapy. *Topics in Current Chemistry* 252, 85-115 (2005).
50. Trappella C., Guerrini R., Salvadori S. Design of a new class of macromolecular multifunctional ligands for the labeling with the $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ core. IAEA Tecdoc. Report of the 1st. Meeting of the Coordinated Research Project 'Development of ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals for Sentinel Node Detection and Cancer Diagnosis', Vienna, IAEA Headquarters, November, 12-16, (2007).
51. Liu S., Edwards D., Looby R., Harris A., Poirier M., Barrett J., Heminway S., Carroll T. Labeling a Hydrazino Nicotinamide-Modified Cyclic IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc Using Aminocarboxylates as Coligands. *Bioconjugate Chemistry* 7, 63-71 (1996).
52. Nock B., Nikolopoulou A., Chiotellis E., Loudos G., Maintas D., Reubi J.C., Maina T. $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30, 247-258 (2003).
53. Decristoforo C., Maina T., Nock B., Gabriel M., Cordopatis P., Moncayo R. ^{99m}Tc -Demotate 1: first data in tumour patients-results of a pilot/phase I study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30,1211-1219 (2003).
54. Pietzsch H-J., Gupta A., Syhre R., Leibnitz P., Spies H. Mixed-Ligand Technetium (III) Complexes with Tetradentate/Monodentate NS_3 /Isocyanide Coordination: A New Nonpolar Technetium Chelate System for the Design of Neutral and Lipophilic Complexes Stable in Vivo. *Bioconjugate Chemistry* 12, 538-544 (2001).
55. Kunstler J.U., Veerendra B., Figueroa S.D., Sieckman G.L., Rold T.L., Hoffman T.J., Smith C.J., Pietzsch H-J. Organometallic $^{99m}\text{Tc(III)}$ '4 + 1' bombesin (7-14) conjugates: synthesis, radiolabeling, and in vitro/in vivo studies. *Bioconjugate Chemistry* 18, 1651-1661 (2007).

56. Fernández C., Santos I.C., Santos I., Pietzsch H-J., Kunstler J.U., Kraus W., Rey A., Margaritis N., Bourkoula A., Chiotellis A., Paravatou-Petsotas M., Pirmettis I. Rhenium and technetium complexes bearing quinazoline derivatives: progress towards a ^{99m}Tc biomarker for EGFR-TK imaging. *Dalton Translation* 28, 3215-3225 (2008).
57. Mirtschink P., Stehr S.N., Pietzsch H-J., Bergmann R., Wunderlich G., Heintz A.C., Kropp J., Spies H., Kraus W., Deussen A., Walther M. Modified "4 + 1" mixed ligand technetium-labeled fatty acids for myocardial imaging: evaluation of myocardial uptake and biodistribution. *Bioconjugate Chemistry* 19, 97-108 (2008).
58. Jurisson S.S., Lindon J.D. Potential small molecule radiopharmaceuticals. *Chemistry Review* 99, 2205-2218 (1999).
59. Alberto R., Schibli R., Egli A., Schubiger A.P. A Novel Organometallic aqua complex of Technetium for the labeling of biomoléculas. Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *Journal of American Chemical Society* 120, 7987-7988 (1998).
60. Bartholoma M.D., Louie A. S., Valliant J.F., Zubieta J. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chemical Reviews* 110, 2903-2920 (2010).
61. Ferreira C.L., Bayly S.R., Green D.E., Storr T., Barta C.A., Steele J., Adam M.J., Orvig C. Carbohydrate-Appended 3-Hydroxi-4-pyridinone Complexes of the $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ Core (M = Re, ^{99m}Tc , ^{186}Re). *Bioconjugate Chemistry* 17, 1321-1329 (2006).
62. Kniess T., Correia J.D.G., Domingos A., Palma E., Santos I. Synthesis and structural characterization of novel Re(I) Tricarbonyl complexes anchored on a phosphinoarylbenzylamine and a phosphinoaryloxazolines generated in situ. *Inorganic Chemistry* 42, 6130-6135 (2003).
63. Bourkoula A., Paravatou-Petsotas M., Papadopoulos A., Santos I., Pietzsch H-J., Livaniou E., Pelecanou M., Papadopoulos M., Pirmettis I. Synthesis and characterization of rhenium and technetium-99m tricarbonyl complexes bearing the

- 4-[3-bromophenyl]quinazoline moiety as a biomarker for EGFR-TK imaging. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44, 4021-4027 (2009).
64. Alberto R. In: *Technetium, Rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*. SGEEditoriali, Padova, 3-14 (2002).
65. Liu Y., Spingler B., Schmutz P., Alberto R. Metal-Mediated Retro Diels-Alder of Dicyclopentadiene Derivatives: A Convenient Synthesis of [(Cp-R)M(CO)₃](M = ^{99m}Tc, Re) Complexes. *Journal of American Chemical Society* 130, 1554-1555 (2008).
66. Peindy H., Dongo N., Liu Y., Can D., P. Schmutz P., Spingler B., Alberto R. Aqueous syntheses of [(Cp-R)M(CO)₃] type complexes (Cp=cyclopentadienyl, M=Mn, ^{99m}Tc, Re) with bioactive functionalities. *Journal of Organometallic Chemistry* 694, 981–987 (2009).
67. Spradau T., Katzenellenbogen J. Protein and Peptide Labeling with (Cyclopentadienyl)tricarbonyl Rhenium and Technetium. *Bioconjugate Chemistry* 9, 765–772 (1998).
68. Schibli R. Organometallic precursors of Technetium and Rhenium: unique opportunities for radiotracer development due to chemical diversity. En: "Technetium, rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine 7 p. 25-34. SGEEditoriali, Padova (2006).
69. Struthers H., Hagenbach A., Abram U., Schibli R. Organometallic [Re(CO)₃]⁺ and [Re(CO)₂(NO)]²⁺ Labeled Substrates for Human Thymidine Kinase. *Inorganic Chemistry* 48(12), 5154-5163 (2009).
70. Linder K.E., Chan Y.W., Cyr J.E., et al. TcO(PnAO-1-[2-nitroimidazole]) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: Synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *Journal of Medicinal Chemistry* 37, 9-17 (1994).
71. Ballinger J.R., Wan Min Kee J., Rauth A.M. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole (BMS 181321) as a marker of tumor hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine* 37, 1023-1031 (1996).

72. Melo T., Duncan J., Ballinger J.R., et al. BRU59-21, a second generation technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 41, 169-176 (2000).
73. Ballinger J.R. Imaging Hypoxia in Tumors. *Seminars in Nuclear Medicine* 4, 321-329 (2001).
74. Murugesan S., Shetty S.J., Noronha O.P.D., et al. Technetium-99m cyclam AK 2123: A novel marker for tumor hypoxia. *Applied Radiation Isotopes* 54, 81-88 (2001).
75. Chu T., Li R., Hu S., Wang Y., Liu X., Wang X. Synthesis and biodistribution of the ^{99m}Tc nitrido complex with [2-(4-nitro-1*H*-imidazolyl)ethyl dithiocarbamate] (NIET). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 261, 199-202 (2004).
76. Giglio J., Patsis G., Pirmettis I., Papadopoulos M., Raptopoulou C., Pelecanou M., León E., González M., Cerecetto H., Rey A. Preparation and characterization of technetium and rhenium tricarbonyl complexes bearing the 4-nitrobenzyl moiety as potential bioreductive diagnostic radiopharmaceuticals. In vitro and in vivo studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43, 741-748 (2008).
77. Mallia B.M., Subramanian S., Mathur M., Sarma H., Venkatesh M., Banerjee S., Sarmac H., Venkatesha M. On the isolation and evaluation of a novel unsubstituted 5-nitroimidazole derivative as an agent to target tumor hypoxia. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5233-5237 (2008).
78. Giglio J. Tesis de Doctorado en Química: Diseño, síntesis y evaluación de complejos de ^{99m}Tc conteniendo ligandos nitroimidazólicos, como potenciales radiofármacos con selectividad hacia tejido hipóxico. (2010).
79. Green M.A., Welch M.J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Nuclear Medicine and Biology* 16, 435-448 (1989).
80. Harris W.R., Pecoraro V. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry* 22, 292-299 (1983).
81. Bandoli G., Dolmella A., Tisato F., Porchia M., Refosco F. Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey. *Coordination Chemistry Review* 253, 56-77 (2009).

82. Caraco C., Aloj L., Eckelman W.C. The gallium-desferoxamine complex: stability with different deferoxamine concentrations and incubation conditions. *Applied Radiation Isotopes* 49, 1477-1479 (1998).
83. Furukawa T., Fujibayashi Y., Fukunaga M., Saga T., Endo K., Yokoyama A. An approach for immunoradiometric assay with metallic radionuclides: gallium-67-deferoxamine-dialdehyde strach-IgG. *Journal Nuclear Medicine* 32, 825-829 (1991).
84. Harris W.R., Martell A.E. Aqueous complexes of gallium(III). *Inorganic Chemistry* 15, 713-720 (1976).
85. Luyt L.G., Katzenellenbogen J.A. A trithiolate tripodal bifunctional ligand for the radiolabeling of peptides with gallium(III). *Bioconjugate Chemistry* 13, 1140-1145 (2002).
86. Sun Y., Anderson C.J., Pajeau T.S., Reichert D.E., Hancock R.D., Motekaitis R.J., Martell A.E., Welch M.J. Indium (III) and gallium (III) complexes of bis(aminoethanethiol) ligands with different denticities: stabilities, molecular modeling, and in vivo behavior. *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 458-470 (1996).
87. Smith-Jones P.M., Stolz B., Bruns C., Albert R., Reist H.W., Fridrich R., Maecke H.R. Gallium-67/gallium-68-DFO-octreotide: a potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis and radiolabelling in vitro and preliminary in vivo studies. *Journal of Nuclear Medicine* 35, 317-325 (1994).
88. Stolz B., Smith-Jones P.M., Albert R., Reist H., Maecke H., Bruns C. Biological characterization of ^{67}Ga or ^{68}Ga -labelled DFO-octreotide (SDZ-216-927) for PET studies of somatostatin receptor positive tumors. *Hormones Metabolism Research* 26, 453-459 (1994).
89. Schubiger P.A., Lehmann L., Friebe M. *PET Chemistry. The Driving Force in Molecular Imaging.* Springer Ed. (2007).
90. Khan M.U., Khan S., El-Refaie S., Win Z., Rubello D., Al-Nahhas A. Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging. *European Journal of Cancer Surgery* 1-7 (2009).

91. Velykian I., Sundberg A.L., Lindhe O., Hoglund A.U., Eriksson O., Werner E., Carlsson J., Bergstrom M., Langstrom B., Tolmachev V. Preparation and evaluation of ^{68}Ga -DOTA-hEGF for visualization of EGFR expression in malignant tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 46, 1881-1888 (2005).
92. Mukai T., Suwada J., Sano K., Okada M., Yamamoto F., Maeda M. Design of Ga DOTA-based bifunctional radiopharmaceuticals: Two functional moieties can be conjugated to radiogallium–DOTA without reducing the complex stability. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 4285-4289 (2009).
93. Hay M.P., Wilson M.R., Moselen J.W., Palmer B.D., Denny W.A. Hypoxia-selective antitumor agents 8. Bis(nitroimidazolyl)alkanecarboxamides: a new class of hypoxia selective cytotoxins and hypoxic cell radiosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry* 37, 381-391 (1994).
94. Hawkes J., Ginsberg P. Dianionic rhenium carbonyl halides. *Inorganic Chemistry* 8, 2189-2192 (1969).
95. Alberto R., Egli A., Abram U., Hegetschweiler K., Gramlich V., Schubiger A. A synthesis and reactivity of *fac*- $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$. Formation and structural characterization of the clusters $[\text{NEt}_4][\text{Re}_3(\text{m}_3\text{-OH})(\text{m-OH})_3(\text{CO})_9]$ and $[\text{NEt}_4][\text{Re}_2(\text{m-OH})_3(\text{CO})_6]$ by alkaline titration. *Journal of Chemical Society, Dalton Translation* 2815-2820 (1994).
96. Schibli R. Technetium, rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine. 7th edited by Ulderico Mazzi, SG Editoriali, (2006). Capitulo: Organometallic precursors of technetium and rhenium: Unique opportunities for radiotracer development due to chemical diversity, 25-29.
97. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical. Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 40, 2004-2021 (2001).
98. Hein C.D., Liu X.M., Wang D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Research* 25, 2216-2230 (2008).
99. Mindt T.L., Struthers H., Brans L., Anguelov T., Schweinsberg C., Maes V., Tourwe D., Schibli R. "Click to chelate": Synthesis and Installation of Metal

- Chelates into Biomolecules in a Single Step. *Journal of American Chemical Society* 128, 15096-15097 (2006).
100. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid-phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal Organic Chemistry* 67, 3057-3064 (2002).
 101. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 2596-2599 (2002).
 102. Goubert R., Schneider R., Walcarius A. Synthesis of new dithiocarbamate-based organosilanes for grafting on silica. *Tetrahedron Letter* 48, 2113-2116 (2007).
 103. Aulton E. *Farmacía: Ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. Ed. ELSEIVIER, Madrid, España, (2004).
 104. Schibli R., Schubiger P. A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 29, 1529 (2002).
 105. Liu Y., Spingler B., Schmutz P., Alberto R. Metal-Mediated Retro Diels-Alder of Dicyclopentadiene Derivatives: A Convenient Synthesis of [(Cp-R)M(CO)₃](M)^{99m}Tc,Re) Complexes. *Journal American Chemical Society* 130, 1554 (2008).
 106. Mundwiler S., Kündig M., Ortner K., Alberto R. A new [2 + 1] mixed ligand concept based on [^{99(m)}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺: a basic study. *Dalton Transactions*, 1320-1328 (2004).
 107. Mundwiler S., Kündig M., Ortner K., et al. A new [2+1] mixed ligand concept based on [^{99(m)}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺: a basic study. *Dalton Translation* 7, 1320-1328 (2004).
 108. Zobi F., Spingler B., Alberto R. Structure, reactivity and solution behavior of [Re(ser)(7-MeG)(CO)₃] and [Re(ser)(3-pic)(CO)₃]: "nucleoside-mimicking" complexes based on the fac-[Re(CO)₃]⁽⁺⁾ moiety. *Dalton Translation* 7, 2859-2865 (2005).

- 109.** Panagiotopoulou A., Tsoukalas C., Raptopoulou C., Terzis A., Pirmettis I., Papadopoulos M., Pelecanou M. New “2+1” mixed ligand fac-tricarbonyl complexes of the general formula $\text{Re}(\text{OO})(\text{L})(\text{CO})_3$. Technetium and other radiometals in chemistry and medicine. SGE editoriali, Padova. Edited by: U. Mazzi, W.C. Eckelman, W.A. Volkert, 105-106 (2010).
- 110.** Sagnou M., Benaki D., Paravatou-Petsotas M., Pirmettis I., Papadopoulos M., Pelecanou M. “2+1” curcumin complexes with the fac- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ core. Technetium and other radiometals in chemistry and medicine. SGE editoriali, Padova. Edited by: U. Mazzi, W.C. Eckelman, W.A. Volkert, 109-110 (2010).

9 - AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que contribuyeron al desarrollo de esta tesis y a las cuales les debo un profundo agradecimiento.

En primer lugar, me siento muy agradecida con mis directores de tesis, Ana y Hugo, quienes me han apoyado en todo momento. Han dedicado muchas horas a largas discusiones teóricas, han sabido guiarme en el laboratorio siempre que me hizo falta y han sido verdaderos motivadores en especial en aquellos momentos en los que nada parecía funcionar bien.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico recibido en el marco de la beca de maestría, lo cual me permitió dedicarme enteramente a este trabajo y también por la beca de movilidad, que me permitió realizar una valiosa pasantía en la Universidad de Uppsala, Suecia.

A Pedeciba-Química, también por el apoyo económico a través de las alícuotas de dinero que me han permitido llevar a cabo parte de la fase experimental.

Al Laboratorio Gramón-Bagó del Uruguay S.A., por la donación del Metronidazol.

A los Centros de Medicina Nuclear del Hospital del Clínicas, Impasa y Hospital Italiano, por la donación de pertecneciato.

Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), por la donación del galio.

A María Moreno, del Laboratorio de Vacunas Recombinantes del Instituto de Higiene, por su excelente disposición a la hora de cultivar las células tumorales y su ayuda durante la inoculación de los animales cada vez que lo precisé.

A Irina Velykian (GE HealthCare, Uppsala, Suecia), Bengt Langström (Universidad de Uppsala, Suecia) y todo su grupo de trabajo por su apoyo y dedicación durante los tres meses de pasantía.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Radioquímica: Leticia, Nancy, Natalia, Elena, Eduardo. A Mariella, por sus charlas motivadoras y su constante apoyo. A Laura, por toda su ayuda con los animales y por su amistad. Un agradecimiento muy especial a Javier, quien además de ser un excelente compañero y dedicar varias horas a las biodistribuciones, se ha convertido en un gran amigo. Con todos ellos he pasado muchísimas horas y espero poder seguir haciéndolo en el futuro.

Gracias también a todos mis compañeros del Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias: Paola, Alicia, Natalia, Mariana, Lorena, Mauricio, Luis, Guzmán, Virginia, Williams, Gastón, Javier, Diego, Renata, María Laura y Mercedes. Seguramente me olvido de alguien. Fueron una ayuda invaluable en el laboratorio, aprendí mucho de cada uno y creo que nos divertimos bastante en el camino.

Gracias a todos mis amigos, a los que están lejos y a los que me han aguantado de cerca. Es imposible nombrarlos porque afortunadamente, son muchos. Son parte de todo este proceso.

Y por último, agradezco profundamente a quienes estuvieron y estarán conmigo incondicionalmente: mi familia, en especial a mis padres y a Valen, mi hermana. Nada de lo que he conseguido podría haberlo logrado sin ellos. Gracias por el apoyo, por el ánimo, por las palabras de aliento cuando las precisé y por compartir la alegría de los logros cuando llegaron.