



Centro Uruguayo de Imagenología Molecular



FACULTAD DE
QUÍMICA



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM)
Facultad de Química – Universidad de la República (Udelar)**

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**Radiomarcado de péptidos derivados de
minigastrina para diagnóstico y terapia de tumores
que sobreexpresan el receptor gastrina/CCK2**

Lic. Quím. Victoria Andrea Trindade Ferré

Directora de tesis: Dra. Henia Balter

**Montevideo, Uruguay
Abril, 2021**

*A mis adorados padres y amado Alejandro,
por su apoyo eterno y paciencia infinita.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Henia Balter por realizar la tutoría de esta tesis de Doctorado.

Al Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) de la Facultad de Ciencias, UdelaR por permitir el inicio de esta tesis en sus instalaciones, así como al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) por permitir la realización de la casi totalidad de este trabajo de tesis en sus instalaciones. Agradezco a ambas instituciones por brindar todos los materiales y equipamientos necesarios.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de movilidad otorgada, que me permitió realizar una valiosa capacitación en el campo de la Imagenología Molecular. Esta pasantía de tres meses en la Universidad de Uppsala, Suecia, a cargo del Prof. Dr. Bengt Långström, me introdujo en el vasto mundo de los radiotrazadores PET.

Al Prof. Dr. Henry Engler y al Prof. Dr. Bengt Långström, junto a todo su equipo humano de la Universidad de Uppsala, por su gran apoyo y dedicación en la capacitación antes mencionada.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por otorgar las primeras moléculas peptídicas utilizadas en este trabajo.

Al OIEA, MURR, Perkin Elmer e ITG por la donación de partidas de Lutecio-177 utilizadas en parte de las marcaciones.

A la Lic. Bq. Elena Vasilskis por su monumental colaboración en el trabajo con células, tanto en los ensayos *in vitro* como en el desarrollo de tumores *in vivo*.

A la Dra. Patricia Oliver y la MSc. Laura Reyes por la planificación del trabajo con animales. Asimismo agradezco nuevamente a Laura y además a la TRI Andrea Paolino por la realización de las imágenes PET/CT y su enorme ayuda en la realización de las biodistribuciones.

A Marcelo Fernández por su colaboración en la realización de las primeras biodistribuciones en el CIN.

A la MSc. Natalí Bentancor por su gran ayuda en el análisis de datos de los estudios *in vitro* e *in vivo*. Gracias por las valiosas discusiones académicas y el apoyo emocional diario, como compañera y amiga.

A mis ex-compañeros de CUDIM, Inés, Stefanía, Camilo y Pablo, y a mis actuales compañeros, Ingrid, Florencia, Omar, Javier, Andrea y Lucía.

Un agradecimiento especial a la MSc. Soledad Fernández, con quien compartí tres meses muy intensos en Suecia, que nos unió en esta vida, tanto en lo académico como en lo personal. Siempre te recordaré Sole.

A mi familia y amigos, por tenerme tanta paciencia en este camino tan largo.

Por último, un eterno agradecimiento a mis padres y a Ale, por su apoyo incondicional y constante, por la paciencia y por confiar en mí, los adoro. Papá, siempre estarás conmigo.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	VII
2. RESUMEN	IX
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
3.1. CÁNCER.....	1
3.2. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER	3
3.2.1. <i>Diagnóstico del cáncer en Medicina Nuclear</i>	5
3.2.1.1. SPECT	6
3.2.1.2. PET	8
3.3. TERAPIA DEL CÁNCER.....	12
3.3.1. <i>Terapia radionucleídica dirigida</i>	13
3.4. RADIOFÁRMACOS MOLECULARMENTE DIRIGIDOS A TUMOR	16
3.4.1. <i>Péptidos radiomarcados</i>	19
3.4.2. <i>Quelantes bifuncionales</i>	23
3.4.2.1. Quelantes acíclicos basados en poliaminopolicarboxilatos	26
3.4.2.2. Quelantes macrocíclicos basados en poliaminopolicarboxilatos	28
3.4.3. <i>Teragnóstica (Theragnostics)</i>	32
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	38
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA.....	40
5.1. GASTRINA Y COLECISTOQUININA (CCK)	40
5.2. RECEPTORES DE COLECISTOQUININA (CCKR)	41
5.3. EXPRESIÓN DE CCK2R EN TUMORES HUMANOS	43
5.4. CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES (MTC).....	45
5.5. RADIOPÉPTIDOS DE CCK Y GASTRINA DIRIGIDOS A TUMORES CCK2R POSITIVOS	48
6. CAPÍTULO I: MARCACIÓN CON GALIO-68.....	56
6.1. INTRODUCCIÓN	56
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	65
6.2.1. <i>Materiales</i>	65
6.2.2. <i>Equipos</i>	66
6.2.3. <i>Métodos analíticos</i>	66
6.2.3.1. Análisis por HPLC.....	66
6.2.3.2. Análisis por TLC	68
6.2.4. <i>Oxidación de DOTA-H2-MG11</i>	69
6.2.5. <i>Marcación inicial de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11</i>	70
6.2.6. <i>Optimización de la marcación de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11</i>	72
6.2.6.1. Actividad y temperatura de marcación.....	72
6.2.6.2. Agregado de antioxidantes	72
6.2.6.3. Masa de DOTA-H2-MG11.....	75
6.2.6.4. Tiempo de marcación.....	77
6.2.6.5. pH de marcación	77
6.2.7. <i>Optimización de la purificación de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11</i>	79
6.2.8. <i>Preparación de impurezas marcadas con ⁶⁸Ga</i>	80
6.2.8.1. Marcación de [⁶⁸ Ga]Ga-DOTA	80

6.2.8.2.	Oxidación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$	81
6.2.9.	<i>Estudios biológicos primarios</i>	83
6.2.9.1.	Ensayos <i>in vitro</i>	83
6.2.9.2.	Ensayos <i>in vivo</i>	85
6.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
6.3.1.	<i>Métodos analíticos</i>	91
6.3.1.1.	Análisis por HPLC (determinación del % relativo de las especies no coloidales).....	91
6.3.1.2.	Análisis por TLC (determinación del % real de coloide)	93
6.3.1.3.	Análisis global (determinación del % real de cada especie)	96
6.3.2.	<i>Oxidación de DO2-H2-MG11</i>	98
6.3.3.	<i>Marcación inicial de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	101
6.3.4.	<i>Optimización de la marcación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	103
6.3.4.1.	Actividad y temperatura de marcación	103
6.3.4.2.	Agregado de antioxidantes	107
6.3.4.3.	Masa de DO2-H2-MG11.....	119
6.3.4.4.	Tiempo de marcación.....	120
6.3.4.5.	pH de marcación	121
6.3.5.	<i>Optimización de la purificación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	123
6.3.6.	<i>Preparación de impurezas marcadas con ^{68}Ga</i>	127
6.3.6.1.	Marcación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2$	127
6.3.6.2.	Oxidación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$	128
6.3.7.	<i>Estudios biológicos primarios</i>	133
6.3.7.1.	Ensayos <i>in vitro</i>	133
6.3.7.2.	Ensayos <i>in vivo</i>	134
6.4.	CONCLUSIONES	144
7.	CAPÍTULO II: MARCACIÓN CON LUTECIO-177	148
7.1.	INTRODUCCIÓN	148
7.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	156
7.2.1.	<i>Materiales</i>	156
7.2.2.	<i>Equipos</i>	156
7.2.3.	<i>Métodos analíticos</i>	157
7.2.3.1.	Análisis por HPLC.....	157
7.2.3.2.	Análisis por TLC	158
7.2.4.	<i>Marcación inicial de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	158
7.2.5.	<i>Optimización de la marcación de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	159
7.2.5.1.	Tiempo de marcación.....	159
7.2.5.2.	Masa de DO2-H2-MG11.....	160
7.2.5.3.	Buffer ASAG y temperatura de marcación	160
7.2.5.4.	Agregado de L-metionina como antioxidante.....	161
7.2.6.	<i>Marcación de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2$</i>	163
7.2.7.	<i>Efecto de los antioxidantes en la marcación de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	163
7.2.8.	<i>Efecto del pH de marcación en presencia de ácido gentísico</i>	165
7.2.9.	<i>Purificación final de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	166
7.2.10.	<i>Estudios biológicos primarios</i>	167
7.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	168
7.3.1.	<i>Métodos analíticos</i>	168
7.3.1.1.	Análisis por HPLC (determinación del % relativo de las especies no coloidales).....	168
7.3.1.2.	Análisis por TLC (determinación del % real de coloide)	169
7.3.1.3.	Análisis global (determinación del % real de cada especie)	170
7.3.2.	<i>Marcación inicial de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	171
7.3.3.	<i>Optimización de la marcación de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}2\text{-H}2\text{-MG}11$</i>	173

7.3.3.1.	Tiempo de marcación.....	173
7.3.3.2.	Masa de DOTA-H2MG11	173
7.3.3.3.	Buffer ASAG y temperatura de marcación	175
7.3.3.4.	Agregado de L-metionina como antioxidante.....	178
7.3.4.	<i>Marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA</i>	182
7.3.5.	<i>Efecto de los antioxidantes en la marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11</i>	184
7.3.6.	<i>Efecto del pH de marcación en presencia de ácido gentísico</i>	191
7.3.7.	<i>Purificación final de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11</i>	201
7.3.8.	<i>Estudios biológicos primarios</i>	202
7.4.	CONCLUSIONES	205
8.	CONSIDERACIONES FINALES	208
9.	CONCLUSIONES GENERALES	214
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	217
	APÉNDICE 1: FIGURAS	229
	APÉNDICE 2: DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	230

1. ABREVIATURAS

A _m	Actividad molar
A _s	Actividad específica
AG	Ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico)
BD	Biodistribución
BGO	Germanato de bismuto
c.a.	Con agregado de portador
Ca	Carcinoma
CCK	Colecistoquinina
CCK2R	Receptores de colecistoquinina subtipo 2
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CoA	Certificado de análisis
CT	Tomografía computarizada
CUDIM	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
dc	Corregido por decaimiento
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DS	Desvío estándar
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
EC	Captura electrónica
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GI	Gastrointestinal
GIST	Tumor del estroma gastrointestinal
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSO	Ortosilicato de gadolinio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IT	Transición isomérica
LET	Transferencia lineal de energía
LSO	Ortosilicato de lutecio
LYSO	Ortosilicato de lutecio-itrinio
MG	Minigastrina
MRI	Resonancia magnética
MTC	Carcinoma medular de tiroides

n.c.a.	Sin agregado de portador
ndc	No corregido por decaimiento
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PET	Tomografía por emisión de positrón
p.i.	Post-inyección
PMTs	Tubos fotomultiplicadores
PRRT	Terapia radionucleídica de receptor peptídico
R _f	Relación de frente
SCLC	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
sst	Subtipo de receptor de somatostatina
T _{1/2}	Período de semidesintegración
T.A.	Temperatura ambiente
TETA	Ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TKR	Receptor de tirosina quinasa
TLC	Cromatografía en capa fina
Tu	Tumor
t _R	Tiempo de retención
T/NT	Relación blanco/no blanco
US	Ultrasonido

2. RESUMEN

La Imagenología Molecular en Oncología puede definirse como la caracterización y medición *in vivo* de biomoléculas clave y eventos de base molecular que son fundamentales para el estado maligno. Específicamente, investiga moléculas anormales así como interacciones aberrantes de biomoléculas alteradas que son la base de la neoplasia. Para ello, se están investigando muchos parámetros de la función celular como posibles dianas o blancos de biomarcadores de imagen. Uno de estos parámetros es la expresión de receptores celulares, ya que si estos se encuentran sobreexpresados en células tumorales, son potencialmente adecuados como blanco tumoral. Los receptores de colecistoquinina subtipo 2 (CCK2), son receptores de membrana que se han encontrado sobreexpresados en cánceres estromales de ovario, astrocitomas y carcinomas de pulmón de células pequeñas. Además, de forma inesperada se han identificado con alta incidencia y densidad en el carcinoma medular de tiroides (MTC), uno de los cánceres más complejos de tratar. En particular, los pacientes con MTC metastásico cuentan con pocas opciones terapéuticas no del todo eficaces. Es por ello que la búsqueda de terapias alternativas dirigidas hacia los receptores CCK2 ha despertado cierto interés.

Uno de los ligandos naturales con mayor afinidad por los receptores CCK2 es la hormona peptídica gastrina-17 (sulfatada). Por lo cual, diferentes péptidos análogos a la gastrina han sido radiomarcados tanto para el diagnóstico (Imagenología de receptor peptídico) como para la terapia (Terapia radionucleídica de receptor peptídico), de los tumores que sobreexpresan receptores CCK2. La diferencia está en el tipo de radionucleido incorporado a la molécula, para el diagnóstico, estos péptidos son principalmente radiomarcados con radionucleidos emisores gamma o emisores de positrones, y para la terapia son radiomarcados con emisores de partículas, mayoritariamente β^- o α . Si el radionucleido para diagnóstico tiene una química similar al radionucleido para terapia, se puede marcar la misma molécula con ambos y así idealmente obtener un par teragnóstico radiofarmacéutico. De modo que el radiotrazador terapéutico se comporte *in vivo* de manera idéntica al radiotrazador de diagnóstico, para así obtener una terapia (específicamente

dirigida) basada en pruebas de diagnóstico que reconocen el mismo blanco molecular.

El presente trabajo tiene por objetivo la investigación de la química de marcación de un péptido análogo de minigastrina (H2-MG11) con dos tipos de radionucleidos, uno emisor de positrones (^{68}Ga) y otro emisor β^- (^{177}Lu), como potenciales radiofármacos para el diagnóstico y la terapia respectivamente, de diversos tumores que sobreexpresan el receptor CCK2.

La marcación se realizó a través del quelante DOTA ya conjugado al péptido H2-MG11 (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Se optimizó la incorporación de cada radionucleido en la molécula, obteniendo para ambos un valor mayor al 95%. Sin embargo la pureza radioquímica inicial de la molécula de interés muchas veces no superó el 75%, debido a la alta sensibilidad a las radiaciones ionizantes que esta presentó, probablemente debido a que 6 de sus 10 aminoácidos son susceptibles a la oxidación. Esto pudo observarse gracias a la optimización del sistema cromatográfico, donde se consiguió distinguir y cuantificar hasta 15 especies presentes en el marcado con ^{68}Ga y hasta 23 especies en el marcado con ^{177}Lu .

La impureza radioquímica con mayor relevancia fue el péptido conteniendo su residuo de metionina oxidado, lo que ocurrió en la marcación para ambos radionucleidos. En la marcación con ^{68}Ga , se evaluó el efecto del aumento de actividad, lo que incrementó esta impureza. Probablemente por la formación de más radicales libres oxidantes generados en la interacción de las radiaciones ionizantes con el agua del medio de reacción, lo que aumentaría la oxidación del residuo más sensible de la molécula, la metionina. El agregado del aminoácido L-metionina a la marcación, disminuyó en gran medida y de forma exclusiva la formación de esta impureza, por lo que evidenció un efecto antioxidante.

Se distinguieron otras impurezas radioquímicas en los marcados que fueron asignadas como "otras impurezas peptídicas". Estas se vieron incrementadas con el aumento de la temperatura de marcación para ambos radionucleidos. Posiblemente el aumento de la velocidad de reacción de la radiólisis del agua, que produce más radicales libres, y quizás también de las reacciones de estos

con la molécula marcada, generó esta gran variedad de productos secundarios, siendo estas reacciones más afectadas por la temperatura que la propia oxidación del residuo de metionina. El agregado del ácido gentísico a la marcación, disminuyó en gran medida y de forma exclusiva la formación de estas impurezas, por lo que tuvo un efecto antioxidante distinto al de la L-metionina.

El ácido gentísico impidió la generación de la mayor parte de las impurezas peptídicas a lo largo del tiempo, a excepción de la impureza principal, que aumentó inesperadamente debido a la oxidación selectiva del residuo de metionina del péptido marcado con ^{177}Lu . Esta oxidación selectiva podría ser inducida por las especies oxidantes producidas en la reacción entre el ácido gentísico y los radicales libres del agua, durante la protección del péptido radiomarcado del ataque de estas especies nocivas. La capacidad antioxidante del ácido gentísico resultó ser dependiente del pH, siendo un mejor secuestrante de radicales libres a $\text{pH} > 4.5$. Por tanto, el pH no solo sería un factor importante para la incorporación del radiometal a la molécula, sino también para la eficacia del estabilizador necesario para su protección.

La incorporación al marcado de los dos antioxidantes en las cantidades optimizadas, mejoró marcadamente la pureza radioquímica de los dos radiotrazadores, logrando atenuar y estabilizar la formación de todas las impurezas peptídicas. Sin embargo, no fue suficiente para que esta pureza superara siempre el 90%, por lo que se hizo necesaria una purificación del crudo de reacción. Se consiguió obtener un método de purificación en tres pasos por extracción en fase sólida, a través de cartucho Sep-Pak C8 light, donde se logró una pureza radioquímica superior a 90% para el marcado con ^{68}Ga y del 95% para el marcado con ^{177}Lu .

Con el fin de caracterización, se logró obtener la principal impureza marcada con ^{68}Ga (conteniendo el residuo de metionina oxidado), en una única etapa de marcación-oxidación mediante el agregado de H_2O_2 en presencia de los dos antioxidantes. Su purificación también fue optimizada en tres pasos por extracción en fase sólida, a través de cartucho Sep-Pak C8 light, donde se logró aumentar su pureza radioquímica de 78% a 90%.

La evaluación *in vitro* de la especificidad biológica se realizó tanto para el péptido H2-MG11 marcado con ^{68}Ga como para su principal impureza oxidada. En estos ensayos con células viables AR42J se obtuvo una unión específica a membrana y una internalización específica de la molécula marcada de interés, lo que indicaría una interacción específica de esta con los receptores CCK2 de las células. Sin embargo, para la impureza oxidada la unión específica a membrana se redujo, sin lograr una internalización específica (dato de un único ensayo).

La evaluación biológica *in vivo* mediante estudios de biodistribución en ratones sanos se realizó para el péptido H2-MG11 marcado con ^{68}Ga y con ^{177}Lu . Para ambos se observó una rápida depuración sanguínea con alta eliminación urinaria, además de una muy baja captación en órganos y tejidos, incluyendo el riñón. El mismo perfil se observó para el péptido marcado con ^{68}Ga en los estudios realizados en ratones Nude utilizando un modelo tumoral, donde la acumulación por gramo de tumor fue elevada. Además, esta captación del radiotrazador en el tumor se evidenció en las imágenes PET/CT realizadas. Los estudios comparativos de imágenes PET/CT con la principal impureza peptídica marcada con ^{68}Ga , mostraron una captación tumoral *in vivo* del péptido de interés significativamente mayor que la obtenida para la impureza.

Como conclusión, se ha profundizado en la química de marcación de un péptido con dos radionucleidos metálicos diferentes, utilizados recientemente como parateragnóstico, en los que se han encontrado similitudes y diferencias. El hecho de que el péptido haya presentado una alta sensibilidad a la radiación, ha sido todo un reto, lo que ha dado la oportunidad de ahondar en el uso y efecto de dos antioxidantes complementarios.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1. Cáncer

En las últimas cuatro décadas ha habido un progreso significativo en el conocimiento, diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer. Sin embargo, aunque la tasa de mortalidad por cáncer ha disminuido en los Estados Unidos de América y otros países desarrollados, la incidencia y mortalidad por esta enfermedad sigue aumentando en todo el mundo [1]. En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares, casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a este mal [2]. Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 el cáncer ocasionó 9.6 millones de defunciones a nivel mundial, prediciendo 16.4 millones para 2040. Con el crecimiento continuo y el envejecimiento de la población mundial, se estima que la carga global de nuevos casos de cáncer aumentará de 18.1 millones en 2018 a 29.5 millones para 2040 [3].

Las causas del aumento previsto en la incidencia mundial del cáncer son numerosas y están relativamente bien establecidas. Además del envejecimiento, estos incluyen: factores de riesgo en el estilo de vida, como el consumo de tabaco, la dieta y la obesidad, la falta de ejercicio, el consumo de alcohol y la exposición excesiva a la luz solar; exposiciones ambientales y ocupacionales a carcinógenos y mutágenos (incluidos los productos químicos y la radiación); agentes infecciosos (*Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr); inflamación crónica; metabolismo hormonal; historia familiar; y etnicidad y estatus socioeconómico. De hecho, en los países de ingresos bajos y medios que están en transición a niveles más altos de desarrollo, la reducción de los cánceres relacionados con la infección a menudo viene acompañada por un aumento de los cánceres relacionados con la occidentalización del estilo de vida [1].

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Una característica

definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina “metástasis”, siendo las metástasis la principal causa de muerte por cáncer [4].

El comprender que el daño genético y las mutaciones genéticas puedan causar cáncer fue, posiblemente, uno de los mayores avances en investigación de la era moderna, que allanó el camino para terapias dirigidas a defectos específicos relacionados con el cáncer. Durante la década de 1970, los científicos identificaron dos familias de genes, los protooncogenes y los genes supresores de tumores, que normalmente regulan los procesos naturales de crecimiento y muerte celular en tejidos y órganos sanos. Los oncogenes son la forma mutada de los protooncogenes, que codifican proteínas defectuosas involucradas en la génesis y diseminación de tumores. Los genes supresores de tumores generalmente controlan los programas moleculares que regulan negativamente la proliferación celular. Cuando su función de guardián se ve alterada por mutaciones, el crecimiento y la proliferación de las células se descontrola. Investigaciones posteriores establecieron que los tumores son más que masas insulares de células cancerosas en proliferación, haciéndose evidente que las contribuciones del micro entorno del tumor influyen en gran medida en la carcinogénesis, por lo cual, estos se deben ver como tejidos complejos compuestos de múltiples tipos de células distintas que interactúan entre sí [1].

El estudio de la genómica del cáncer ha dejado en claro que el cáncer no es una única enfermedad, los tumores son extremadamente heterogéneos, con más de 200 tipos y subtipos diferentes reconocidos actualmente. Esto ha provocado un cambio de paradigma en el estándar de asistencia al paciente, alejándose de un enfoque de “talla única” para todos y orientándose hacia una terapia individual o "a medida" en la que las decisiones del tratamiento se basan en el panorama mutacional del tumor del paciente. Este enfoque, comúnmente conocido como medicina personalizada contra el cáncer o medicina de precisión, todavía se encuentra en su desarrollo inicial, pero claramente representa el futuro de la atención del cáncer [1].

3.2. Diagnóstico del cáncer

No existe una prueba de imagen única que pueda diagnosticar con precisión el cáncer. Una evaluación completa generalmente requiere una historia clínica detallada y un examen físico junto con pruebas de diagnóstico. Se necesitan muchas pruebas para determinar si una persona tiene cáncer o si otra afección (como una infección) imita los síntomas del cáncer. Las pruebas diagnósticas efectivas se utilizan para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad, controlar el proceso de la misma, planificar el tratamiento y evaluar su efectividad. Se pueden hacer exámenes de estadificación para determinar la extensión del cáncer y si se ha diseminado, o exámenes para evaluar el pronóstico o para seleccionar terapias específicas. Los procedimientos de diagnóstico para el cáncer pueden incluir imágenes, pruebas de laboratorio (incluidas las pruebas de marcadores tumorales), biopsia de tumor, examen endoscópico o pruebas genéticas. Al momento, una prueba de imagen por sí sola no puede diagnosticar el cáncer, para su confirmación se requiere una biopsia o análisis de tejido o sangre involucrados [5]. De todas formas, la imagenología biomédica es uno de los pilares principales de la atención integral del cáncer. Esto es debido a que posee muchas ventajas, entre ellas el monitoreo en tiempo real, la accesibilidad sin destrucción de tejidos, la invasividad mínima o nula y el hecho de poder funcionar en amplios rangos de escalas de tiempo y tamaño involucrados en los procesos biológicos y patológicos. Las escalas de tiempo van desde milisegundos para la unión de proteínas y reacciones químicas, hasta años para enfermedades como el cáncer. Las escalas de tamaño van de molecular a celular, a órgano y a organismo completo. Las imágenes biomédicas desempeñan un papel cada vez más importante en todas las fases del manejo del cáncer. Estas incluyen la predicción, el cribado (“screening”), la guía de la biopsia para detección, la estadificación, el pronóstico, la planificación de la terapia, la guía de la terapia, la respuesta a la terapia, la recurrencia y la paliación [6].

La imagenología biomédica es la ciencia y la rama de la medicina que se ocupa del desarrollo y uso de dispositivos y técnicas de imagen para obtener imágenes anatómicas internas y para proporcionar análisis bioquímicos y fisiológicos de tejidos y órganos. El campo de la imagen biomédica utiliza

tecnologías avanzadas para capturar, almacenar, analizar y mostrar imágenes a nivel orgánico, tisular, celular y molecular [7]. Las modalidades tales como la tomografía computarizada (CT: Computed x-ray Tomography), la resonancia magnética (MRI: Magnetic Resonance Imaging) y el ultrasonido (US: Ultrasound) permiten obtener imágenes anatómicas a una resolución espacial cada vez mayor, que proporcionan información sobre la ubicación y el tamaño del tumor, si está confinado o se ha diseminado a ganglios linfáticos, o si está implicada alguna estructura anatómica crítica que altere la estrategia de tratamiento. Aunque estos métodos aún representan el pilar de la imagen clínica, típicamente detectan cánceres cuando tienen un diámetro de un centímetro o más, punto en el cual ya constan de más de 10^9 células. Por lo cual, existe un gran incentivo en desarrollar tecnologías que detecten el cáncer en etapas más tempranas. En la mayoría de los casos, la detección de cánceres en etapa 1 se asocia con una tasa de supervivencia de 5 años mayor al 90% de los pacientes, y cuando las lesiones se detectan incluso antes (en la etapa premaligna), el tratamiento suele ser curativo. Se espera que dentro de la imagenología biomédica, la Imagenología Molecular desempeñe un papel importante en este sentido, proporcionando información molecular y fisiológica, lo que permitiría monitorear con sensibilidad y especificidad blancos moleculares clave y respuestas del huésped asociadas con eventos tempranos en la carcinogénesis [8]. En contraste, las imágenes de diagnóstico "clásicas" reflejan principalmente la manifestación avanzada del cáncer. Con el tiempo, la imagenología biomédica se volverá cada vez más multimodal, ya que diferentes técnicas de imagen molecular y anatómica pueden complementarse entre sí [9].

La Imagenología Molecular en Oncología puede definirse como la caracterización y medición *in vivo* de biomoléculas clave y eventos de base molecular que son fundamentales para el estado maligno. Esta definición deliberadamente amplia, incorpora características tanto celulares como moleculares del fenotipo del cáncer. Específicamente, investiga moléculas anormales así como interacciones aberrantes de biomoléculas alteradas que son la base de la neoplasia. Para ello, se están investigando muchos parámetros de la función celular como posibles dianas o blancos de biomarcadores de imagen. Estos parámetros incluyen el metabolismo celular, la proliferación celular, la biosíntesis de péptidos y membranas, la expresión de

receptores, la hipoxia, la angiogénesis, la apoptosis y la transfección de genes. La mayoría de los biomarcadores de imagen consisten en sondas exógenas (que se introducen al paciente) y proporcionan una señal de imagen o contraste (exterior al paciente). Su diseño incluye un componente de direccionamiento (por ejemplo un anticuerpo, péptido o molécula pequeña) y un componente de señalización (por ejemplo un radionucleido, un fluorocromo o un quelato paramagnético) [9].

3.2.1. Diagnóstico del cáncer en Medicina Nuclear

La Medicina Nuclear siempre ha involucrado imágenes moleculares. Esta utiliza biomarcadores que combinan un átomo radiactivo (señal detectable) con una molécula de importancia fisiológica, pudiendo así evaluar muchos parámetros diferentes de la función celular [10]. Estos biomarcadores son denominados radiofármacos y describen la fisiología, la bioquímica o la patología en el cuerpo sin causar ningún efecto fisiológico. Se les conoce como radiotrazadores (radiotracers) porque se administran en dosis subfarmacológicas que "rastrear" ("trace") un proceso fisiológico o patológico particular en el cuerpo [11]. El radiofármaco se administra al paciente, generalmente mediante inyección intravenosa, y se permite que transcurra el tiempo necesario para su distribución y acumulación en el blanco molecular. Luego, la radiación emitida desde el blanco molecular es detectada utilizando detectores externos al cuerpo del paciente, dispuestos en un mismo equipo que posteriormente produce la imagen. Por lo tanto, la radiación emitida tiene que atravesar diversos tejidos del paciente para detectarse externamente con cierta eficiencia, lo que limita el tipo de radiación a fotones energéticos con un rango de 50 a 600 keV, dependiendo del equipo utilizado [12]. Las modalidades utilizadas en Medicina Nuclear para la adquisición de imágenes son la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography) y la tomografía por emisión de positrón (PET: Positron Emission Tomography). Ambas técnicas presentan las ventajas de una alta sensibilidad intrínseca, una baja toxicidad y una alta capacidad de penetración, sin embargo, la resolución espacial es inferior a la de la CT o de la MRI. Por lo cual, el desarrollo de sistemas de imagen híbrida como el PET/CT y

SPECT/CT combinan la sensibilidad metabólica con la resolución espacial, mejorando de manera sustancial la calidad de las imágenes [6].

3.2.1.1. SPECT

La tecnología SPECT está diseñada para detectar fotones provenientes de rayos X o rayos gamma (γ), por lo cual, para la realización del estudio se administran radiotrazadores que contengan átomos radiactivos que decaigan por captura electrónica o posean emisión gamma. El equipo contiene una cámara gamma constituida básicamente por un colimador, un cristal de centelleo (comúnmente NaI), un arreglo de tubos fotomultiplicadores (PMTs) y un sistema computarizado (Figura 1). Sólo los fotones que atraviesan los pequeños orificios del colimador pueden ser detectados. El detector es un cristal de centelleo que produce fotones de luz al absorber la radiación ionizante. Estos fotones de luz entran a los tubos fotomultiplicadores donde originan la emisión y multiplicación de electrones, convirtiéndose en una corriente eléctrica que luego es procesada por un sistema computarizado para reconstruir una imagen planar [12]. La adquisición de un conjunto de vistas planares alrededor de una región del cuerpo, para lo cual la cámara gamma gira alrededor del paciente, permite la obtención de imágenes tridimensionales gracias a la reconstrucción realizada por el sistema computarizado, mejorando así el contraste y la definición de la imagen [13].

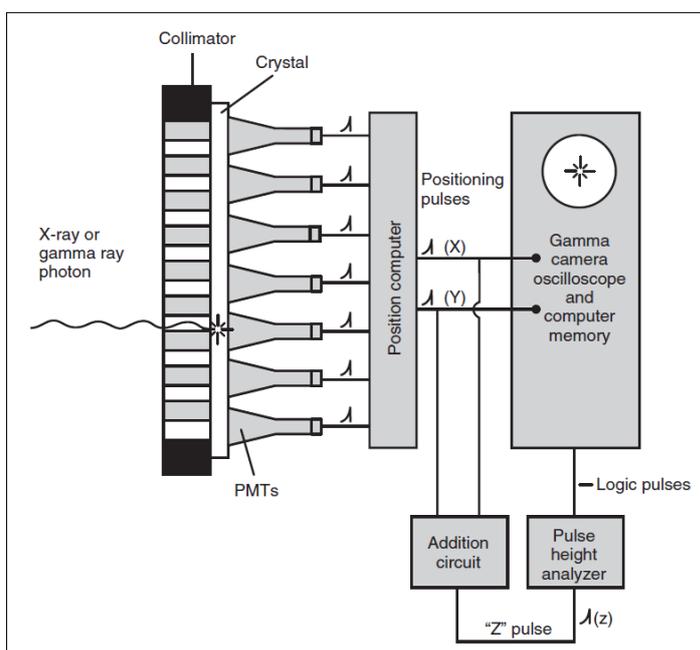


Figura 1. Esquema de una cámara gamma [12].

En Uruguay se cuenta con la modalidad SPECT desde el año 1982, cuando el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas recibió una cámara rotatoria a través del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), lo que permitió un importante avance en la Medicina Nuclear de nuestro país que había surgido en la década del 60 [14].

Los radionucleidos comúnmente utilizados en la clínica se producen artificialmente por fisión nuclear o mediante el bombardeo de materiales estables por neutrones o partículas cargadas. Los mejores resultados en SPECT se obtienen cuando se utilizan radionucleidos emisores de fotones con energías entre 100 y 200 keV. Su período de semidesintegración ($T_{1/2}$) debe ser lo suficientemente largo para la aplicación prevista, generalmente unas pocas horas. Algunos radionucleidos de uso común en la práctica clínica se resumen en la Tabla 1 [11].

Tabla 1. Características físicas de radionucleidos usados en SPECT.

Radio-nucleido	Modo de decaimiento principal	$T_{1/2}$	Energía principales fotones en keV (% abundancia)	Método de producción
^{99m}Tc	IT	6.0 h	140 (89%)	Generador (^{99}Mo)
^{123}I	EC	13.2 h	159 (83%)	Ciclotrón
^{111}In	EC	2.8 d	171 (90%) 245 (94%)	Ciclotrón
^{67}Ga	EC	3.3 d	93 (37%) 185 (20%) 300 (17%) 395 (5%)	Ciclotrón
^{131}I	β^-	8.0 d	364 (81%)	Reactor

IT= transición isomérica, EC= captura electrónica.

El Tecnecio-99m (^{99m}Tc) es el más comúnmente utilizado en imágenes SPECT debido a que reúne muchas características favorables tales como, la energía adecuada de su principal fotón gamma (140 keV), un $T_{1/2}$ casi ideal (6 horas) que permite realizar muchos estudios clínicos y una amplia disponibilidad a partir de generadores comerciales de Molibdeno-99 / Tecnecio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), que en combinación con los kits comerciales que contienen el precursor y los reactivos adecuados, facilitan la preparación *in situ* del radiofármaco en los centros de Medicina Nuclear [11].

Un sistema generador de radionucleidos contiene un radionucleido padre adsorbido en una columna cromatográfica. Este decae a un radionucleido hijo, que posee un $T_{1/2}$ menor al del padre, de manera de poder establecer un equilibrio radiactivo. Luego, aprovechando el hecho de que ambos radionucleidos son elementos distintos y por tanto poseen distintas propiedades físico-químicas, se separa de forma selectiva al radionucleido hijo del radionucleido padre por medio de la elución del generador. Esto sucede gracias al pasaje de un solvente adecuado a través de la columna cromatográfica que mantiene adsorbido al radionucleido padre mientras extrae al radionucleido hijo. De esta manera es posible disponer fácilmente del radionucleido hijo varias veces al día según se necesite.

3.2.1.2. PET

La modalidad PET implica la utilización de radiotrazadores con radionucleidos emisores de positrones (β^+). El positrón es eyectado del núcleo inestable (con defecto de neutrones) y transita por el tejido perdiendo energía en su trayecto hasta que se encuentra con un electrón del medio (distancia llamada rango del positrón), produciéndose el proceso de aniquilación, en el cual se producen dos fotones de 511 keV de energía emitidos en direcciones opuestas (Figura 2(a)) [15]. Estos fotones de alta energía salen del tejido y son registrados por muchos detectores acoplados a tubos fotomultiplicadores. Los detectores son cristales de centelleo arreglados en forma de anillo alrededor del paciente, de manera de contabilizar sólo los fotones reconocidos al mismo tiempo (“en coincidencia”) por detectores opuestos (Figura 2(b)). Esta “coincidencia” comprende una pequeña ventana de aceptación de tiempo, que va de 10-12 ns para detectores de cristales de BGO (germanato de bismuto) a 5-6 ns para los materiales más nuevos de detección, como cristales de LSO (ortosilicato de lutecio), LYSO (ortosilicato de lutecio-itrinio) o GSO (ortosilicato de gadolinio). Luego, los eventos registrados son reconstruidos en imágenes, gracias a un sistema computarizado, representando una distribución tridimensional de la radiactividad en el paciente [13].

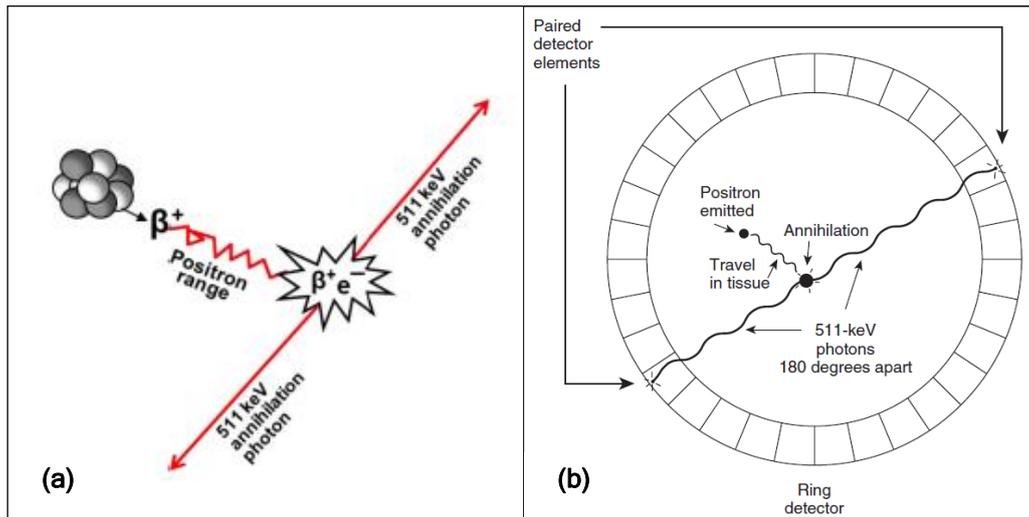


Figura 2. Representación esquemática de la modalidad PET. **(a)** Proceso de aniquilación del positrón con la emisión de dos fotones de 511 keV [15]. **(b)** Detección de los fotones reconocidos en coincidencia por detectores opuestos [13].

Nuestro país cuenta con la tecnología PET desde que se inauguró el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) en el año 2010. Esto planteó un gran desafío en cuanto al inicio de la producción de radionucleidos y radiofármacos emisores de positrones, y permitió otro enorme avance en la Medicina Nuclear del Uruguay.

Una de las ventajas del PET es que presenta una mayor sensibilidad, de al menos 100 veces con respecto a las imágenes de medicina nuclear convencional, lo que explica la mayor calidad de imagen en comparación con el SPECT. Esto es debido a que no necesita de colimadores absorbentes para determinar la direccionalidad del evento detectado, mientras que el SPECT sí los necesita [13]. Estos colimadores absorben los fotones que no se dirigen en la dirección correcta (paralela a los ejes de sus orificios), permitiendo el pasaje de muy pocos, generalmente sólo el 0.01% de los fotones emitidos por una fuente radiactiva alcanza los detectores que luego son incorporados a la imagen [12]. En tanto, la detección por coincidencia en la aniquilación del PET proporciona una “colimación electrónica”, ya que si un único evento es detectado pero no emparejado por otro evento a 180°, dentro de la ventana de tiempo de coincidencia, el dato es descartado. Esto hace que no sea necesaria la colimación absorbente, detectando mayor cantidad de fotones y aumentando así la sensibilidad del método (Figura 3) [13].

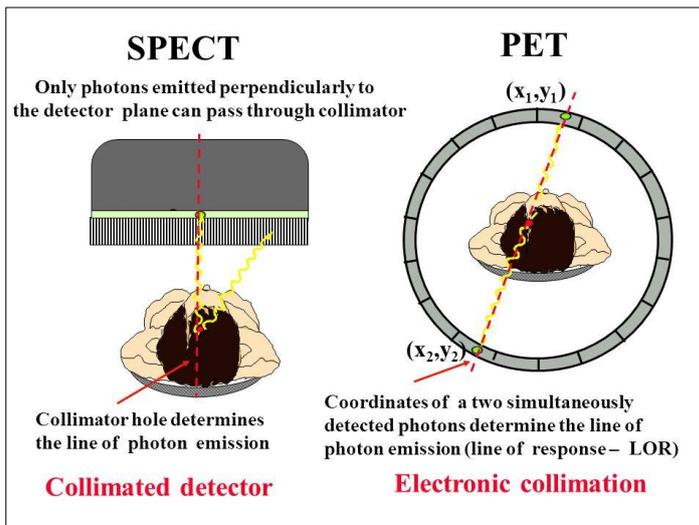


Figura 3. Colimación absorbente en SPECT vs. colimación electrónica en PET [16].

Otra ventaja del PET sobre el SPECT es que posee una mayor resolución espacial, aunque el PET también presenta sus limitaciones. Una de estas limitaciones está relacionada con la energía cinética con la que los positrones son emitidos, siendo distinta en cada radionucleido (Tabla 2). Los positrones más energéticos como los emitidos por el Rubidio-82 (^{82}Rb), el Galio-68 (^{68}Ga) y el Oxígeno-15 (^{15}O) pueden viajar varios milímetros en el tejido antes de producirse la aniquilación (mayor rango del positrón).

Tabla 2. Características físicas de radionucleidos emisores de positrones [11].

Radio-nucleido	$T_{1/2}$ (min)	Energía máxima del positrón (MeV)	Rango del positrón en tejido blando (mm)	Método de producción
^{82}Rb	1.3	3.38	15.0	Generador (^{82}Sr)
^{68}Ga	67.8	1.90	8.1	Generador (^{68}Ge)
^{15}O	2.0	1.73	7.3	Ciclotrón
^{13}N	10.0	1.20	5.4	Ciclotrón
^{11}C	20.4	0.96	4.1	Ciclotrón
^{18}F	109.7	0.63	2.4	Ciclotrón

Por lo tanto, la ubicación del evento de aniquilación está a cierta distancia de la ubicación real del radionucleido emisor, este recorrido en el tejido degrada la capacidad de localizar verdaderamente la biodistribución del agente radioactivo en el paciente y da como resultado imágenes con una resolución más pobre [13]. A esto se le suma el hecho de que los positrones emitidos por cada radionucleido no son monoenergéticos, sino que presentan un espectro continuo de energía, por lo cual la distancia que recorren los positrones en el

tejido varía desde cero hasta su máximo (rango del positrón), lo que contribuye a una menor resolución de imagen. Por tanto, una mayor resolución espacial se obtiene con positrones menos energéticos, y es en tal sentido que el Flúor-18 (^{18}F) es el radionucleido ideal. Sin embargo, la producción de ^{18}F , así como de la mayoría de los radionucleidos emisores de positrones, y su posterior incorporación a moléculas para la obtención de los radiofármacos PET es costosa y compleja. Esta tecnología requiere de un ciclotrón (acelerador de partículas) para la producción del radionucleido y su envío a equipos de manipulación radioquímica automatizada relativamente complejos para la síntesis de los radiotrazadores [11]. Esta complejidad es en gran parte debida al $T_{1/2}$ relativamente corto (minutos) de estos átomos radiactivos, lo que hace necesario comenzar con cantidades muy altas de los mismos para producir actividades adecuadas de los radiofármacos en un tiempo lo más corto posible, lo que dependerá de la complejidad (y el rendimiento) del proceso radioquímico. Es por eso que se utilizan módulos de síntesis automáticos dentro de celdas blindadas (hot cells) de manera de asegurar la protección radiológica del operador y del ambiente durante la producción. Además, este $T_{1/2}$ relativamente corto restringe el uso de estos radiofármacos sólo a los centros clínicos donde se producen, permitiendo a lo sumo la distribución de radiofármacos de ^{18}F (con un $T_{1/2}$ relativamente largo de casi 2 horas) a centros clínicos cercanos. Por otro lado, una pequeña cantidad de radionucleidos emisores de positrones se puede obtener de forma más simple mediante un sistema generador, como por ejemplo el ^{68}Ga a través del generador de Germanio-68 / Galio-68 ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$). La incorporación del radionucleido en las moléculas precursoras se realiza de manera bastante más directa, sencilla y eficiente, a través de un módulo de síntesis automático o semi-automático conectado directamente al generador, necesitando de una infraestructura menor y haciendo así menos costoso el estudio. Esto permite realizar estudios PET en centros médicos que no cuentan con ciclotrón y además enriquecer el arsenal radiofarmacéutico en los centros donde sí cuentan con este acelerador.

Por último, desde sus inicios el PET ha sido desarrollado con la capacidad intrínseca de producir imágenes cuantitativas, es decir, de permitir medir la concentración regional del radiotrazador (en unidades de kBq/mL). Esta característica confiere la posibilidad de monitorear la respuesta durante la

terapia o incluso evaluar la respuesta potencial antes de la terapia, indispensable para el desarrollo de la medicina de precisión [17]. El renovado interés en esta cuantificación condujo a ciertos avances tecnológicos que permiten hoy en día también producir imágenes SPECT cuantitativas. Las mejoras realizadas en el proceso de reconstrucción y las correcciones aplicadas a la atenuación y dispersión de fotones, entre otras, están conduciendo a que esta tecnología, que hasta hace un tiempo no tenía la posibilidad de cuantificar imágenes, sí la tenga, a partir de los nuevos equipos SPECT/CT [18, 19].

3.3. Terapia del cáncer

La cirugía y la radioterapia externa son las principales modalidades de tratamiento utilizadas para tumores primarios y metástasis grandes. La quimioterapia se utiliza para la enfermedad diseminada y puede ser curativa en casos de linfomas, tumores testiculares y tumores en el grupo pediátrico o en tumores sólidos cuando se emplea en combinación con otras modalidades. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, no existe un tratamiento curativo disponible para los grupos cuantitativamente grandes de pacientes con adenocarcinomas diseminados (por ejemplo, tumores de mama, próstata, colorrectal, pulmón y ovario) y carcinomas de células escamosas (por ejemplo, tumores de pulmón, esófago y cabeza y cuello). Para la mayoría de estos pacientes, la quimioterapia puede lograr un efecto paliativo y/o una supervivencia prolongada en el mejor de los casos. Esto también es cierto para los gliomas malignos y varios otros tipos de tumores diseminados, como melanomas malignos y tumores neuroendocrinos. Por lo tanto, otras modalidades de tratamiento, o complementarias, parecen ser necesarias para lograr mejoras considerables en el tratamiento de los tipos comunes de enfermedades malignas diseminadas, por ejemplo, inmunoterapia, terapia anti-angiogénica, terapia génica o terapia radionucleídica, o posiblemente combinaciones de estas [20].

3.3.1. Terapia radionucleídica dirigida

La terapia con radionucleidos es un método potencialmente poderoso para erradicar células tumorales diseminadas y metástasis pequeñas. Los tumores voluminosos y las metástasis grandes en general se tratan con cirugía, radioterapia externa o quimioterapia antes de que las células tumorales restantes puedan tratarse razonablemente con esta terapia utilizada en la Medicina Nuclear [20]. La terapia radionucleídica dirigida (Targeted Radionuclide Therapy) emplea radiofármacos terapéuticos, diseñados a partir de una molécula dirigida al tumor (por ejemplo un anticuerpo, péptido o molécula pequeña) que es marcada previamente con un radionucleido adecuado para terapia. Estos tipos de radionucleidos son emisores de partículas cargadas (alfa: α , beta: β^- , electrones Auger y/o electrones de conversión) que depositan una alta dosis de radiación localizada en las células tumorales (donde han sido dirigidos) de manera de producir una acción citotóxica en las mismas [21]. Los distintos tipos de partículas emitidas depositan diferente energía por unidad de distancia atravesada, o sea poseen distinta transferencia lineal de energía (Linear Energy Transfer: LET).

Las partículas α son las más pesadas (núcleos de Helio), por lo cual son las que depositan mayor energía por unidad de distancia (mayor LET), produciendo mayor efecto ionizante en su recorrido y por lo tanto un mayor efecto biológico. Esta mayor actividad citotóxica se produce en un corto alcance, por lo cual los radionucleidos emisores α son potencialmente atractivos en lesiones conteniendo pocas células, como por ejemplo en pequeñas micrometástasis [22]. El principal problema es el $T_{1/2}$ relativamente corto de la mayoría de los emisores alfa que se pueden obtener a un costo razonable, como por ejemplo el Astat-211 (^{211}At) con $T_{1/2} = 7.2$ h, el Bismuto-212 (^{212}Bi) con $T_{1/2} = 60.6$ min y el Bismuto-213 (^{213}Bi) con $T_{1/2} = 45,6$ min. La mayor parte de los radionucleidos decaería cuando el radiofármaco aún estuviera fuera del tumor y posiblemente contribuiría a la irradiación de tejidos sanos, como por ejemplo la médula ósea. Para superar el problema del $T_{1/2}$ corto, se ha propuesto el concepto de generadores *in vivo*, donde se utiliza un emisor alfa de $T_{1/2}$ largo, como por ejemplo Actinio-225 (^{225}Ac) con $T_{1/2} = 10$ días o Torio-227 (^{227}Th) con $T_{1/2} = 18.7$

h, que se desintegra generando una cadena de radionucleidos hijos emisores α de $T_{1/2}$ corto [21].

En tanto, las partículas β^- poseen un alcance (recorrido) mayor, ya que se trata de partículas más livianas (electrones), teniendo así menor LET y por tanto menor actividad citotóxica directa. Los radionucleidos emisores β^- se clasifican según la energía de emisión del electrón, obteniendo así emisores beta de alta, media y baja energía (Tabla 3).

Tabla 3. Características físicas de radionucleidos emisores beta [21].

Radio-nucleido	$T_{1/2}$ (días)	Energía media del electrón (MeV)	Rango medio del electrón (mm)	Energía principales fotones en keV (% abundancia)
Emisores beta de alta energía				
^{90}Y	2.7	0.935	3.9	-
^{188}Re	0.71	0.764	3.5	155 (15%)
^{166}Ho	1.1	0.666	3.2	80 (7%)
Emisores beta de media energía				
^{186}Re	3.7	0.362	1.8	137 (9%)
^{153}Sm	1.9	0.229	1.2	103 (30%)
Emisores beta de baja energía				
^{131}I	8.0	0.181	0.91	364 (82%)
^{67}Cu	2.6	0.141	0.71	91 (7%) 93 (16%) 185 (49%)
^{177}Lu	6.7	0.133	0.67	113 (6%) 208 (11%)

La energía más alta proporciona un LET más bajo porque a medida que aumenta la velocidad del electrón, la probabilidad de interacción se reduce y se deposita menos energía por unidad de longitud de trayecto recorrido. Los radionucleidos que emiten partículas beta de alta energía, son útiles para el tratamiento de tumores voluminosos y, en este caso, el largo alcance puede compensar la penetración deficiente del radiofármaco en una masa tumoral y superar una posible heterogeneidad en la expresión de la molécula blanco hacia la cual el radiofármaco haya sido dirigido, proporcionando una dosis de radiación relevante en células tumorales cercanas que no tengan unido el radiofármaco (efecto de fuego cruzado, Figura 4) [21]. Por otro lado, las partículas beta de alta energía son ineficientes para destruir células cancerosas

individuales o micrometástasis pequeñas, porque la mayor parte de la energía asociada con la desintegración radiactiva se deposita fuera de la célula maligna, produciendo daño en el tejido sano adyacente. Teniendo en cuenta que el objetivo más adecuado de la terapia con radionucleidos es el de terapia complementaria para erradicar las células tumorales residuales diseminadas y metástasis pequeñas, es que existe un interés creciente por los radionucleidos que emiten partículas beta de baja energía, como el Lutecio-177 (^{177}Lu) [21].

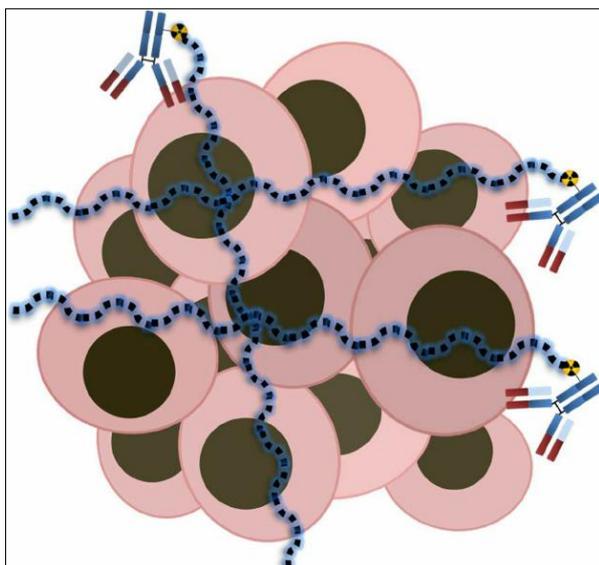


Figura 4. Efecto de fuego cruzado, útil en la destrucción de células tumorales cercanas a las que presentan unión al radiofármaco terapéutico [23].

Los electrones Auger se emiten durante el decaimiento por captura electrónica o transición isomérica, y son de baja energía por lo que también se consideran partículas adecuadas para la inactivación de células malignas individuales diseminadas. Estas partículas, debido a su alto rendimiento por desintegración, son extremadamente radiotóxicas si en su recorrido colisionan con el ADN. Entonces, hay una probabilidad muy alta de inducir una ruptura severa de doble cadena y, por lo tanto, inactivar la célula. El principal desafío en el uso de electrones Auger para la terapia es su corto alcance, lo que los hace eficientes sólo si la desintegración radiactiva ocurre cerca del ADN. Por esta razón, el radiofármaco marcado con un emisor Auger, debe internalizarse en la célula maligna, translocarse en el núcleo e, idealmente, incorporarse al ADN [21].

Aunque las micrometástasis se consideran el objetivo principal de la terapia con radionucleidos, es muy probable que en la práctica, los pacientes posean grupos tumorales de varios tamaños, como metástasis subclínicas pequeñas,

metástasis macroscópicas y tumores voluminosos. Esto significa que el uso de un solo tipo de radionucleido no sería eficiente para erradicar todas las células tumorales. Por esta razón, se ha propuesto el uso de "cócteles de radionucleidos", es decir, el uso concomitante de varios radionucleidos terapéuticos para atacar simultáneamente tumores de distinto tamaño. Para ello se necesita que la molécula dirigida al tumor pueda ser marcada con distintos radionucleidos (emisores de distintos tipos de partículas o de distinta energía de partículas), haciendo así posible la selección de "cócteles de radionucleidos" hechos a medida para cada combinación de tamaño tumoral [21].

3.4. Radiofármacos molecularmente dirigidos a tumor

A raíz de la secuenciación del genoma humano, nuestra sociedad está comenzando a cosechar los frutos de los muchos esfuerzos realizados en las últimas décadas en genómica y proteómica. El creciente conocimiento en la rica interacción entre la expresión génica y la abundancia de proteínas en las células malignas ha profundizado nuestra comprensión de la complejidad del cáncer. La imagenología molecular, la terapia dirigida y la medicina personalizada han evolucionado a partir de esto [24]. En consecuencia, los blancos tumorales mayoritariamente son proteínas de membrana con expresión aumentada en células tumorales o asociadas a tumores, tales como células malignas, células endoteliales angiogénicas o células inflamatorias. En general, todas las proteínas de membrana que se sobreexpresan en el tumor o en las células asociadas al tumor, son potencialmente adecuadas como blanco molecular. De las aproximadamente 7000 proteínas transmembrana conocidas, unas 150 están sobreexpresadas en células tumorales o vasos asociados a tumores, lo que las convierte en candidatas potenciales para la terapia dirigida o para la obtención de imágenes. Sin embargo, hay sorprendentemente poco conocimiento sobre qué blancos deben usarse para obtener resultados óptimos por tipo de tumor específico, haciendo necesario el desarrollo de sondas hechas a medida para cada tipo de tumor, lo que requiere de un conocimiento más específico sobre los blancos tumorales. Recientemente se han definido algunas características genéricas deseadas para las proteínas como blanco tumoral: 1) ser fácilmente accesibles (por ejemplo, localizadas en la membrana

celular), 2) estar aumentadas en las células tumorales en comparación con las células de tejido normal adyacente, 3) estar disponibles en alto número por célula tumoral y 4) poseer alto porcentaje y distribución de células positivas dentro del tumor [25].

Las proteínas de membrana sobreexpresadas en el crecimiento neoplásico se pueden clasificar según su función biológica como: A) receptores, B) proteínas de adhesión celular o de anclaje, C) enzimas asociadas a la membrana celular y D) proteínas transportadoras (Figura 5). Los receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptors: GPCR) comprenden aproximadamente el 3% de los productos codificados por los genes humanos lo que sugiere la existencia de aproximadamente 800 GPCR humanos. Varios de estos GPCR están claramente asociados con el cáncer y, dado que interferir con ellos es relativamente fácil, un tercio de todas las terapias actuales están dirigidas contra este tipo de receptores [25].

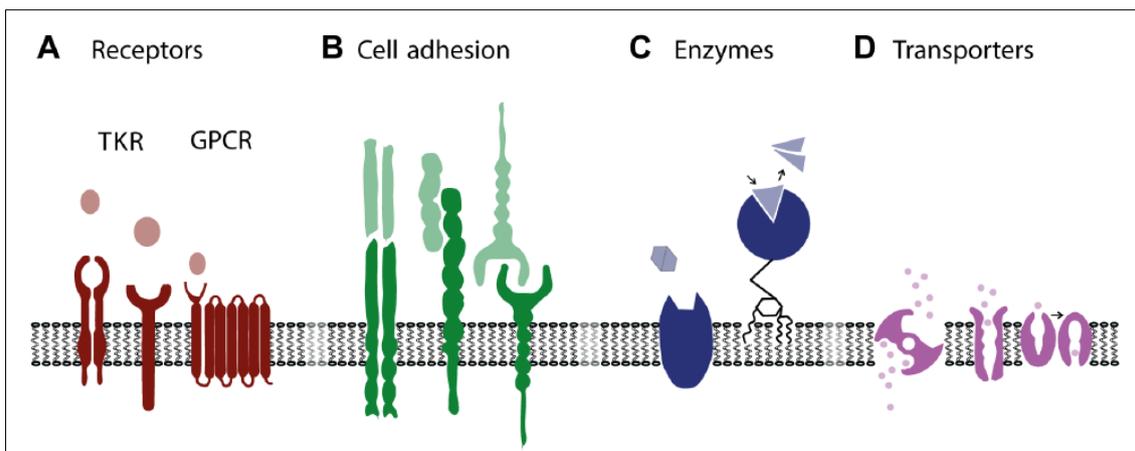


Figura 5. Representación esquemática de diversos grupos de proteínas asociadas a la membrana celular. **(A)** Receptores de los subtipos de receptor de tirosina quinasa (TKR) y receptor acoplado a proteína G (GPCR), **(B)** proteínas de anclaje celular, **(C)** enzimas y **(D)** proteínas transportadoras. Los respectivos ligandos extracelulares, proteínas de unión, sustratos y sustancias transportadas están indicados para cada grupo [25].

Al momento, se han utilizado diversos compuestos (vectores) dirigidos a las proteínas de membrana, tales como anticuerpos, fragmentos derivados de anticuerpos, fragmentos del ligando natural, proteínas, péptidos, pequeñas moléculas inhibitorias y sustancias transportadas modificadas, entre otros [25]. Estos compuestos son la base de los radiofármacos molecularmente dirigidos a

tumor, son la porción de direccionamiento hacia las estructuras asociadas al tumor, a las proteínas de membrana en este caso. La incorporación del átomo radiactivo a este compuesto no debería modificar sustancialmente su interacción con el blanco molecular, de manera de concentrar el radiofármaco, y por consiguiente el radionucleido, en el tumor. Dependiendo del tipo de radionucleido que se le incorpore al vector en la marcación se pueden obtener radiofármacos de diagnóstico por imagenología molecular (SPECT o PET) o de terapia molecularmente dirigida (Figura 6). Además, el $T_{1/2}$ del radionucleido debe ser compatible con la vida media biológica del vector de direccionamiento. No sería adecuado desarrollar un radiofármaco utilizando un anticuerpo como vector, que usualmente tiene una penetración lenta en el tumor y un tiempo de residencia prolongado en la circulación, marcado con un radionucleido con un $T_{1/2}$ demasiado corto, ya que la mayor parte de los átomos radiactivos decaería antes de que el radiofármaco llegase al tumor [21].

1												2																							
1	H Hydrogen 1.008												2	He Helium 4.0026																					
3	Li Lithium 6.94	4	Be Beryllium 9.0122											5	B Boron 10.81	6	C Carbon 12.011	7	N Nitrogen 14.007	8	O Oxygen 15.999	9	F Fluorine 18.998	10	Ne Neon 20.180										
11	Na Sodium 22.990	12	Mg Magnesium 24.305											13	Al Aluminium 26.982	14	Si Silicon 28.085	15	P Phosphorus 30.974	16	S Sulfur 32.06	17	Cl Chlorine 35.45	18	Ar Argon 39.948										
19	K Potassium 39.098	20	Ca Calcium 40.078(4)	21	Sc Scandium 44.956	22	Ti Titanium 47.887	23	V Vanadium 50.942	24	Cr Chromium 51.996	25	Mn Manganese 54.938	26	Fe Iron 55.845(2)	27	Co Cobalt 58.933	28	Ni Nickel 58.693	29	Cu Copper 63.546(3)	30	Zn Zinc 65.38(2)	31	Ga Gallium 69.723	32	Ge Germanium 72.630(2)	33	As Arsenic 74.922	34	Se Selenium 78.971(8)	35	Br Bromine 79.904	36	Kr Krypton 83.798(2)
37	Rb Rubidium 85.468	38	Sr Strontium 87.62	39	Y Yttrium 88.906	40	Zr Zirconium 91.224(2)	41	Nb Niobium 92.906	42	Mo Molybdenum 95.95	43	Tc Technetium	44	Ru Ruthenium 101.07(2)	45	Rh Rhodium 102.91	46	Pd Palladium 106.42	47	Ag Silver 107.87	48	Cd Cadmium 112.41	49	In Indium 114.82	50	Sn Tin 118.71	51	Sb Antimony 121.76	52	Te Tellurium 127.60(3)	53	I Iodine 126.90	54	Xe Xenon 131.29
55	Cs Cesium 132.91	56	Ba Barium 137.33	57-71	*Lanthanoids	72	Hf Hafnium 178.49(2)	73	Ta Tantalum 180.96	74	W Tungsten 183.84	75	Re Rhenium 186.21	76	Os Osmium 190.23(3)	77	Ir Iridium 192.22	78	Pt Platinum 195.08	79	Au Gold 196.967	80	Hg Mercury 200.59	81	Tl Thallium 204.38	82	Pb Lead 207.2	83	Bi Bismuth 208.98	84	Po Polonium	85	At Astatine	86	Rn Radon
87	Fr Francium	88	Ra Radium	89-103	**Actinoids	104	Rf Rutherfordium	105	Db Dubnium	106	Sg Seaborgium	107	Bh Bohrium	108	Hs Hassium	109	Mt Meitnerium	110	Ds Darmstadtium	111	Rg Roentgenium	112	Cn Copernicium	113	Nh Nihonium	114	Fl Flerovium	115	Mc Moscovium	116	Lv Livermorium	117	Ts Tennessine	118	Og Oganesson
		57	La Lanthanum 138.91	58	Ce Cerium 140.12	59	Pr Praseodymium 140.91	60	Nd Neodymium 144.24	61	Pm Promethium	62	Sm Samarium 150.36(2)	63	Eu Europium 151.96	64	Gd Gadolinium 157.25(3)	65	Tb Terbium 158.93	66	Dy Dysprosium 162.50	67	Ho Holmium 164.93	68	Er Erbium 167.26	69	Tm Thulium 168.93	70	Yb Ytterbium 173.05	71	Lu Lutetium 174.97				
		89	Ac Actinium	90	Th Thorium 232.04	91	Pa Protactinium 231.04	92	U Uranium 238.03	93	Np Neptunium	94	Pu Plutonium	95	Am Americium	96	Cm Curium	97	Bk Berkelium	98	Cf Californium	99	Es Einsteinium	100	Fm Fermium	101	Md Mendelevium	102	No Nobelium	103	Lr Lawrencium				

Figura 6. Tabla periódica codificada por colores con aplicaciones actuales o potenciales de cada elemento, en radiofármacos de diagnóstico y/o terapia [26].

Ciertas características son deseables para que los radiofármacos sean de utilidad clínica. El radiofármaco debe ser fácilmente sintetizado o estar fácilmente disponible y no debe desestabilizarse luego de producido. Tampoco debe desestabilizarse *in vivo* y debe localizarse rápida y específicamente de

acuerdo con la aplicación prevista. Su depuración debe ser rápida y conducir a una alta captación en el blanco molecular y baja o nula captación en el resto del organismo, o sea una alta relación blanco/no blanco (T/NT: target/non-target) [11]. Los radiofármacos se administran en dosis subfarmacológicas, del orden de los picomoles (en diagnóstico) a los nanomoles (en terapia), por lo que estos, o más específicamente sus vectores, no provocarían efectos secundarios farmacológicos. Esto sería así si los métodos de marcación permitieran incorporar idealmente un átomo radiactivo por cada molécula del vector de forma cuantitativa, obteniendo así la máxima radiactividad por mol de compuesto (actividad molar = A_m), pero en la práctica se necesita utilizar mayor cantidad de vectores para mejorar la cinética de incorporación de los radionucleidos a los mismos, lo que deja finalmente en la preparación radiactiva vectores no marcados que podrían provocar efectos secundarios farmacológicos si superaran cierta cantidad. Esta disminución en la A_m también podría disminuir la captación del radiofármaco en el blanco molecular, ya que existe una cantidad limitada de blancos moleculares por los cuales competirían los vectores no marcados. Por estos dos motivos es que el radiofármaco debería poseer una alta actividad molar.

3.4.1. Péptidos radiomarcados

Los péptidos son importantes reguladores de crecimiento y de funciones celulares no sólo en tejidos normales sino en tumores, por ese motivo se han introducido como vectores en la Medicina Nuclear desde hace unos treinta años [27]. Los péptidos sintetizados principalmente en el cerebro, especialmente en las neuronas, se denominan “neuropéptidos”. Sin embargo, dado que la mayoría de estos péptidos también se encuentra en el intestino, el tejido linfático, el sistema endocrino, etc., a menudo se usa la terminología “péptido regulador”. Los receptores de péptidos reguladores a menudo se sobreexpresan en ciertos cánceres humanos, y los derivados radiomarcados de sus ligandos naturales se pueden usar para llegar al tumor. Es así que los péptidos radiomarcados se han convertido en una herramienta valiosa para la Imagenología de Receptor Peptídico (Peptide Receptor Imaging) y la Terapia Radionucleídica de Receptor Peptídico (Peptide Receptor Radionuclide Therapy = PRRT) de tumores, dependiendo del radionucleido seleccionado. La

mayoría de estos receptores sobreexpresados pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G. Estos GPCR consisten en una cadena polipeptídica única, con siete dominios transmembrana, un dominio extracelular con el sitio de unión al ligando y un dominio intracelular unido a proteínas G y Arrestina para la activación de segundos mensajeros e internalización (Figura 7). Por tanto, al unírsele el radioligando, el complejo receptor-ligando es internalizado, lo que permite una prolongada retención de la radiactividad en las células tumorales [28].

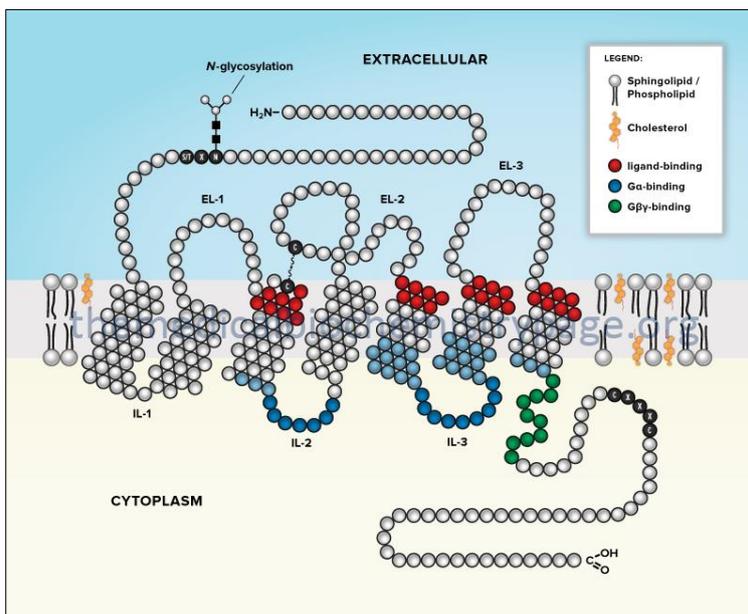


Figura 7. Representación esquemática de receptor acoplado a proteína G [29].

Existen varias ventajas distintivas de los pequeños péptidos radiomarcados (radiopéptidos) sobre otras moléculas biológicamente activas, como las proteínas y los anticuerpos, aparte de su baja inmunogenicidad. Debido a su pequeño tamaño, los péptidos generalmente exhiben una farmacocinética rápida y buenas características de direccionamiento al tumor, con la capacidad de penetrar en los tumores de manera eficiente. Además, se pueden sintetizar fácilmente empleando sintetizadores de péptidos convencionales y las características farmacocinéticas deseadas se pueden diseñar molecularmente durante la síntesis (haciendo cambios apropiados en la secuencia peptídica) y/o por agregado de una molécula bio-modificante. Asimismo, pueden tolerar condiciones más severas durante el marcado radiactivo [28].

Un problema importante asociado con los péptidos lineales no modificados es que a menudo presentan una vida media biológica corta debido a su rápida proteólisis en plasma. Una vida media corta en sangre es un obstáculo importante a superar, ya que los radiopéptidos podrían degradarse *in vivo* antes de alcanzar el blanco deseado. Por lo tanto, la mayoría de los péptidos deben modificarse sintéticamente para minimizar la rápida degradación enzimática. Grandes esfuerzos se han centrado en desarrollar péptidos metabólicamente estables adecuados para uso clínico mediante modificaciones moleculares apropiadas, como la sustitución de L-aminoácidos por sus D-aminoácidos más estables, el uso de enlaces pseudo-peptídicos, la inclusión de amino alcoholes y la inserción de aminoácidos no naturales o de residuos de aminoácidos con cadenas laterales modificadas, sin comprometer la afinidad de unión al receptor y la actividad biológica del péptido. Otro inconveniente relacionado con los péptidos radiomarcados es a menudo su alta absorción y retención por los riñones, lo que es preocupante, particularmente para la terapia con radionucleidos debido a la posible nefrotoxicidad. A pesar de que ciertos procedimientos se han desarrollado y aplicado con éxito en la clínica para controlar dicha nefrotoxicidad, como por ejemplo la infusión de mezclas de los aminoácidos lisina y arginina, aún existe la necesidad de reducir la captación renal y/o aumentar el aclaramiento renal del radiopéptido [28].

Un hecho significativo a considerar es que los compuestos radiomarcados tienden a descomponerse vía radiolisis causada por su propia radiación. Este daño inducido por radiación puede darse de forma directa o indirecta (a través de los radicales libres formados por la interacción de la radiación ionizante con el agua del medio). El grado de radiolisis depende del nivel de actividad, del nivel de actividad molar, de las características de la radiación emitida por los radioisótopos, la estructura del compuesto marcado y la posición del marcado. Concisamente, altos niveles de actividad y actividad molar, y la radiación de alto LET aumentan la radiolisis. Por lo cual los compuestos radiomarcados están expuestos al daño inducido por radiación durante el marcado, el almacenamiento y el transporte [30, 31]. Particularmente el daño en los péptidos radiomarcados puede incluir oxidación, hidroxilación, agregación y/o escisión de enlaces [32]. Para disminuir este daño se utilizan sustancias secuestrantes de radicales libres (“radical scavengers”) como

“radioestabilizadores”, siendo el ácido ascórbico (vitamina C) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico) los antioxidantes más utilizados en radioquímica para tal fin [30, 31, 33-37].

Otra dificultad que presentan las biomoléculas más pequeñas, como los péptidos, es que la “marca radiactiva” puede afectar significativamente la unión al receptor y el metabolismo *in vivo*. En esta situación, la elección del radionucleido determinará el tipo de modificación necesaria en el péptido para la incorporación del átomo radiactivo y su ubicación en la molécula puede ser crítica. El radiomarcado en un sitio específico, alejado de la región de unión al receptor, es importante para evitar la pérdida de afinidad de unión y actividad biológica de los péptidos radiomarcados [28]. La mayoría de los radionucleidos tiene una naturaleza metálica y los metales son típicamente incapaces de formar enlaces covalentes estables con los elementos presentes en proteínas y péptidos. Por esta razón, el marcado de péptidos con metales radiactivos se realiza habitualmente mediante el uso de quelantes, ligandos multidentados, que forman compuestos no covalentes con el metal (llamados quelatos). Para ser utilizado en el marcado, el quelante debe ser bifuncional, es decir, contener algunas porciones funcionales para la quelación del radiometal y otras para el acoplamiento a grupos funcionales disponibles en los péptidos [21]. Este “método del quelante bifuncional” se puede utilizar para minimizar la interrupción de la actividad biológica de un vector de direccionamiento tras la incorporación de un radionucleido metálico, es decir, no modificar sustancialmente la interacción del péptido (luego de marcado) con su blanco molecular (receptor). En este método, el radiometal está estrechamente coordinado con un quelante bifuncional adecuado, que de forma previa (generalmente) ha sido conjugado covalentemente con el vector de direccionamiento (péptido), ya sea directamente o a través de un “linker” (conector o espaciador). De esta manera el marcado se realiza en un sitio específico alejado de la región de unión al receptor, de manera de no perder la afinidad del vector por su blanco molecular (Figura 8) [38].

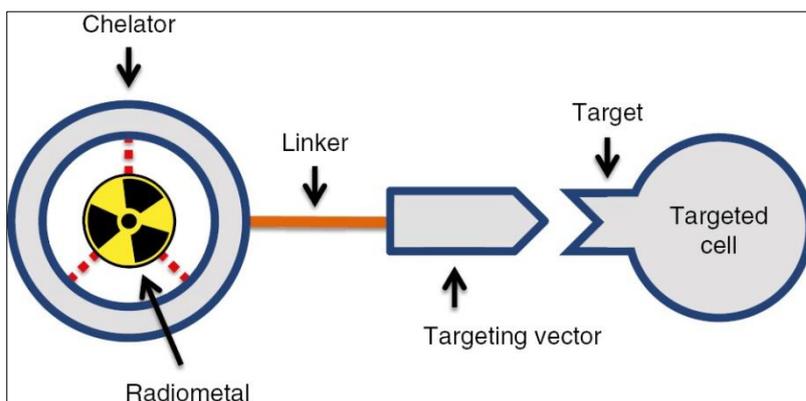


Figura 8. Representación esquemática del vector de direccionamiento marcado con un radiometal por el método del quelante bifuncional [38].

Entre los “linkers” más comunes se incluyen los basados en polietilenglicol (PEG), aminoácidos (Glu, Gly) y ácido aminohexanoico (Ahx), entre otros. Estos se usan para agregar distancia entre el sitio activo del vector de direccionamiento y el sitio de la modificación estructural para su marcado. Lo que se hace más necesario en los vectores más pequeños, ya que la incorporación del complejo radiometal-quelante bifuncional (relativamente grande) aumenta la posibilidad de disminuir la afinidad y/o la especificidad del radiotrazador respecto al vector sin modificar. Los “linkers” también se utilizan para modular las propiedades farmacocinéticas del radiotrazador, deben ser estables bajo condiciones fisiológicas y no deben obstaculizar la especificidad o afinidad del vector de direccionamiento por su blanco biológico [38].

Es así que, cada uno de los componentes clave de un radiofármaco marcado por el método del quelante bifuncional (radiometal, quelante, linker y vector de direccionamiento) puede influir en el comportamiento global del radiofármaco, y un agente exitoso debe combinar las propiedades de altos rendimientos radioquímicos y suficiente estabilidad del complejo radiometálico, con un direccionamiento efectivo y una buena depuración de tejidos y órganos no blanco [38].

3.4.2. Quelantes bifuncionales

El objetivo principal de los quelantes es la formación de complejos de coordinación robustos para evitar la liberación de radiometales *in vivo*. Los complejos estables se constituyen mediante la identificación de pares compatibles de quelante-metal. Para ello, es necesario considerar las características fundamentales del ion metálico (número atómico, carga y radio),

que varían de un ion metálico a otro y dan como resultado distintas preferencias de geometría, número de coordinación y contribución de enlace iónico/covalente. Para una estabilidad óptima, los grupos funcionales de coordinación del quelante deben adoptar la geometría preferida del ion metálico mientras satisfacen simultáneamente los requisitos de coordinación del metal, para evitar la competencia de ligandos extraños, especialmente en sistemas biológicos [26].

La teoría del ácido-base duro-blando (hard-soft acid-base), desarrollada por Pearson en 1968, es una forma conveniente de discutir el carácter de enlace iónico/covalente. En este contexto, los iones de metales duros tienen una alta densidad de carga, tienen capas de electrones no polarizables y tienden a formar enlaces predominantemente iónicos, donde la atracción electrostática es la principal fuerza impulsora de la formación de enlaces. Como regla general, los iones metálicos duros prefieren los grupos dadores duros, que poseen un carácter aniónico denso (por ejemplo, ácidos carboxílicos). Por el contrario, los metales blandos tienen baja densidad de carga y capas de electrones polarizables, por lo que prefieren una unión más covalente que se logra a través de la coordinación de grupos donantes más blandos y más dispersos de electrones (por ejemplo, tioles). Un indicador útil para el carácter duro-blando es el parámetro Drago-Wayland, I_A , que transmite las contribuciones electrostáticas (E_A) y covalentes (C_A) a las constantes de formación de los complejos ácido-base de Lewis en solución acuosa, incluyendo complejos metálicos ($I_A = E_A/C_A$). La Tabla 4 presenta este parámetro, entre otros, para distintos iones metálicos [26].

Tabla 4. Parámetros químicos relevantes de diversos iones metálicos [modificado de 26].

Ion metálico	Nº atómico	Radio iónico (Å)	Nº de coordinación	Dureza (I_A)
Sc ³⁺	21	0.75 - 0.87	6 - 8	Duro (10.49)
Ga ³⁺	31	0.47 - 0.62	4 - 6	Duro (7.07)
Y ³⁺	39	0.90 - 1.08	6 - 9	Duro (10.64)
In ³⁺	49	0.62 - 0.92	4 - 8	“Borderline” duro (6.30)
Tb ³⁺	65	0.92 - 1.10	6 - 9	Duro (10.07-10.30)
Lu ³⁺	71	0.86 - 1.03	6 - 9	Duro (10.07)
Bi ³⁺	83	0.96 - 1.17	5 - 8	“Borderline” duro (6.39)

Un quelante que satisfaga los criterios antes mencionados, cuando se coordine con un ion metálico formará un complejo altamente estable, de baja energía, con un gran costo energético de disociación. Los quelantes multidentados son especialmente efectivos para formar complejos robustos debido al "efecto quelato", que describe (en un sentido simplificado) el mayor costo entrópico de coordinación de ligandos monodentados múltiples con respecto a un ligando multidentado único. Por esta razón, son preferibles los quelantes de alta denticidad, dentro de los cuales se distinguen dos clases, acíclicos y macrocíclicos. Además, existe un efecto especialmente pronunciado en los ligandos macrocíclicos, ya que los bolsillos de unión preorganizados tienen un efecto extraordinario sobre la inercia del complejo metálico debido al menor costo entrópico de complejación, por tanto, este "efecto macrocíclico" proporciona a estos ligandos una mayor resistencia a la descomplejación del metal [26].

En principio, la formación de quelatos es un proceso reversible. La estabilidad termodinámica de los complejos metálicos generalmente se determina mediante valoración potenciométrica y se informa como valores de constante de estabilidad termodinámica (K_{ML}). Donde $K_{ML} = [ML]/[M][L]$, siendo $[M]$, $[L]$ y $[ML]$ las concentraciones en equilibrio de metal libre, quelante libre y complejo metal-quelante, respectivamente. Por tanto, valores mayores de esta constante ($\log K_{ML} > 18$) indican un complejo termodinámicamente más estable entre el metal y el quelante [38]. Además de la estabilidad termodinámica, la inercia cinética frente a la labilidad juega un papel importante. Los quelatos más inertes poseen velocidades de disociación más lentas por lo que generalmente son más estables *in vivo*, pero también poseen velocidades de asociación más lentas por lo cual requieren condiciones más severas de radiomarcado, como temperatura elevada y largos tiempos de incubación [21]. En general, los quelantes macrocíclicos son más inertes que sus homólogos acíclicos debido a sus sitios de unión rígidos y preorganizados. Por el contrario, los ligandos acíclicos exhiben un radiomarcado rápido a temperatura ambiente como resultado de la rotación de enlaces sin restricción en su forma libre. La consecuencia de tal libertad es el alto costo entrópico de la complejación, que resulta en una mayor probabilidad de descomplejamiento *in vivo*, en comparación con los macrociclos [26].

Los requisitos de estabilidad de los quelatos son generalmente altos, ya que varias proteínas del plasma sanguíneo, como por ejemplo la transferrina o la ceruloplasmina poseen también propiedades quelantes y compiten constantemente, es decir, tratan de “robar” el radionucleido de los quelatos de los radiofármacos. Teniendo en cuenta que en la sangre la concentración de proteínas quelantes naturales es mucho mayor que la concentración de la proteína marcada, la estabilidad del complejo radiometal-quelante bifuncional debe ser varios órdenes de magnitud más alto que la estabilidad del complejo radiometal-proteínas del plasma sanguíneo. Diferentes grupos de metales exhiben diferentes preferencias en su química de formación de complejos y requieren diferentes quelantes para proporcionar el marcado más estable [21].

La mayoría de los radiometales utilizados para aplicaciones radiofarmacéuticas poseen un único estado de oxidación y están disponibles como acuo-iones, tales como Cu^{2+} , Ga^{3+} , Y^{3+} , Zr^{4+} , In^{3+} , Ln^{3+} (iones lantánidos), Pb^{2+} , Bi^{3+} y Ac^{3+} . Estos radiometales forman complejos fácilmente con quelantes basados en ácidos poliaminopolicarboxílicos de diversos tipos y denticidades. Los ligandos a base de ácidos poliaminopolicarboxílicos dominan el escenario de los agentes quelantes bifuncionales utilizados en la investigación radiofarmacéutica, en gran parte debido a su disponibilidad comercial y facilidad de conjugación con biomoléculas. Estos ligandos pueden ser de naturaleza acíclica o macrocíclica y contienen átomos de O y N que actúan como donantes de electrones. Ambos ligandos, acíclico y macrocíclico, forman complejos altamente estables con una amplia variedad de iones metálicos con valores de constantes de estabilidad termodinámica ($\log K_{ML}$) típicamente superiores a 18. Los ligandos de poliaminopolicarboxilato acíclico a menudo exhiben una cinética de reacción más rápida para la formación de complejos metálicos; sin embargo, los complejos metálicos con ligandos de poliaminopolicarboxilato macrocíclico tienden a tener una mayor estabilidad *in vivo* [38].

3.4.2.1 Quelantes acíclicos basados en poliaminopolicarboxilatos

Uno de los primeros quelantes bifuncionales utilizados con éxito en el desarrollo de radiofármacos aprobados por la FDA (U.S. Food and Drug

Administration) es el DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético). Este es un quelante acíclico octadentado de ácido poliaminopolicarboxílico que puede coordinarse con iones metálicos a través de sus cinco átomos de oxígeno de los grupos carboxilato desprotonados (donores) y sus tres átomos de nitrógeno de los grupos amino terciarios (donores) (Figura 9(a)).

El uso extendido del DTPA proviene de su capacidad para formar rápidamente complejos termodinámicamente estables con una variedad de iones metálicos, incluyendo Zr^{4+} ($\log K_{ML} = 35.8$), In^{3+} ($\log K_{ML} = 29.5$), Ga^{3+} ($\log K_{ML} = 25.5$), Lu^{3+} ($\log K_{ML} = 22.6$), Cu^{2+} ($\log K_{ML} = 21.4$) e Y^{3+} ($\log K_{ML} = 21.2$). Pero la mayoría de los complejos DTPA-radiometal (especialmente $[^{90}Y]Y$ -DTPA) sufre una inadecuada estabilidad *in vivo* debido a la disociación y transquelación del radiometal, algo habitual en muchos complejos radiometálicos con quelantes acíclicos. Por ello, se desarrollaron varios análogos de DTPA en un intento de mejorar esta estabilidad.

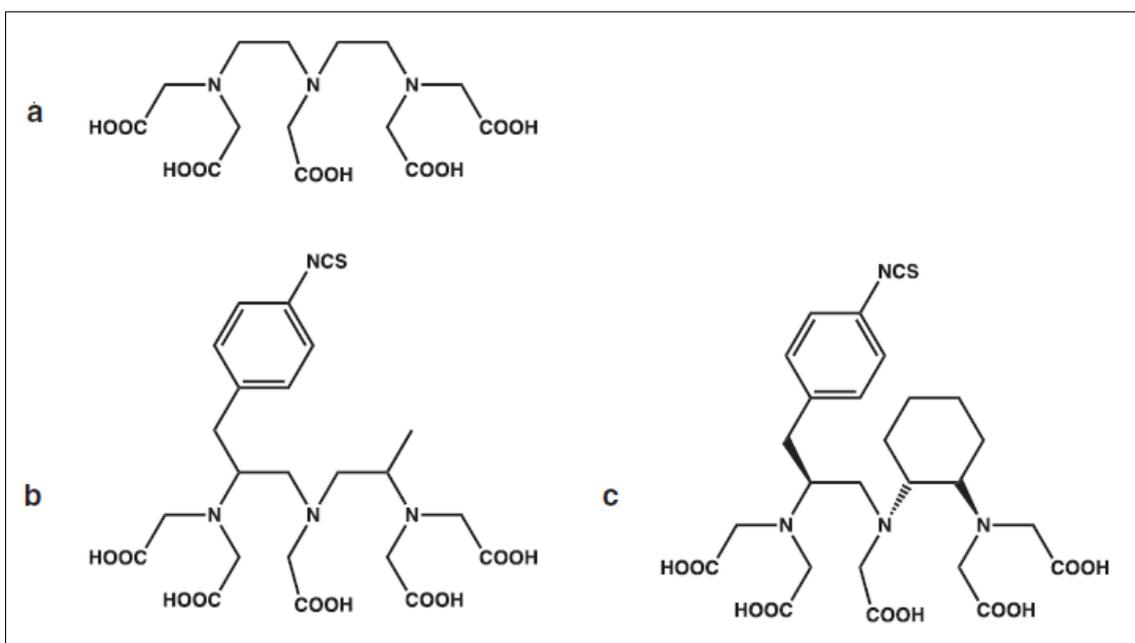


Figura 9. Estructuras de quelantes acíclicos basados en ácidos poliaminopolicarboxílicos. (a) DTPA, (b) 1B4M-DTPA y (c) CHX-A'-DTPA [38].

Uno de estos análogos de DTPA es el 1B4M-DTPA (ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-6-metil-dietilentriamino pentaacético), que tiene un grupo metilo en uno de los grupos etileno del quelante DTPA clásico y un grupo p-isotiocianatobencilo en el otro grupo etileno (Figura 9(b)). La incorporación de este grupo metilo proporcionó rigidez adicional y mejoró la estabilidad *in vivo* de

los complejos de $[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$ e $[^{90}\text{Y}]\text{Y}^{3+}$ en comparación con el clásico DTPA. En tanto, el grupo p-isotiocianatobencilo es adecuado para la conjugación a una biomolécula a través de la formación de un enlace tiourea con una amina primaria.

Posteriormente se desarrolló el ácido CHX-A"-DTPA ([*(R)*-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-*trans*-(*S,S*)-ciclohexano-1,2-diamina-pentaacético) incorporando un grupo ciclohexano en uno de los grupos etileno del clásico quelante DTPA (Figura 9(c)). La introducción de este anillo de ciclohexano aumentó la preorganización y la rigidez del esqueleto quelante, lo que mejoró la inercia cinética del complejo metálico resultante. CHX-A"-DTPA se considera actualmente el análogo de DTPA más adecuado para la formación de complejos radiometálicos y se ha demostrado que es un quelante eficaz para ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu y $^{212/213}\text{Bi}$. Sin embargo, los quelantes macrocíclicos de ácidos poliaminopolicarboxílicos son generalmente preferidos para la quelación de estos radiometales [38].

3.4.2.2 Quelantes macrocíclicos basados en poliaminopolicarboxilatos

El anillo DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) (Figura 10(a)) es por lejos, el quelante más popular y más utilizado en la investigación de la química radiofarmacéutica. Esto se debe en parte a la disponibilidad comercial del DOTA y sus análogos. Este es un quelante macrocíclico de ácido poliaminopolicarboxílico que coordina los iones metálicos en un patrón de coordinación octadentado N_4O_4 a través de sus cuatro grupos amino terciarios y sus cuatro brazos de ácido carboxílico. En general, el DOTA se considera un quelante adecuado para ^{111}In , $^{86/90}\text{Y}$, $^{44/47}\text{Sc}$, $^{212/213}\text{Bi}$, ^{212}Pb , ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{152}Tb y ^{225}Ac .

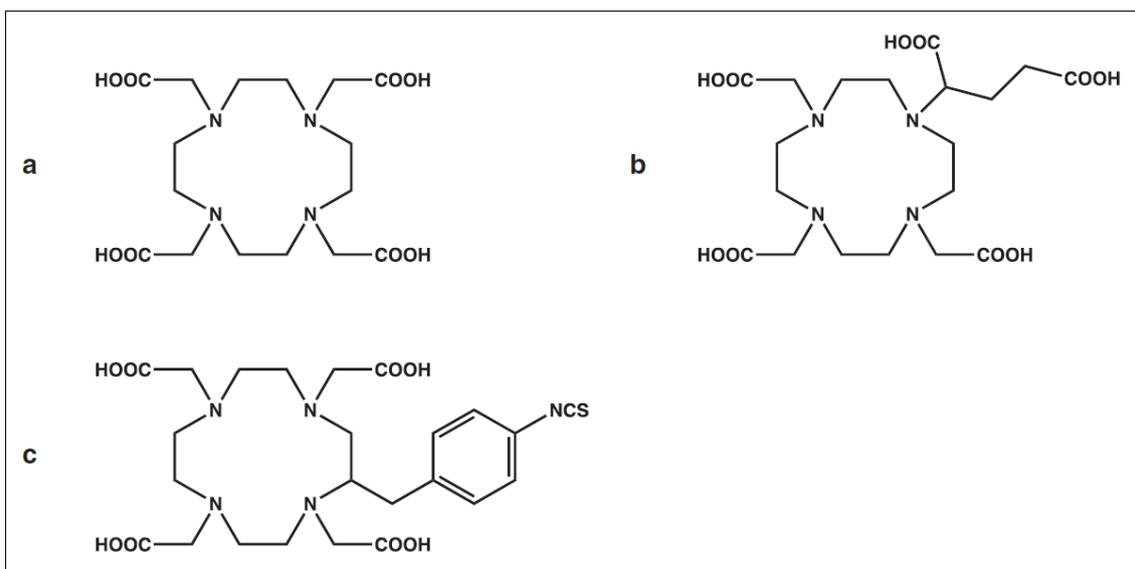


Figura 10. Estructuras de quelantes macrocíclicos de ácido poliaminopolicarboxílico basados en 1,4,7,10-tetraazaciclododecano. (a) DOTA, (b) DOTAGA y (c) *p*-SCN-Bn-DOTA [38].

El anillo DOTA se conjuga típicamente con una biomolécula a través de uno de sus brazos de ácido carboxílico a través de la formación de un enlace amida con una amina primaria de la biomolécula, es así que el DOTAGA [ácido 2-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)pentanodioico] (Figura 10(b)) fue desarrollado para preservar los cuatro brazos de ácido carboxílico del DOTA después de la conjugación a una biomolécula, para lo cual este derivado de DOTA contiene un brazo colgante de ácido dicarboxílico. La conjugación a una biomolécula también se puede lograr a través de *p*-SCN-Bn-DOTA (Figura 10(c)), que tiene un grupo *p*-isotiocianatobencilo incorporado en uno de los grupos etileno del clásico quelante DOTA [38].

En tanto el anillo NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) es otro quelante macrocíclico de ácido poliaminopolicarboxílico con un brazo de ácido carboxílico en cada átomo de nitrógeno del 1,4,7-triazaciclononano, lo que da como resultado un entorno de coordinación hexadentado N₃O₃ (Figura 11(a)).

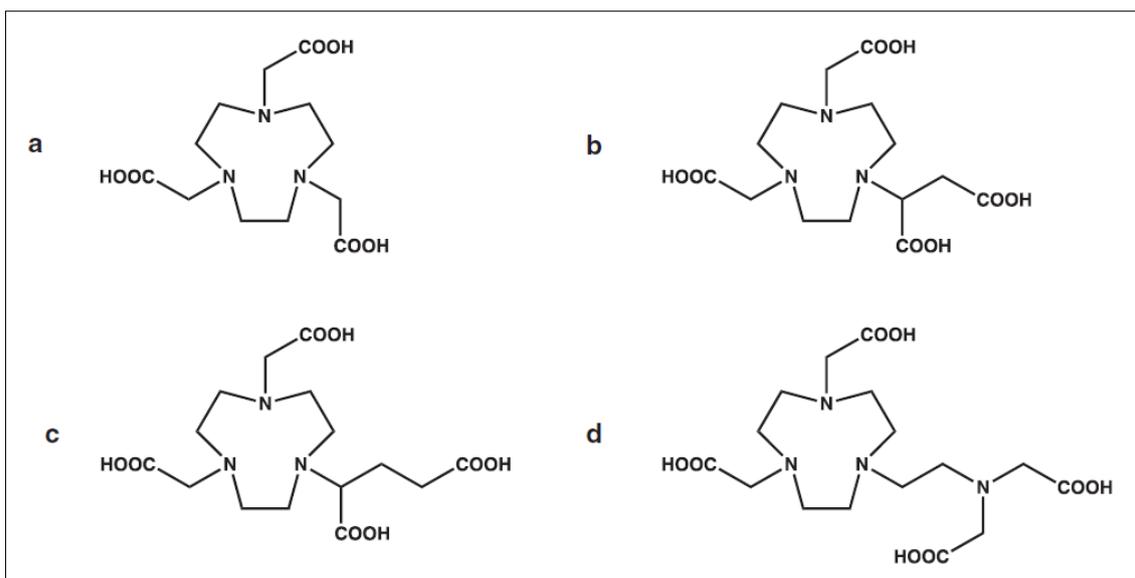


Figura 11. Estructuras de quelantes macrocíclicos de ácido poliaminopolicarboxílico basados en 1,4,7-triazaciclonoano. (a) NOTA, (b) NODASA, (c) NODAGA y (d) NETA [38].

Dentro de la familia de los quelantes macrocíclicos de ácido poliaminopolicarboxílico, el NOTA posee la cavidad de unión más pequeña, lo que lo hace ideal para los iones radiometálicos más pequeños, especialmente para Ga^{3+} ($\log K_{\text{ML}} = 31.0$) y Cu^{2+} ($\log K_{\text{ML}} = 21.6$). Se considera actualmente el “gold standard” para $^{68}\text{Ga}^{3+}$, con una rápida cinética de complejación a temperatura ambiente y una excelente estabilidad *in vivo*.

Para mantener el entorno de coordinación hexadentado N_3O_3 después de la conjugación con una biomolécula, fueron desarrollados derivados de NOTA, como NODASA [ácido 2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)succínico] y NODAGA [ácido 2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanodioico] que contienen un brazo colgante de ácido dicarboxílico (Figura 11(b) y (c)).

Recientemente fue reportado el NETA [ácido 2,2'-((2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)etil)azanediil)diacético], un análogo modificado de NOTA que contiene un carácter mixto, tanto macrocíclico como acíclico (Figura 11(d)). El componente macrocíclico del NETA, que es el mismo que el NOTA, proporciona rigidez y estabilidad termodinámica a sus complejos. Por otro lado, el componente acíclico de NETA, un grupo colgante bis(carboximetil)-amino, permite una rápida cinética de complejación. El NETA fue reportado como un quelante para la radioterapia molecularmente dirigida con ^{177}Lu , ^{90}Y y $^{205/206}\text{Bi}$,

obteniendo una rápida cinética de complejación, y resultados favorables tanto en la estabilidad *in vivo* como en el perfil farmacocinético [38].

Por otro lado, el anillo TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético) es otro quelante macrocíclico de ácido poliaminopolicarboxílico (Figura 12(a)) que se ha investigado principalmente para ^{64}Cu . Similar al DOTA, el TETA tiene un entorno de coordinación octadentado N_4O_4 pero con un tamaño de anillo más grande. Se demostró que los complejos ^{64}Cu -TETA tienen una pobre estabilidad *in vivo* debido a la transquelación del Cu^{2+} .

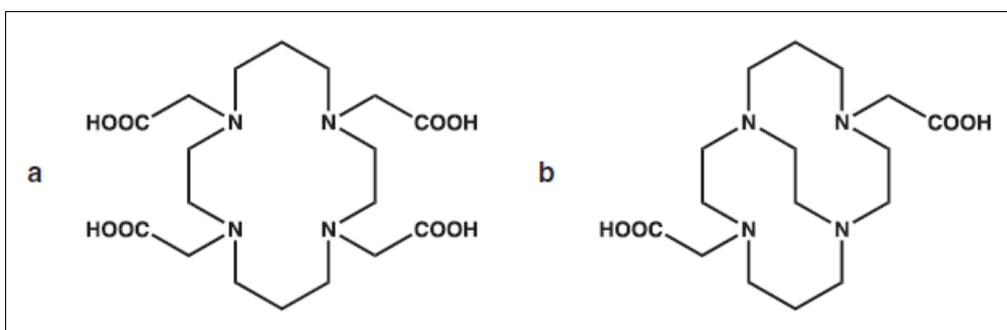


Figura 12. Estructuras de quelantes macrocíclicos de ácido poliaminopolicarboxílico basados en 1,4,8-11-tetraazaciclotetradecano. **(a)** TETA y **(b)** CB-TE2A [38].

Posteriormente, el CB-TE2A [ácido 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diil)diacético], un análogo bicíclico de TETA que contiene un puente cruzado de etileno (Figura 12(b)), se desarrolló para abordar los problemas de inestabilidad *in vivo* de los complejos ^{64}Cu -TETA. Los complejos ^{64}Cu -CB-TE2A exhibieron una mejora en su estabilidad *in vivo*, sin embargo, una de las principales desventajas de usar CB-TE2A es que requiere condiciones severas de radiomarcado (~1 h a 95 °C) [38].

Entre los varios ligandos poliaminopolicarboxílicos, los quelantes de tipo DOTA no siempre proporcionan los complejos más estables (Tabla 5). Sin embargo, hasta ahora, estos se han utilizado ampliamente para el marcado de péptidos con radiometales, probablemente debido a la disponibilidad comercial de varios derivados de DOTA activados listos para la conjugación [39].

Tabla 5. Constantes de estabilidad ($\log K_{ML}$) para complejos acíclicos y macrocíclicos de poliaminopolicarboxilatos con iones metálicos divalentes y trivalentes [39].

Quelante	Cu(II)	Ga(III)	In(III)	Y(III)	Lu(III)
DTPA	21.5	25.5	29.5	22.5	-
DOTA	22.3	21.3	23.9	24.3	25.5
NOTA	21.6	31.0	26.2	-	-
TETA	21.7	19.7	21.8	14.8	15.3

3.4.3. Teragnóstica (Theragnostics)

La teragnóstica es un nuevo campo de la medicina que combina una terapia (específicamente dirigida) basada en pruebas de diagnóstico (específicamente dirigidas). Con un enfoque clave en la atención centrada en el paciente, la teragnóstica proporciona una transición de la medicina convencional a un enfoque contemporáneo de medicina personalizada y de precisión. Una prueba de diagnóstico específica muestra un blanco molecular particular en un tumor, lo que permite que un agente de terapia se dirija específicamente a ese blanco en el tumor. Esta forma contemporánea de tratamiento se aleja de una medicina única para todos y del enfoque de ensayo y error, para ofrecer el tratamiento correcto, para el paciente correcto, en el momento correcto, con la dosis correcta, proporcionando una terapia más específica y eficiente. El diagnóstico complementario es una herramienta que ayuda a determinar el subtipo de la enfermedad, su progresión y las características de un paciente. Esta información permite tomar decisiones sobre el momento, la cantidad, el tipo de medicamentos y la elección del procedimiento de tratamiento, además de ayudar a evaluar la respuesta del paciente al tratamiento [40].

El término “theragnostics” deriva de las palabras griegas *therapia* y *diagnosis*, y esta última deriva de la palabra griega *gnosis* que significa conocimiento. Por tanto, se prefiere el término “theragnostics” a “theranostics” ya que el primero pone énfasis en el conocimiento, y la Medicina Nuclear, con su combinación de imágenes moleculares y radioterapia molecular, realmente ofrece medicina de precisión basada en el conocimiento [41].

La teragnóstica tiene en realidad unos 75 años, cuando en la Medicina Nuclear se comenzó con el uso de yodo radioactivo (^{131}I) para el diagnóstico y la terapia

del cáncer de tiroides, un tratamiento bien establecido, efectivo y seguro, disponible en todo el mundo [40]. Esto fue posible gracias a que el ^{131}I es intrínsecamente teragnóstico, ya que es un radionucleido terapéutico (emisor β^-) con emisión de fotones de energía adecuada para realizar imágenes por SPECT. Existen algunos radiometales con esta característica (por ejemplo ^{47}Sc , ^{177}Lu), sin embargo los agentes teragnósticos ideales están compuestos por pares de radioisótopos químicamente idénticos pero con emisiones complementarias, uno con emisión para diagnóstico y otro con emisión para terapia, llamado “par compatible” (“matched pair”). De esta manera, los radioisótopos exhiben un comportamiento (bio)químico idéntico, especialmente con respecto al quelante, lo que garantiza que el radiotrazador terapéutico se comporte *in vivo* de manera idéntica al radiotrazador de diagnóstico [26]. El par compatible más conocido para aplicaciones teragnósticas radiofarmacéuticas es el par $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$, donde los compuestos marcados con ^{123}I se usan para el diagnóstico, mientras que los compuestos marcados con ^{131}I se usan para la terapia. Otros pares teragnósticos prometedores incluyen $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$, $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$, $^{72}\text{As}/^{77}\text{As}$, $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ y $^{203}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$, entre otros. Alternativamente, se pueden utilizar pares de radionucleidos de diferentes elementos para el desarrollo teragnóstico radiofarmacéutico, siempre que su química sea muy similar (como por ejemplo $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{186/188}\text{Re}$) y no haya una diferencia significativa en el comportamiento farmacocinético entre los análogos de diagnóstico y terapia. Un buen ejemplo es el par $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$, donde el ^{68}Ga se usa para diagnóstico y el ^{177}Lu se usa para terapia. Este par se ha utilizado exitosamente en el desarrollo de dos radiofármacos aprobados por la FDA, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ (NETSPOT™) y $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ (LUTATHERA®), para el diagnóstico y tratamiento, respectivamente, de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos [38]. Estos son un grupo heterogéneo de tumores que se caracterizan por la sobreexpresión de receptores de la hormona somatostatina. Se han identificado 5 subtipos de receptores de somatostatina (sst₁-sst₅), todos los cuales se expresan con diferente frecuencia en los tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos, por ejemplo, sst₂ y sst₅ se expresan con alta densidad en el 70%-100% de estos tumores. Esto ha conducido a una profunda investigación sobre el radiomarcado de distintos análogos de somatostatina (basados en octapéptidos) con afinidad por algunos subtipos de

estos receptores, convirtiendo a estos receptores en blancos exitosos para el diagnóstico y la terapia de estos tumores. Particularmente, el análogo de somatostatina Tyr³-octreotate conjugado a DOTA para su marcado con radiometales (DOTA-TATE en Figura 13(a)), tiene la más alta afinidad por el receptor sst₂, lo que lo hace específico para los tumores que sobreexpresan este subtipo de receptor, que son la mayoría de los tumores neuroendocrinos.

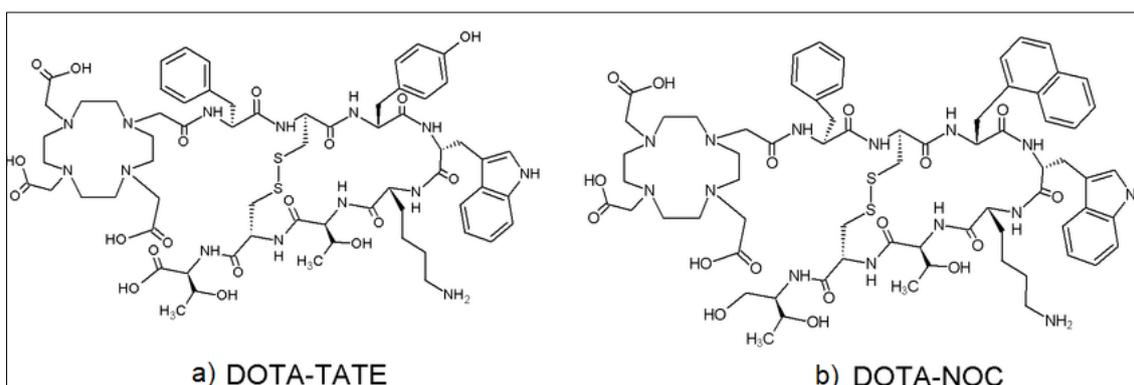


Figura 13. Fórmulas estructurales de (a) DOTA-TATE (DOTA-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr = DOTA-Tyr³-octreotate) y (b) DOTA-NOC (DOTA-D-Phe-c(Cys-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr(OH) = DOTA-1-Nal³-octreotide). 1-Nal = 1-naftil-alanina.

No obstante, la distribución y la densidad del receptor sst₂ a menudo es variable y a veces demasiado baja para su detección. Un posible enfoque para superar este problema es el uso de trazadores radiomarcados con afinidad por más de un subtipo de receptor de somatostatina. El análogo de somatostatina 1-Nal³-octreotide conjugado a DOTA (DOTA-NOC en Figura 13(b)) es un péptido que promete apuntar a un rango más amplio de subtipos de receptores de somatostatina, incluidos sst₂, sst₃ y sst₅, pudiendo detectar lesiones no evidenciadas con DOTA-TATE, según lo publicado por Wild *et al.*, en donde se compararon ambos análogos marcados con ⁶⁸Ga [42].

Un hecho a destacar es que estos péptidos análogos de somatostatina tan estudiados (TATE, NOC, TOC, entre otros) son péptidos agonistas de los receptores de somatostatina. Hasta hace poco, exclusivamente los péptidos agonistas habían sido utilizados como radioligandos para el desarrollo y la implementación del proceso de Direccionamiento a Receptor Peptídico (Peptide Receptor Targeting) para tumores *in vivo*. La razón es que los agonistas, después de la unión de alta afinidad al receptor, generalmente desencadenan la internalización del complejo ligando-receptor. Este proceso de internalización

es la base para una acumulación eficiente del radioligando en una célula a lo largo del tiempo, y se ha considerado un paso crucial en el proceso de direccionamiento a receptor *in vivo* con péptidos radiomarcados. No obstante, se sabe poco sobre los antagonistas, que con algunas excepciones, no se internalizan, y por lo tanto, se podría esperar que no sean de particular interés como radioligandos para el direccionamiento a receptores. A pesar de ello, estudios recientes han evidenciado que, en ciertas circunstancias, los radioligandos antagonistas pueden marcar un mayor número de sitios de unión al receptor que los radioligandos agonistas. Parecería que, en una situación *in vivo*, un antagonista que carece de capacidades de internalización pero se une a una variedad más grande de conformaciones del receptor, es un agente de direccionamiento más eficiente que un agonista que desencadena una fuerte internalización pero se une a un número limitado de receptores de alta afinidad, lo que le confiere una mayor captación tumoral al primero. Además, los radioligandos antagonistas poseen un mayor tiempo de residencia en el tumor, lo que reflejaría la lenta disociación de la unión antagonista-receptor. Esto podría en parte atribuirse a que los antagonistas son químicamente más estables y además más hidrófobos que los agonistas (Tabla 6), lo que daría como resultado una mayor duración de la acción y una posible estabilización en el entorno rico en lípidos de los receptores. Por lo tanto, el uso de potentes antagonistas radiomarcados para la selección de tumores *in vivo*, podría mejorar considerablemente la sensibilidad de los procedimientos de diagnóstico y la eficacia de la radioterapia mediada por receptores [43, 44].

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de análogos de somatostatina [45].

Código	Estructura química
Agonistas de receptores de somatostatina	
OC	D-Phe-cyclo(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)Thr(ol)
TOC	D-Phe-cyclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)Thr(ol)
TATE	D-Phe-cyclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)Thr
NOC	D-Phe-cyclo(Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)Thr(ol)
Antagonistas de receptores de somatostatina	
BASS	p-NO ₂ -Phe-cyclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂
LM3	p-Cl-Phe-cyclo(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂
JR10	p-NO ₂ -Phe-cyclo(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂
JR11	p-Cl-Phe-cyclo(D-Cys-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂

1-Nal = 1-naphthyl-alanine; D-Aph(Cbm) = D-4-amino-carbamoyl-phenylalanine; Aph(Hor) = 4-amino-L-hydroxyrotyl-phenylalanine.

El éxito de los análogos de somatostatina radiomarcados ha abierto nuevos horizontes para el desarrollo de otros péptidos radiomarcados para la teragnóstica dirigida a otros receptores GPCR, como los receptores de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1R), receptores de colecistoquinina subtipo 2 (CCK2R) o receptores de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP-R). Para todos ellos, el proceso de la teragnóstica podría esquematizarse de acuerdo a la Figura 14.

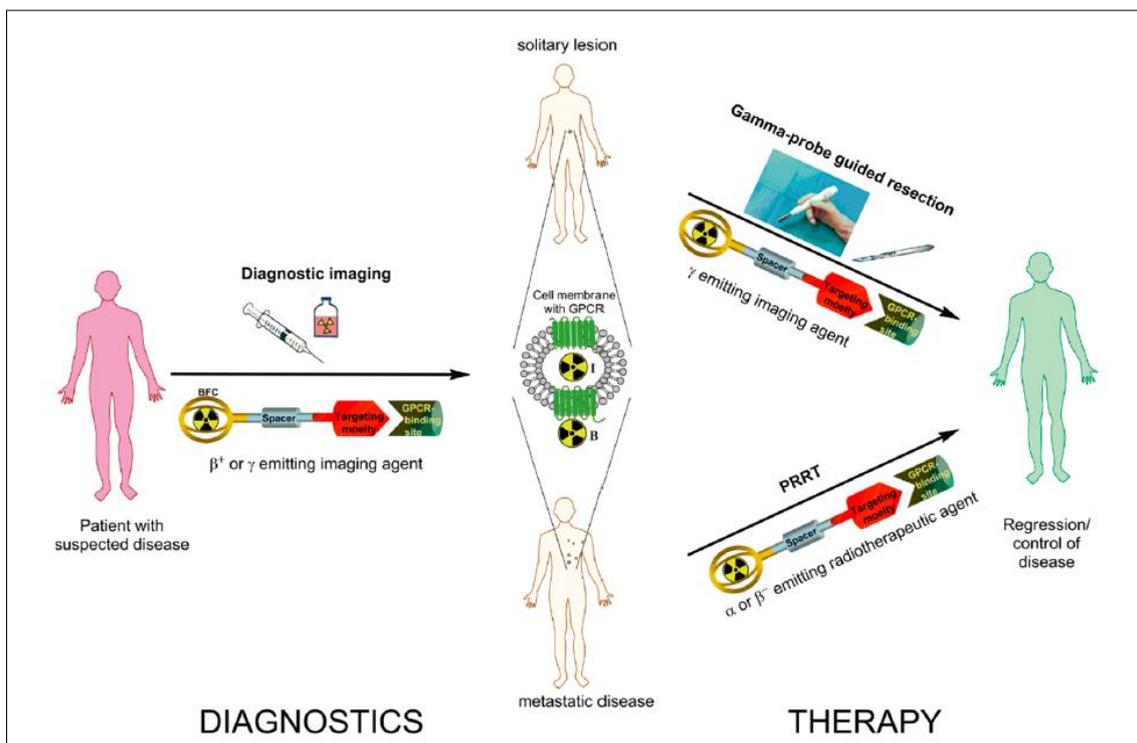


Figura 14. Representación esquemática de la teragnóstica utilizando péptidos radiomarcados dirigidos a receptores GPCR [45].

Este involucra primeramente un componente de diagnóstico (panel izquierdo de Figura 14), donde se utiliza un péptido radiomarcado con un emisor β^+ o γ para evaluar la propagación de la enfermedad. Este péptido radiomarcado se uniría al GPCR y se internalizaría en la célula si se utiliza un agonista (I en panel central de Figura 14) o permanecería en la superficie de la célula si se utiliza un antagonista (B en panel central de Figura 14). Luego en la etapa terapéutica (panel derecho de Figura 14), dependiendo del tipo de lesión detectada, el paciente se sometería a la resección guiada por sonda gamma o a la terapia radionucleídica de receptor peptídico (PRRT). En el caso de una lesión solitaria se elegiría la cirugía radioguiada, donde la pre-administración del

correspondiente péptido radiomarcado con emisor γ proporciona información en tiempo real al cirujano y guía la localización del sitio del tumor rico en GPCR intraoperatoriamente. En el caso de una enfermedad metastásica, se administraría el péptido radiomarcado con un emisor α o β^- para destruir internamente las lesiones ricas en GPCR [45].

Por tanto, la imagenología molecularmente dirigida en oncología proporciona un diagnóstico no invasivo específico del tipo de tumor y una localización precisa de tumores y metástasis. Aún más importante es su potencial para la cuantificación pre-terapéutica del estado del receptor, cinética de captación y dosimetría, que permiten la selección y planificación precisa de la terapia, además de monitorear la respuesta a la terapia, todo lo cual contribuye a alcanzar una medicina personalizada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

En esta tesis se propone investigar la química de marcación de un péptido análogo de minigastrina con dos tipos de radionucleidos, uno emisor de positrones (β^+) y otro emisor beta (β^-), como potenciales radiofármacos para el diagnóstico y la terapia respectivamente, de diversos tumores que sobreexpresan el receptor CCK2/gastrina. Para ello, se plantea la obtención de ambos radiofármacos con la calidad adecuada para su posterior evaluación biológica tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.2. Objetivos específicos

Investigación de la química de marcación con ^{68}Ga y ^{177}Lu del péptido derivado de minigastrina H2-MG11 conjugado a DOTA (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂).

Selección de las condiciones óptimas de marcación: relaciones molares, temperatura, pH, buffers y antioxidantes.

Optimización de métodos de control de calidad, lo que incluye la aplicación de métodos fisicoquímicos de análisis, en especial cromatográficos como TLC y HPLC para poder resolver, identificar y cuantificar las distintas especies formadas.

Evaluación de la cinética de formación y de degradación de las moléculas marcadas mediante estudios de estabilidad.

Evaluación de la especificidad biológica (bioafinidad) mediante análisis *in vitro* con células viables AR42J en cultivo, a través de ensayos de unión e internalización.

Evaluación biológica mediante estudios de biodistribución, tanto en ratones sanos como en ratones inmunodeprimidos portadores de tumores xenográficos, generados por implantación de células tumorales AR42J.

Evaluación imagenológica en ratones inmunodeprimidos portadores de tumores xenograftos, generados por implantación de células tumorales AR42J, a través de imágenes estáticas y/o dinámicas en cámara SPECT/PET/CT.

5. INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA

La gastrina y la colecistoquinina (CCK) son péptidos reguladores que interactúan con el receptor de colecistoquinina subtipo-2 (CCK2R). Este receptor se sobreexpresa en muchos cánceres humanos, como en el carcinoma medular de tiroides y carcinoma pulmonar de células pequeñas, entre otros. En consecuencia, varios análogos de CCK y gastrina radiomarcados se encuentran en desarrollo para su potencial aplicación en el diagnóstico y la terapia de dichos cánceres, por lo que se está en la búsqueda de los más apropiados.

5.1. Gastrina y Colecistoquinina (CCK)

La gastrina, una de las primeras hormonas gastrointestinales descubierta en el año 1905, regula la secreción de ácido gástrico al actuar sobre las células similares a las enterocromafines (ECL: enterochromaffin-like) que controlan la síntesis y secreción de histamina en el estómago [46, 47]. En tanto la CCK “cholecystokinin” del griego *chole*, “bilis”; *cysto*, “saco”; *kinin*, “mover”, por ende “mover el saco biliar” [48], es otra hormona gastrointestinal, descubierta en 1928, que regula la contracción y evacuación de la vesícula biliar. También controla la secreción de enzimas y hormonas del páncreas, así como su crecimiento, e influye en la sensibilidad intestinal y la saciedad. La gastrina y la CCK son sintetizadas y secretadas principalmente por las células G del antro gástrico y las células I del intestino delgado, respectivamente, aunque grandes cantidades de CCK se han identificado en varias áreas del sistema nervioso central y en terminaciones nerviosas periféricas [46, 47]. Ambas hormonas peptídicas se generan en múltiples formas moleculares que difieren en la longitud del extremo NH₂-terminal y comparten los cinco aminoácidos del extremo COOH-terminal: Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO-NH₂ (Figura 15), por lo cual ambas pertenecen a la familia de péptidos de la gastrina. Las formas bioactivas de estas hormonas son la gastrina-71, -34, -17, -6 y la CCK-83, -58, -39, -33, -22, -8, -5. Las modificaciones postraduccionales encontradas en estos péptidos biológicamente activos incluyen la sulfatación de la tirosina en la posición 7 desde el extremo COOH-terminal en la CCK y en la posición 6 de la gastrina, así como la amidación terminal del COOH. También existen gastrinas y

colecistoquininas biológicamente activas en formas no sulfatadas, de hecho, aproximadamente la mitad de las gastrinas endógenas no están sulfatadas [47].

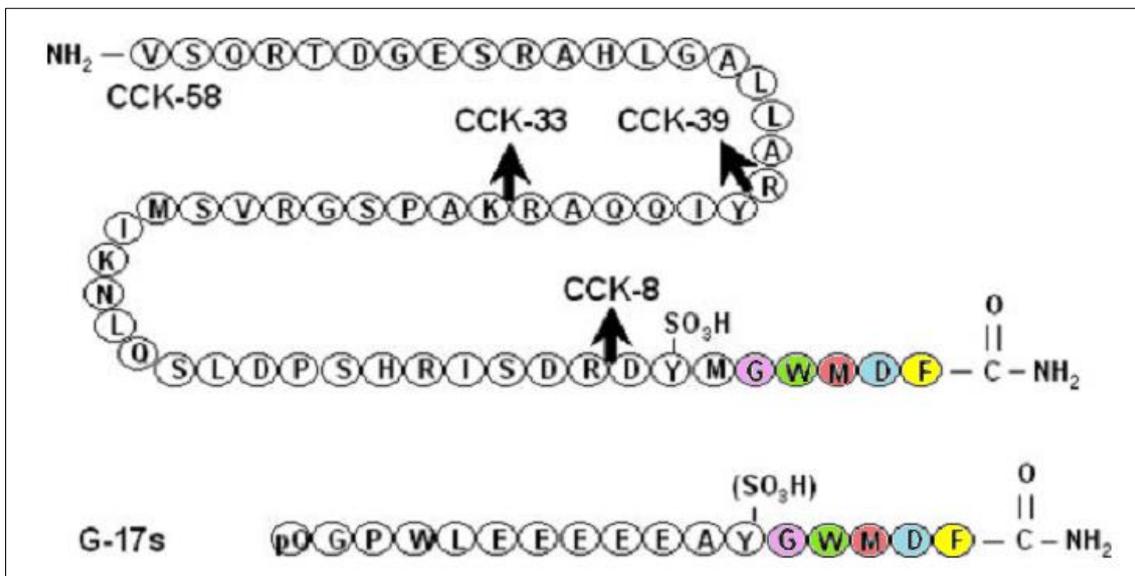


Figura 15. Estructura primaria de colecistoquinina (CCK) y gastrina-17 [modificado de 47].

Debido a la similitud de secuencia en su región bioactiva (últimos cuatro aminoácidos COOH-terminales) [46], la CCK y la gastrina comparten algunos efectos biológicos y farmacológicos. Estos péptidos ejercen sus funciones biológicas al interactuar con los receptores de CCK (CCKR), estos son receptores de membrana acoplados a proteína G que se encuentran ubicados en múltiples blancos celulares del sistema nervioso central y órganos periféricos [46, 47].

5.2. Receptores de colecistoquinina (CCKR)

Se han identificado dos tipos de receptores de CCK sobre una base farmacológica, tipo A (alimentary: alimentario) y tipo B (brain: cerebro). El receptor CCK-A se caracterizó por primera vez en acinos pancreáticos de roedores, mientras que el receptor CCK-B se encontró por primera vez en el cerebro. Estos receptores han sido renombrados, el CCK-A como receptor CCK1 (CCK1R) y el CCK-B como receptor CCK2 (CCK2R). Ambos exhiben un grado relativamente bajo de homología de secuencia (50%) pero presentan siete segmentos hidrofóbicos, correspondientes a dominios transmembrana, con extremos NH₂-terminal extracelulares y COOH-terminal intracelulares,

estructuras características de receptores acoplados a proteína G. En consecuencia, ambos receptores difieren en su distribución diferencial y en su afinidad relativa por sus ligandos naturales [47].

En humanos, el CCK1R está presente predominantemente en la vesícula biliar, en los músculos lisos gástricos y en el sistema nervioso periférico [49]. El ligando natural con la mayor afinidad por el CCK1R es el octapéptido sulfatado de CCK (CCK-8), aunque otras variantes moleculares naturales de CCK como CCK-33, CCK-39 y CCK-58 (Fig. 15) se unen a CCK1R con una afinidad similar. Por tanto, el CCK1R se une y responde a la CCK sulfatada con una afinidad o potencia de 500 a 1000 veces mayor que la gastrina sulfatada o la CCK no sulfatada, tornándose crítica la sulfatación en el residuo de tirosina [47].

En tanto, el CCK2R en humanos se expresa predominantemente en la mucosa gástrica [50] e intestinal, en el páncreas endocrino y en el cerebro [49]. Los dos ligandos naturales con las mayores afinidades por CCK2R son la gastrina-17 sulfatada y la CCK-8 sulfatada, teniendo casi la misma afinidad o potencia. El hecho de que los niveles sanguíneos postprandiales de gastrinas sean de 5 a 10 veces más elevados que los de CCK, llevan a considerar que la gastrina-17 sulfatada es el ligando preferido y probablemente el ligando fisiológico de la mayoría de los CCK2R periféricos. Es por ello que los receptores CCK2 de la periferia puedan ser considerados como “receptores de gastrina”. Por otro lado, debido a la abundancia de CCK-8 sulfatada en el sistema nervioso central, es probable que este ligando active naturalmente el CCK2R cerebral. Al mismo tiempo, el CCK2R discrimina poco entre los péptidos sulfatados y no sulfatados, por ejemplo, la gastrina-17 no sulfatada exhibe una afinidad menor que la gastrina-17 sulfatada, pero sólo de 3 a 10 veces menos. Incluso el tetrapéptido del extremo COOH-terminal común a la gastrina y la CCK (Fig. 15), interactúa con el CCK2R con una afinidad que sólo disminuye de 10 a 50 veces en comparación con la gastrina-17 sulfatada [47].

Existe un tercer tipo de receptor de CCK, una variante de empalme del CCK2R conocido como receptor CCK2i4sv, que se descubrió en células de cáncer colorrectal humano. Este receptor se expresa además en el cáncer pancreático

pero no en la mucosa colorrectal normal. Sin embargo, los niveles de expresión en estos tumores son muy bajos [51].

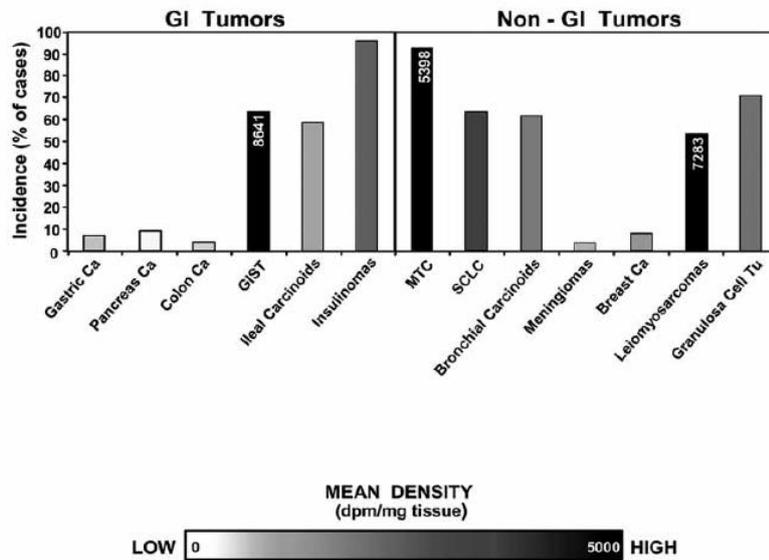
5.3. Expresión de CCK2R en tumores humanos

Se ha reportado la presencia de receptores de CCK en varios tipos de tumores. En el primer estudio que los evaluó en un gran número de cánceres humanos primarios, a través de autorradiografía de receptores *in vitro*, se demostró que algunos tipos de tumores podían expresar CCK2R o CCK1R. Los receptores CCK2 fueron encontrados con frecuencia en los carcinomas medulares de tiroides (92%), los carcinomas de pulmón de células pequeñas (57%), los astrocitomas (65%) y los cánceres estromales de ovario (tumores de células de la granulosa) (100%). Estos fueron ocasionalmente encontrados en los tumores gastroenteropancreáticos, los adenocarcinomas de endometrio y ovario y los carcinomas de mama. En cambio, los receptores CCK1 se expresaron raramente en tumores humanos, excepto en tumores gastroenteropancreáticos (38%), meningiomas (30%) y algunos neuroblastomas (19%) [52].

Para los tumores que surgen dentro del tracto gastrointestinal (GI tumors), se ha determinado que los CCK2R a menudo se expresan en tumores neuroendocrinos gastrointestinales, en particular en insulinomas, y están presentes en una densidad muy alta en muchos tumores del estroma gastrointestinal (GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor) (Figura 16(a)). Por lo tanto, estos dos tipos de tumor pueden ser los cánceres gastrointestinales de primera elección para la exploración de CCK2R. Es de notar que los receptores CCK1 rara vez se expresan en estos dos tipos de tumores (Figura 16(b)) [53].

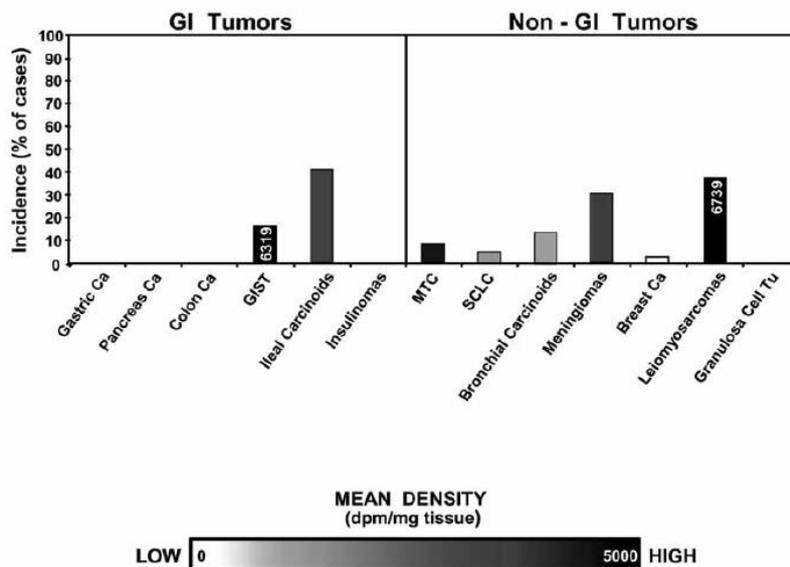
Para los tumores ubicados fuera del tracto gastrointestinal, está bien establecido que los carcinomas de pulmón de células pequeñas (SCLC: Small Cell Lung Carcinoma) a menudo expresan receptores CCK2 (Figura 16(a)), mientras que los carcinomas de pulmón de células no pequeñas (NSCLC: Non Small Cell Lung Carcinoma) no los expresan. Por otro lado, los CCK2R se han identificado inequívocamente y de forma inesperada (con alta incidencia y densidad) en los carcinomas medulares de tiroides (MTC: Medullary Thyroid Carcinoma) (Figura 16(a)), en tanto los carcinomas diferenciados de tiroides no los expresan [53].

CCK₂ receptors in cancer: incidence and density



(a)

CCK₁ receptors in cancer: incidence and density



(b)

Figura 16. Histogramas que resumen la incidencia y la densidad media de los receptores CCK2 (a) y CCK1 (b) ensayados en varios cánceres humanos. La densidad media (dpm/mg de tejido) se visualiza como un oscurecimiento relativo que varía de 0 a 5000 dpm/mg de tejido. Aquellos casos con valores de densidad superiores a 5000 dpm/mg están representados por barras oscuras en las que se han insertado los números de los valores de densidad media. Ca (carcinoma); Tu (tumor) [53].

5.4. Carcinoma medular de tiroides (MTC)

Los tipos principales de cáncer de tiroides son: (1) diferenciados (incluyendo papilar, folicular y de células Hürthle), (2) medular (MTC) y (3) indiferenciado (anaplásico). (1) Los cánceres de tiroides diferenciados son el tipo más común de cáncer de tiroides (más del 90% de los casos). Se originan de las células foliculares tiroideas, las que utilizan yodo de la sangre para producir la hormona tiroidea que ayuda a regular el metabolismo de una persona. Por lo cual, estas células tiroideas absorben el ^{131}I utilizado para gammagrafía tiroidea así como para gammagrafía de cuerpo entero, a fin de detectar una posible propagación. También se utiliza el ^{131}I para el tratamiento de estos tipos de cánceres, ya que se puede usar para destruir cualquier tejido tiroideo que no haya sido extirpado mediante cirugía, o para tratar algunos tipos de cáncer de tiroides que se hayan propagado a los ganglios linfáticos y a otras partes del cuerpo. La mayoría de los cánceres de tiroides diferenciados se pueden tratar con buenos resultados cuando se descubren temprano, y pocas veces causan la muerte. (2) Los MTC representan aproximadamente un 4% de los cánceres de tiroides. Se originan de las células C (parafoliculares) de la glándula tiroides, las que normalmente producen calcitonina, una hormona que ayuda a controlar la cantidad de calcio en sangre. Algunas veces este cáncer se puede propagar a los ganglios linfáticos, los pulmones o al hígado, incluso antes de que se detecte un nódulo tiroideo. Este tipo de cáncer es más difícil de descubrir y tratar, ya que sus células no absorben el ^{131}I . La cirugía es el tratamiento primario para la MTC, en tanto la radioterapia de haz externo y la quimioterapia tienen un papel restringido, por lo que los pacientes con enfermedad diseminada tienen muy pocas opciones terapéuticas. Hay dos tipos de carcinoma medular de tiroides, el MTC esporádico y el MTC familiar. El MTC esporádico representa aproximadamente un 80% de los casos de MTC, y no es hereditario. Este cáncer ocurre principalmente en adultos de edad avanzada y a menudo afecta únicamente a un lóbulo tiroideo. En cambio el MTC familiar es hereditario y entre 20-25% puede surgir en cada generación de una familia. A menudo, estos cánceres se desarrollan durante la niñez o en la adultez temprana y se pueden propagar temprano. Los pacientes generalmente tienen cáncer en varias áreas de ambos lóbulos. El MTC familiar a menudo está asociado con un riesgo aumentado de otros tipos de tumores. (3) El carcinoma anaplásico (también

llamado carcinoma indiferenciado) es una forma poco común de cáncer de tiroides, representando alrededor del 2% de todos los cánceres de tiroides. Se cree que algunas veces se origina del cáncer papilar o folicular que ya está presente. A este cáncer se le llama indiferenciado debido a que las células cancerosas no se parecen mucho a las células normales de la tiroides. Este cáncer a menudo se propaga rápidamente hacia el cuello y otras partes del cuerpo, y es muy difícil de tratar. La cirugía a menudo no es útil como tratamiento debido a que este cáncer ya se ha propagado ampliamente cuando es diagnosticado. Tampoco es eficaz el tratamiento con ^{131}I por lo cual no se utiliza. La radioterapia de haz externo, sola o combinada con quimioterapia, se puede administrar para tratar de reducir el tamaño del cáncer antes de la cirugía con el fin de aumentar la probabilidad de extirparlo totalmente, o después de la cirugía para tratar de controlar cualquier cáncer remanente en el cuello, o cuando el tumor es demasiado grande o se ha propagado ampliamente como para ser tratado con cirugía [54].

A pesar de que el MTC se considera una enfermedad rara, es objeto de una prolífica actividad de investigación. Su diagnóstico se puede realizar mediante biopsia por aspiración con aguja fina (FNAB: Fine-Needle Aspiration Biopsy) seguida de la detección de amiloide y, si es necesario, mediante determinación inmunohistoquímica de calcitonina. La determinación sérica de calcitonina es muy importante ya que se considera un marcador tumoral de MTC, útil tanto en el cribado pre-operatorio como en el seguimiento post-operatorio. El tratamiento del MTC puede ser quirúrgico, sistémico o ambos. La tiroidectomía con compartimiento central y disección lateral cervical ipsilateral o bilateral es el tratamiento quirúrgico apropiado. Algunos autores han informado una frecuencia de 7-23% de MTC con metástasis a distancia en la primera presentación clínica. Uno o dos tercios de los pacientes con MTC presentan enfermedad recurrente dentro de los 10 años posteriores al tratamiento inicial. Generalmente el MTC produce metástasis en el pulmón, el hígado, los huesos y el cerebro. Los pacientes con niveles elevados de calcitonina basal en suero durante el seguimiento post-operatorio son altamente sospechosos de recurrencia de la enfermedad, por lo que deben investigarse más a fondo con el fin de localizar posibles metástasis. El antígeno carcinoembrionario (CEA: Carcinoembryonic Antigen) es el otro marcador tumoral utilizado durante el

seguimiento. Sin embargo, según algunos autores, los procedimientos quirúrgicos también pueden inducir un aumento de ambos marcadores tumorales. Actualmente, la forma más apropiada de investigación para detectar MTC recurrente con marcadores tumorales elevados es a través de la modalidad PET/CT, utilizando el radiotrazador 6-[¹⁸F]Fluoro-L-dihidroxifenilalanina ([¹⁸F]FDOPA). Un enfoque combinado con 2-[¹⁸F]Fluoro-2-desoxi-D-glucosa ([¹⁸F]FDG) puede complementar a la [¹⁸F]FDOPA en pacientes con MTC agresivo. El mayor problema es que el tratamiento para el MTC avanzado es solo paliativo. Unos pocos fármacos inhibidores de la tirosina quinasa han sido recomendados para el tratamiento sistémico de pacientes seleccionados con MTC. Los pacientes que no puedan beneficiarse con estos fármacos necesitan incorporarse en ensayos clínicos utilizando otras terapias dirigidas [55].

Debido a la incidencia y densidad extremadamente altas de CCK2R en el MTC [53] y, como actualmente no existe una buena terapia para el MTC diseminado [55-57], este tipo de tumor se seleccionó para el desarrollo de péptidos radiomarcados basados en gastrina y CCK selectivos para estos receptores. Específicamente para el MTC se puede esperar una alta relación tumor/background en la región de la tiroides, dado que la glándula tiroidea normal no expresa cantidades medibles de receptores CCK2; y como tampoco lo expresan los tumores tiroideos no-medulares ni los adenomas paratiroideos, esta podría ser una herramienta diagnóstica diferencial para este tipo de cáncer [52]. La visualización utilizando radiopéptidos daría la oportunidad de diagnosticar el MTC, con una ventaja sobre otras técnicas de imagen, porque la presencia de receptores altamente expresados podría servir como una herramienta adicional para la terapia de esta neoplasia relativamente agresiva. Se ha demostrado que en el MTC también se expresan receptores de somatostatina, por lo que se ha estudiado la posibilidad de obtener imágenes de estos receptores con análogos de somatostatina radiomarcados [58], así como de realizar terapia a través de PRRT [55]. Esto ha tenido un valor limitado, probablemente debido a la disminución de la expresión de receptores de somatostatina con el mayor grado de desdiferenciación de las células tumorales del MTC (asociado a las formas clínicamente más agresivas del

MTC). En cambio los CCK2R parecen conservarse incluso en estos casos de desdiferenciación tumoral [58].

5.5. Radiopéptidos de CCK y gastrina dirigidos a tumores CCK2R positivos

Desde el descubrimiento inequívoco de la muy alta incidencia y densidad de los receptores CCK2 en los MTC a fines de la década de los 90, varios grupos europeos de investigación comenzaron a desarrollar radioligandos específicos dirigidos a esos receptores, con el fin de revelar *in vivo* dichos cánceres en pacientes [53]. Los compuestos de primera generación marcados con radiometales se basaron en análogos de CCK-8 (CCK(26-33)) no sulfatados (Figura 15). Fue así que Reubi y colaboradores [59] desarrollaron una serie de 10 análogos acoplados a los quelantes DTPA o DOTA para el marcado con ¹¹¹In, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia peptídica de CCK-8 y análogos.

Compuesto	Secuencia de aminoácidos
nsCCK(26-33)	Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [59]
[Nle ^{28,31}]-nsCCK(26-33)	Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ [59]
[D-Asp ²⁶ ,Nle ^{28,31}]-nsCCK(26-33)	D-Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ [59-61]
sCCK(26-33)	Asp-Tyr(SO ₃ H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [64]
[Thr ²⁸ ,Nle ³¹]-sCCK(25-33)	Arg-Asp-Tyr(SO ₃ H)-Thr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ [64]

ns = no sulfatado, s = sulfatado.

Los aminoácidos en “negrita” indican la secuencia COOH-terminal de unión al receptor CCK2R.

Fue reportada una alta afinidad por CCK2R en los compuestos con el quelante acoplado al extremo NH₂-terminal, mientras que aquellos con el quelante acoplado al extremo COOH-terminal presentaron una afinidad baja o no medible, al modificar su región bioactiva. Estos análogos de CCK-8 con alta afinidad por CCK2R presentaron además alta especificidad por este receptor, ya que ninguno mostró afinidad significativa por CCK1R. Esta especificidad estuvo determinada por la presencia de la tirosina no sulfatada (ns), ya que está bien establecido que una tirosina sulfatada en la posición 27 de CCK-33 (Figura 15) es necesaria para retener una alta afinidad por los receptores CCK1 y CCK2, ya sea en la CCK como en sus derivados más cortos. El reemplazo de la tirosina sulfatada por la tirosina (ns) da como resultado compuestos que se

unen selectivamente al CCK2R. Además, los compuestos DTPA-[Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33) y DTPA-[D-Asp²⁶,Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33) presentaron una mayor estabilidad en plasma humano (*in vitro*). Este aumento de la estabilidad plasmática probablemente se deba, en parte, a la sustitución de las dos metioninas (Met) por norleucinas (Nle) que poseen mayor resistencia a la oxidación (Figura 17). También se hicieron estudios preclínicos *in vivo* de ambos compuestos, los datos de biodistribución realizados en ratas sanas revelaron una rápida eliminación por excreción renal y una baja absorción/retención en los principales tejidos blandos periféricos, incluyendo estómago y riñones [59].

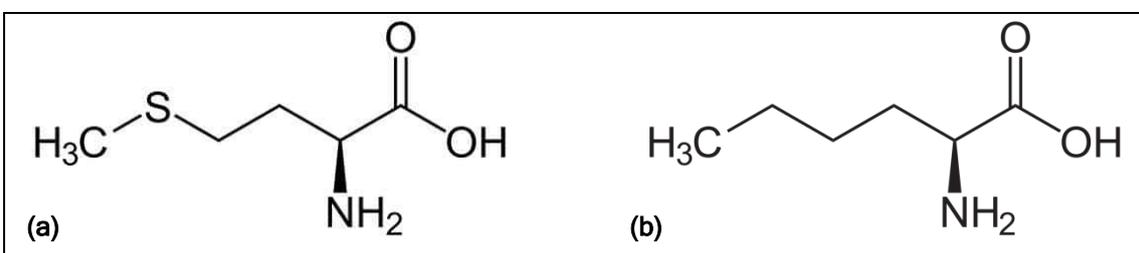


Figura 17. Fórmulas estructurales de los aminoácidos (a) metionina y (b) norleucina.

En base a estos resultados, de Jong y colaboradores [60] evaluaron *in vitro* e *in vivo* el potencial del compuesto [D-Asp²⁶,Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33) acoplado a los quelantes DTPA o DOTA para el marcado con ¹¹¹In (Tabla 7). El estudio *in vitro* del radiotrazador [¹¹¹In]In-DOTA-[D-Asp²⁶,Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33) mostró una internalización específica en células positivas para CCK2R. En tanto, el estudio *in vivo* de biodistribución en ratas portadoras de tumor reveló una captación específica en estómago y tumor (ambos con expresión de receptores de CCK2), además de una rápida eliminación por vía renal. También se realizó una evaluación inicial en humanos con [¹¹¹In]In-DTPA-[D-Asp²⁶,Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33). Fue así que el paciente con recurrencia local de MTC mostró captación en el estómago (CCK2R positivo) y en metástasis tumorales en la región del cuello hasta 48 h después de la inyección. Estos resultados alentadores llevaron a Kwekkeboom y colaboradores [61] a la evaluación de [¹¹¹In]In-DTPA-[D-Asp²⁶,Nle^{28,31}]-nsCCK(26-33) en pacientes con MTC para su diagnóstico clínico. A través de las imágenes centellográficas se pudo visualizar el estómago en todos los pacientes, e identificar algunas lesiones del MTC en pocos pacientes. Esta captación fue baja, tanto en el estómago como en los supuestos sitios

tumorales. El radiotrazador presentó excreción urinaria y una rápida degradación en suero. Por lo que se concluyó que son necesarios otros análogos de CCK con mayor estabilidad *in vivo*.

Al mismo tiempo que Reubi y colaboradores publicaron sus resultados con análogos de CCK-8 no sulfatados [59], Behr y colaboradores [62] publicaron sus estudios sobre la gastrina-I humana (Tabla 8) marcada con ^{131}I , también dirigida a los receptores CCK2 para su potencial aplicación en diagnóstico y terapia. Dicho heptadecapéptido no sulfatado fue elegido porque previamente mostró una alta afinidad por CCK2R y una muy baja por CCK1R. Además tenía la ventaja de poseer un residuo de piroglutamato (pGlu = pyroGlu) en su extremo NH_2 -terminal (Figura 18) que se sabía que protegía a los péptidos de la rápida degradación enzimática en suero, sumado al hecho de que el residuo de tirosina no sulfatado permitía la radioyodación de la molécula por métodos oxidativos convencionales, permitiendo obtener ^{131}I -Tyr 12 gastrina-I.

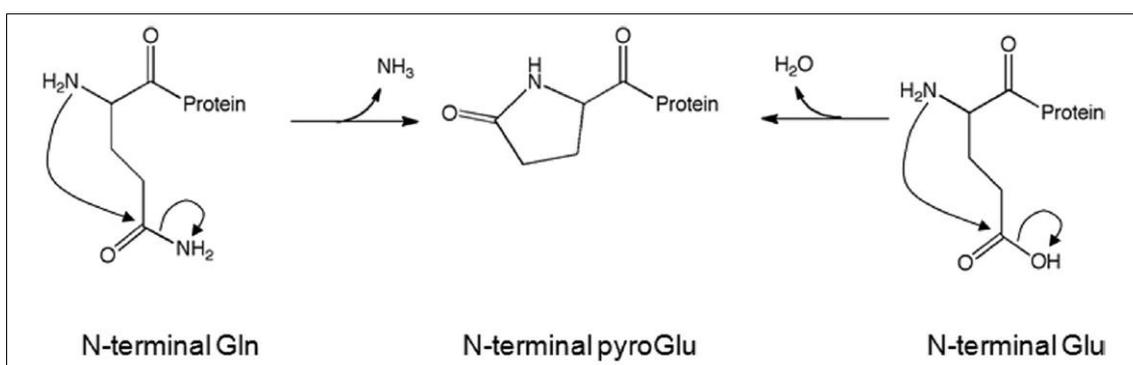


Figura 18. La formación del aminoácido cíclico piroglutamato se produce mediante la reorganización de los residuos de glutamina (Gln) o ácido glutámico (Glu) presentes en el extremo NH_2 -terminal de algunas proteínas y péptidos biológicos [63].

El estudio *in vivo* de biodistribución en ratones portadores de tumor reveló una captación específica en el tumor, así como en tejidos con expresión fisiológica de CCK2R, tales como vesícula biliar, estómago y páncreas. Las principales vías de excreción fueron la filtración renal y, en menor medida, la excreción biliar. También se realizó una evaluación clínica inicial en paciente con MTC. La exploración de cuerpo entero a las 2 h post-inyección (p.i.) mostró captación en el estómago, la vesícula biliar y el páncreas, así como en metástasis de mediastino y pulmón. Además, los estudios de terapia piloto en ratones portadores de tumor CCK2R positivo revelaron efectos antitumorales

significativos [62]. Sin embargo, quedaron por resolver problemas como la estabilidad *in vivo* y la acumulación potencialmente desfavorable en órganos normales. Eso llevó a que en una publicación posterior [64], el mismo grupo investigara una serie de 17 derivados de gastrina (no sulfatados) y CCK (sulfatados y no sulfatados) marcados con ¹³¹I y ¹²⁵I, algunos de los cuales se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 8. Secuencia peptídica de gastrina-I y análogos.

Compuesto	Secuencia de aminoácidos
Gastrina-I	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [62, 64]
[Leu ¹⁵]-gastrina-I	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH ₂ [64]
Minigastrina (o MG)	Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [64, 65]
[D-Leu ¹]-minigastrina	D-Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [64]
[D-Glu ¹]-minigastrina (o MG0)	D-Glu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [65-69]
MG9	D-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [69]
MG10	D-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [69]
MG11	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [68, 69]
H6-MG11	(His) ₆ -Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [68]
H2-MG11	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ [68]

pGlu = ácido piroglutámico.

Los aminoácidos en “negrita” indican la secuencia COOH-terminal de unión al receptor CCK2R.

Estos derivados fueron comparados tanto *in vitro* (afinidad por CCK2R) como *in vivo* en modelos animales con tumor. Los derivados no sulfatados de CCK tuvieron la menor afinidad por CCK2R *in vitro*, así como una menor captación *in vivo* en tumor y otros tejidos que expresan el receptor CCK2. En cambio los derivados sulfatados de CCK tuvieron la mayor afinidad *in vitro*, con una mejorada captación *in vivo* por CCK2R, pero también presentaron una alta captación en tejidos normales con expresión de CCK1R (probablemente debido a su similar afinidad por ambos receptores). En tanto los derivados de gastrina, con una afinidad *in vitro* intermedia entre los derivados no sulfatados y sulfatados de CCK, presentaron la mayor captación en tumor y las mejores relaciones Tumor/no Tumor, debido a su selectividad y afinidad por CCK2R.

Por ello, se seleccionaron los péptidos minigastrina (MG) y [D-Leu¹]-minigastrina para su acople a DTPA (en su extremo NH₂-terminal) y posterior marcado con ¹¹¹In, ya que este posee mejores características físicas que el ¹³¹I para la obtención de imágenes. Ambos radioligandos presentaron alta afinidad *in vitro* y alta captación en tumor y tejidos con expresión de CCK2R en animales, por lo cual se seleccionó el [¹¹¹In]In-DTPA-minigastrina para una evaluación clínica piloto en 3 pacientes con MTC metastásico. En todos los pacientes se observó captación en los tejidos con expresión fisiológica de CCK2R, principalmente en estómago, así como en todas las lesiones metastásicas conocidas, también se descubrió una lesión en hígado en uno de los pacientes, que fue posteriormente confirmada. Sin embargo, la captación en los riñones fue bastante alta [64].

Estos resultados alentadores obtenidos con los análogos de gastrina, condujeron a la marcación de los mismos con radionucleidos para terapia. El DTPA monofuncional había demostrado suficiente estabilidad en suero para la quelación del ¹¹¹In, pero no para otros radionucleidos terapéuticos. Fue por eso que Behr y colaboradores [65] sustituyeron el primer aminoácido de la minigastrina (Leu) por D-Glu, para luego acoplarlo al DTPA para su posterior marcado con radiometales. Se observó que el DTPA-D-Glu tuvo ventajas sobre el DTPA monofuncional, ya que el primero mostró una mayor estabilidad respecto a la quelación del radiometal, probablemente debida a que el grupo γ -carboxilo del aminoácido D-Glu pudiera estar involucrado en la estabilización de la complejación del radiometal. Se confirmó clínicamente la estabilidad mejorada de [¹¹¹In]In-DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina sobre [¹¹¹In]In-DTPA-minigastrina respecto a la transquelación del ¹¹¹In, según la menor captación en hígado y médula ósea debida a iones de In³⁺ liberados. El [¹¹¹In]In-DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina reveló lesiones metastásicas en 43 de 45 pacientes con MTC, por lo cual poco después fueron reportados los primeros resultados de la aplicación de [⁹⁰Y]Y-DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina en la terapia de 8 pacientes con MTC metastásico avanzado de rápida progresión. Se obtuvieron efectos terapéuticos alentadores, ya que 4 pacientes experimentaron una estabilización de la enfermedad y 2 pacientes una buena remisión parcial de la misma, pero al mismo tiempo se presentaron problemas de nefrotoxicidad bastante severos debido a la prolongada retención renal del radiofármaco [65]. Más tarde, este

mismo grupo de investigadores [66] concluyó que la alta captación renal del [^{111}In]In-DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina era debido al alto número de aminoácidos ácidos que posee el [D-Glu¹]-minigastrina (6 ácidos glutámicos y 1 ácido aspártico). Por lo que plantearon la posibilidad de reducir la captación renal del radiofármaco con la coinyección de aminoácidos ácidos (aniónicos). Fue así que obtuvieron una reducción de hasta un 90% en la captación renal en ratones al coinyectar cadenas de 5 o más ácidos glutámicos (L-Glu), mientras la captación tumoral no se vio afectada [66]. Esto permitió plantear la posibilidad de que existiera otro mecanismo de captación renal de péptidos radiomarcados, porque hasta ese momento se asumía que la captación renal de la mayoría de los péptidos o pequeñas proteínas podía ser inhibida por la administración de aminoácidos básicos (catiónicos) como lisina o arginina. Fue así que Gotthardt y colaboradores [67] demostraron que la inhibición de la acumulación renal de distintos radiopéptidos podría lograrse mediante lisina (catiónico) o ácidos poli-glutámicos (aniónico), pero no por ambos al mismo tiempo, lo que sugería dos mecanismos de captación diferentes. La acumulación renal del [^{111}In]In-DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina en ratas se redujo significativamente en un 85% con ácidos poli-glutámicos y en un 45% usando Gelofusine® (expansor de plasma a base de gelatina succinilada), mientras que la lisina no mostró un efecto significativo [67]. Dado que los ácidos poli-glutámicos no están aprobados para uso clínico, se continuaron desarrollando estrategias para reducir la captación renal de los análogos de minigastrina.

Con base en eso, Mather y colaboradores [68] tuvieron como objetivo identificar un radioligando que combinara la relativamente alta captación tumoral de péptidos pertenecientes a la familia de la gastrina, con la baja captación renal observada con los derivados de CCK. Para ello, prepararon una biblioteca de péptidos basados en la estructura COOH-terminal de la MG conjugados con DOTA y DTPA para su marcación con ^{111}In , algunos de los cuales se muestran en la Tabla 8. Estos péptidos fueron comparados tanto *in vitro* (afinidad por CCK2R) como *in vivo* en ratones nude con tumor inducido. El análogo de minigastrina que contiene la secuencia de pentaglutamato (MG0 = DTPA-[D-Glu¹]-minigastrina) mostró la mayor captación en tumor pero una muy alta retención renal. La eliminación de la secuencia de pentaglutamato (MG11 = DTPA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) redujo la captación tumoral en

un factor de 3 no obstante disminuyó la captación renal en un factor de 20. Con la idea de sustituir la secuencia aniónica de pentaglutamato con una secuencia catiónica, se insertaron varios residuos de histidina en la secuencia de MG11 (H6-MG11 = DOTA-(His)₆-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), y esto redujo apenas un poco más la captación en tumor y riñón. Resultó que un análogo de MG11 con 2 histidinas (H2-MG11 = DOTA-(His)₂-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) a pesar de disminuir la captación tumoral en un factor de 3 respecto a MG0, disminuyó la captación renal en un factor de 30 respecto al mismo. Otorgándole a este análogo con 2 histidinas la mayor relación Tumor/Riñón de todos los péptidos estudiados, con una captación saturable en los órganos blanco y una baja captación por los tejidos no blanco distintos del riñón. Algo interesante sucedió al sustituir el residuo de metionina por norleucina (no oxidable), porque tanto la afinidad del receptor *in vitro* como la captación tumoral *in vivo* se redujeron. Estos datos contrastan con los reportados para análogos de CCK y de gastrina [59, 64], en el que el cambio de metionina por norleucina no influyó de manera negativa. Además investigaron el efecto de la oxidación en el residuo de metionina de H2-MG11, y vieron que su análogo oxidado (DOTA-(His)₂-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met(sulfóxido)-Asp-Phe-NH₂) extinguió cualquier interacción específica del receptor *in vitro*, lo que fue coherente con una captación tumoral extremadamente baja *in vivo* [68]. Aunque previamente, Behr y colaboradores [64] habían afirmado que la oxidación de los residuos de Met no afectaba la capacidad de unión al receptor CCK2 *in vitro*, además de no apreciar diferencias significativas en el comportamiento biológico de los péptidos radioyodados, tanto sin impurezas como con impurezas conteniendo el residuo de metionina oxidado.

A su vez Good y colaboradores [69] expusieron que la afinidad de unión por el receptor CCK2 *in vitro* se redujo cuando el aminoácido metionina de [¹¹¹In]In-DOTA-MG11 fue reemplazado por norleucina (factor 2), isoleucina (factor 42), metionina-sulfóxido (factor 228) y metionina-sulfona (factor 249). Asimismo demostraron que al disminuir el número de glutamatos en MG0 (MG9, MG10 y MG11 de Tabla 8) disminuyó la captación renal en animales, lo que incrementó la relación Tumor/Riñón. Pero esto también disminuyó la estabilidad metabólica por degradación proteolítica, lo que probablemente sea la causa de la disminución en la captación tumoral de estos derivados de MG0 con menos

residuos de Glu, que fueron marcados con ^{111}In a través del quelante DOTA. La disminución de la captación renal podría explicarse por la pérdida de las cargas negativas de los ácidos glutámicos, quienes podrían ser los responsables de la reabsorción tubular de estos péptidos radiomarcados. Se concluye que, si bien se incrementó la relación Tumor/Riñón, se necesita seguir desarrollando nuevos análogos con mayor estabilidad metabólica que puedan mejorar la biodisponibilidad del radiofármaco [69].

Tomando en consideración todo lo anterior, se hace necesario encontrar un péptido radiomarcado con alta y selectiva captación por los tumores que sobreexpresen el CCK2R en combinación con una baja acumulación renal. De esta manera se evitaría obstaculizar la visualización de tumores en la cavidad abdominal al utilizar radionucleidos para diagnóstico, así como también evitaría un posible daño o falla renal al utilizar radionucleidos para terapia. Es por ello que en esta tesis de Posgrado en Química se selecciona uno de los péptidos análogos de minigastrina acoplado al macrociclo DOTA, que hasta ese momento había presentado una de las más favorables relaciones Tumor/Riñón al ser marcado con ^{111}In . A través del DOTA-H2-MG11 se pretende adquirir un conocimiento sólido sobre la marcación de péptidos con radiometales, para luego estudiar y profundizar respecto a similitudes y diferencias del marcado tanto con ^{68}Ga como con ^{177}Lu , de modo de evaluar su potencialidad como parateragnóstico para tumores que sobreexpresan el receptor CCK2.

6. CAPÍTULO I: Marcación con Galio-68

6.1. Introducción

El Galio (Ga) es un elemento metálico del bloque p de la tabla periódica. Posee 29 isótopos, pero sólo dos son los estables que se encuentran en la naturaleza, el ^{69}Ga y el ^{71}Ga , con una abundancia de 60.1% y 39.9% respectivamente [70]. El ^{68}Ga es un isótopo radiactivo que decae a ^{68}Zn (estable) principalmente por emisión de positrones (89%), los cuales poseen una energía máxima de 1899 keV (energía promedio de 890 keV) [71]. Su $T_{1/2}$ de 68 min lo hace compatible para marcar vectores de direccionamiento de bajo peso molecular y circulación rápida, como péptidos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros y oligonucleótidos [26]. Es producido artificialmente por el decaimiento del ^{68}Ge a través de captura electrónica (100%) con un $T_{1/2}$ de 271 días (Figura 19). Es así que el ^{68}Ga puede ser obtenido a partir de un sistema generador gracias al equilibrio radiactivo que se establece entre el ^{68}Ge y el ^{68}Ga .

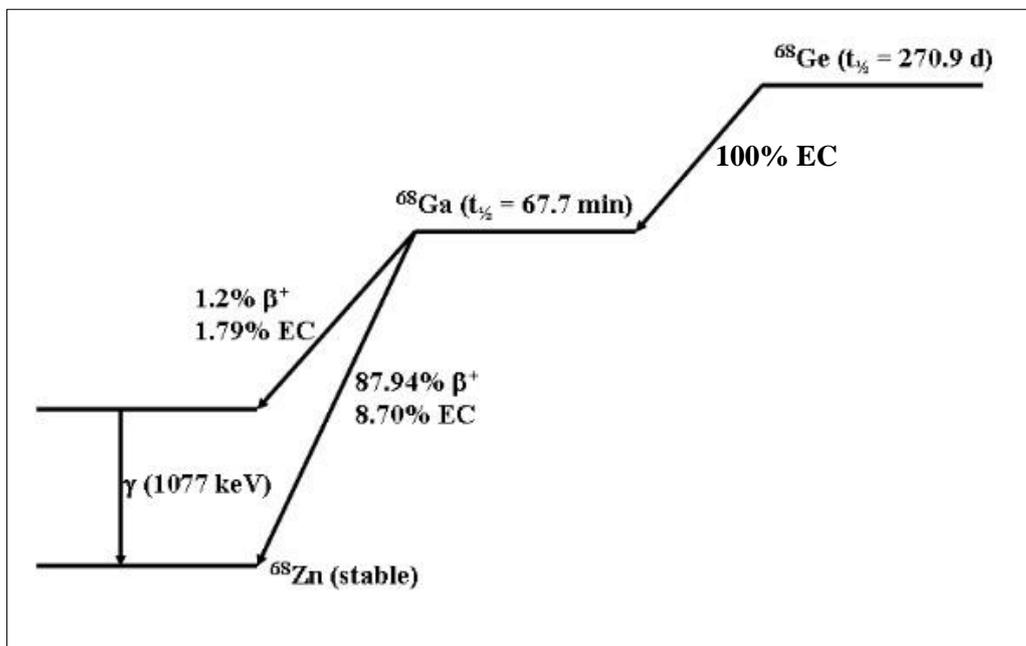


Figura 19. Esquema de decaimiento simplificado para ^{68}Ge y su hijo ^{68}Ga . El ^{68}Ga decae por una combinación de captura electrónica y emisión de positrones principalmente al estado fundamental del ^{68}Zn , pero también con una ramificación a un estado excitado a 1077 keV con una probabilidad del 3%.

El ^{68}Ge (padre) es producido en un ciclotrón de alta energía (> 20 MeV) por varias rutas alternativas, principalmente utilizando las reacciones nucleares

$^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ y $^{\text{nat}}\text{Ga}(p,xn)^{68}\text{Ge}$ (representado por las reacciones $^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge} + ^{71}\text{Ga}(p,4n)^{68}\text{Ge}$) según la Figura 20 [72, 73].

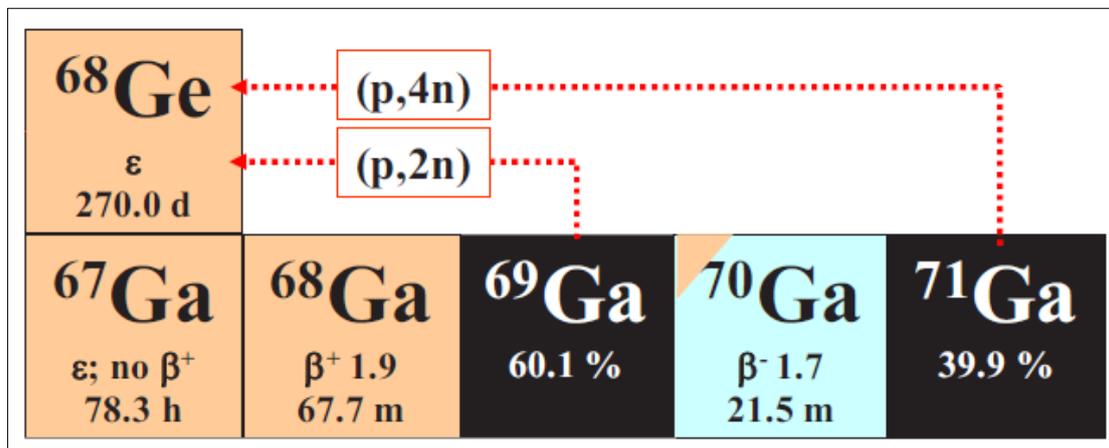


Figura 20. Extracto de la tabla de nucleidos de Karlsruhe indicando los principales procesos de producción de ^{68}Ge utilizando aceleradores de protones de alta energía [modificado de 72].

Al finalizar la irradiación del "blanco" ("target") sólido de $^{69,\text{nat}}\text{Ga}$, el ^{68}Ge producido es separado químicamente y luego inmovilizado en una columna empacada con una matriz inorgánica, orgánica o mixta, situada en un contenedor blindado. Allí decae espontáneamente a ^{68}Ga , el cual puede extraerse selectivamente por el pasaje de un eluyente apropiado, obteniendo así un sistema autónomo productor de radionucleido (^{68}Ga en este caso) llamado generador (Figura 21) [71].

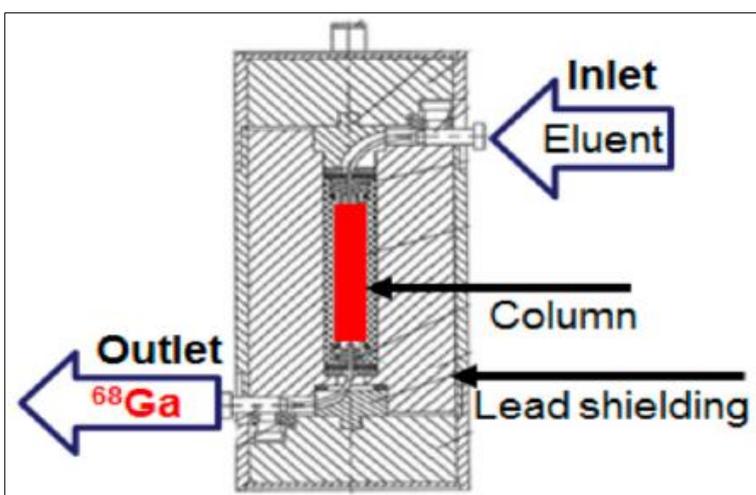


Figura 21. Esquema de la sección transversal de un generador [71].

El par $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ establece un equilibrio secular debido a que la relación entre el $T_{1/2}$ del padre y el $T_{1/2}$ del hijo es mayor a 100 (específicamente 5762), esto hace que se necesiten 14 h para alcanzar el equilibrio, momento en el cual la actividad del ^{68}Ga se hace máxima y se iguala a la del ^{68}Ge [71]. Sin embargo, a los 68 min post-elución ($1 T_{1/2}$) ya se acumula el 50% de la radiactividad máxima alcanzable, a las 4 h ($3.5 T_{1/2}$) el 91% y a las 6 h ($5.3 T_{1/2}$) el 97% (Figura 22).

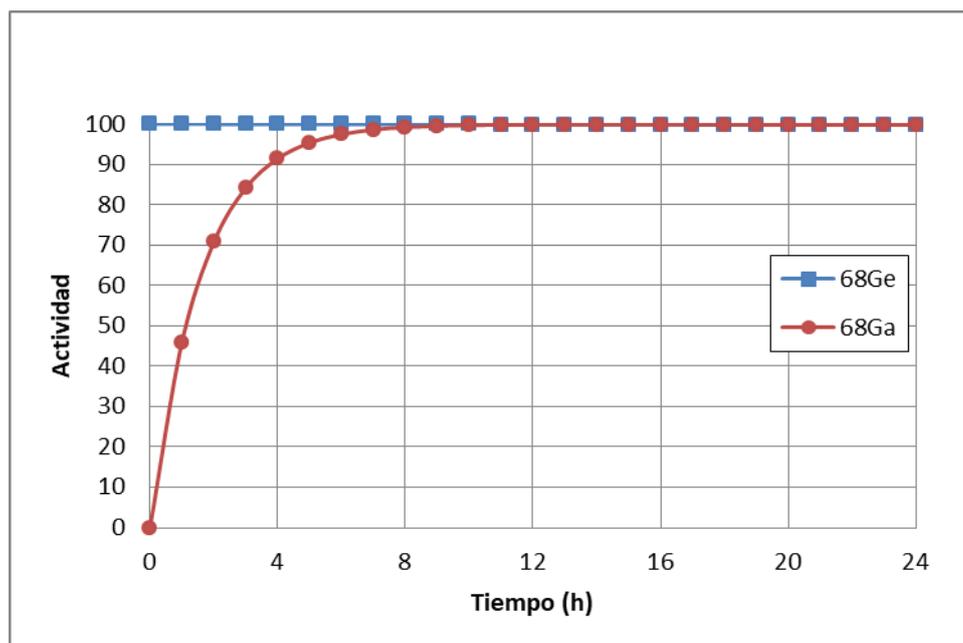


Figura 22. Gráfico del equilibrio secular que se establece con el decaimiento del ^{68}Ge y la acumulación y decaimiento del ^{68}Ga (realizado con las ecuaciones teóricas).

En la práctica, la extracción de ^{68}Ga de la columna cromatográfica del generador es inferior a la teórica esperada, por lo cual se define como eficiencia de elución a la proporción del ^{68}Ga real obtenido (eluido del generador) respecto al valor teórico esperado. Esta eficiencia de elución depende de la matriz de la columna y de la "fuga" ("breakthrough") de ^{68}Ge , y puede descender con el transcurso del tiempo [71] por razones químicas, fisicoquímicas o radiolíticas, debido al número creciente de separaciones y al almacenamiento [74]. Las matrices inorgánicas tales como TiO_2 , SnO_2 , CeO_2 y ZrO_2 , son las más utilizadas debido a que son menos sensibles a la radiólisis [71], pero tienen el inconveniente de liberar impurezas metálicas al eluido de ^{68}Ga , quienes competirán luego con este en las marcaciones. Por otro lado, las matrices orgánicas presentan la ventaja de no liberar impurezas metálicas pero

son más sensibles a la radiolisis, por lo que se continúan realizando investigaciones para mejorar estas deficiencias. Como ejemplo de matriz orgánica se puede citar a la resina pirogalol-formaldehído, donde el ^{68}Ge es adsorbido debido a la formación de complejos muy estables entre el Ge(IV) y los grupos fenólicos [72]. Otro ejemplo es la sílica gel (SiO_2) modificada con galato de dodecilo, comercializado en la actualidad por la compañía ITG de Alemania [75].

La mayoría de los generadores usan un eluyente ácido ya que proporciona $^{68}\text{Ga(III)}$ en su forma catiónica, lo que permite una posterior química de marcación versátil y directa, además de un ambiente no favorable para el crecimiento microbiológico. Los generadores comerciales modernos ofrecen ventajas tales como una larga vida útil de 1 a 2 años, matrices de columnas estables, forma química catiónica de $^{68}\text{Ga(III)}$, así como un rendimiento reproducible y robusto. Existen varios de ellos (Figura 23) con variación en la molaridad del eluyente (HCl), el contenido de cationes metálicos (impurezas en el eluido) y breakthrough de ^{68}Ge [71].

	Eckert & Ziegler Cyclotron Co. Ltd.	Eckert & Ziegler IGG100 and IGG101 GMP; Pharm. Grade	I.D.B. Holland B.V.	Isotope Technologies Garching
				
Column matrix	TiO_2	TiO_2	SnO_2	$\text{SiO}_2/\text{organic}$
Eluent	0.1 M HCl	0.1 M HCl	0.6 M HCl	0.05 M HCl
^{68}Ge breakthrough	<0.005%	<0.001%	~0.001%	<0.005%
Eluate volume	5 mL	5 mL	6 mL	4 mL
Chemical impurity	Ga: <1 $\mu\text{g}/\text{mCl}$ Ni < 1 $\mu\text{g}/\text{mCl}$	Fe: <10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ Zn: <10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	<10 ppm (Ga, Ge, Zn, Ti, Sn, Fe, Al, Cu)	Only Zn from decay
Weight	11.7 kg	10 kg 14 kg	26 kg	16 kg

Figura 23. Ejemplos de generadores comerciales modernos de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ [71].

El ^{68}Ga ha desempeñado un papel notable en el crecimiento mundial de la investigación clínica y los estudios clínicos de rutina con PET en los últimos 20 años. Aunque los generadores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ se introdujeron hace más de 50 años, el factor más importante para el reciente crecimiento de los radiofármacos de ^{68}Ga fue el progreso en el diseño del generador. Esta nueva generación de generadores, que suministra ^{68}Ga como $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$, ha resuelto

problemas críticos de impurezas y ha permitido la disponibilidad comercial de generadores. Esta mayor disponibilidad motivó mayores esfuerzos en la producción de radiofármacos de ^{68}Ga . Además, la química de la quelación del galio había madurado tras más de 30 años de investigación, de modo que el diseño de radiofármacos de ^{68}Ga , en particular los radiotrazadores basados en péptidos, se volvió relativamente sencillo. Hoy en día, el crecimiento de estos radiofármacos ha sido tal, que el número de generadores disponibles no puede satisfacer cómodamente la demanda actual, es así que se han planteado rutas alternativas para la producción de ^{68}Ga [76].

El ^{68}Ga se puede producir en un ciclotrón de pequeña a mediana energía a través de la reacción $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ (Figura 24). Sin embargo varios aspectos se tienen que considerar para la producción por este método, comenzando con la irradiación del blanco, para disminuir impurezas radionucleídicas de Ga que no serán posibles de separar. La energía del haz de protones debe ser optimizada para evitar la reacción $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$ que es altamente competitiva, así como disponer de un blanco enriquecido en ^{68}Zn de alta pureza para disminuir la reacción $^{66}\text{Zn}(p,n)^{66}\text{Ga}$, entre otras [76].

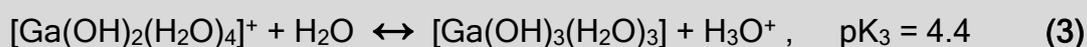
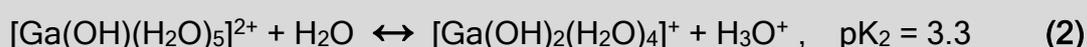
^{67}Ga ϵ ; no β^+ 78.3 h	^{68}Ga β^+ 1.9 67.7 m	(p,n)
^{66}Zn 27.9 %	^{67}Zn 4.1 %	^{68}Zn 18.8 %

Figura 24. Extracto de la tabla de nucleidos de Karlsruhe indicando el principal proceso de producción de ^{68}Ga utilizando aceleradores de protones de pequeña a mediana energía.

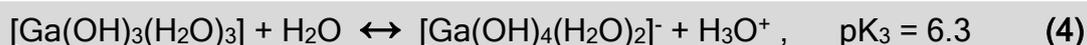
Algo importante a señalar, es que el blanco a irradiar además de ser sólido puede ser líquido. Aunque este último tiene un rendimiento menor que el primero, posee la ventaja de que puede ser producido aprovechando la infraestructura y competencias del personal ya existente para producir otros radionucleidos PET, como el ^{18}F , evitando las dificultades técnicas de fabricación y manipulación de los blancos sólidos. Aunque no se necesita ningún equipo adicional especial, se requiere de un blanco de uso exclusivo y

tener sumo cuidado para evitar la contaminación por metales en todos los aspectos que refieren a la preparación y manipulación de la solución. Esto incluye el control de los materiales a los que está expuesta la solución en el sistema, desde su carga y transferencia al blanco hasta su purificación post-irradiación. Debido a que el blanco líquido con los mejores atributos hasta el momento está constituido por soluciones de nitrato de zinc (enriquecido en ^{68}Zn) en ácido nítrico diluido, se hace mandatorio un mantenimiento apropiado para evitar el deterioro de todas las partes del sistema. El paso final es la purificación del ^{68}Ga producido, tanto su separación de la gran cantidad de ^{68}Zn en exceso como la remoción de otros contaminantes metálicos no deseados. El producto final puede tener la forma química de $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$, la misma que la obtenida por eluido de generador, sin embargo la concentración y el pH pueden diferir de un método a otro. Cabe destacar, que al día de hoy se continúa trabajando activamente en la optimización de esta ruta alternativa de producción por ciclotrón [76].

En solución acuosa, el estado de oxidación más estable del galio es el +3, y el ion Ga(III) libre hidratado es estable solamente en condiciones ácidas ($\text{pH} < 3$). A medida que se eleva el pH ($3 < \text{pH} < 7$) ocurre la hidrólisis (reacciones 1-3), lo que conduce a la formación de $[\text{Ga}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3] = \text{Ga}(\text{OH})_3$ insoluble [77, 78], que generalmente es referido como “especies coloidales insolubles” o coloide.



Si el pH continúa aumentando ($\text{pH} > 7$), el $\text{Ga}(\text{OH})_3$ se re-disuelve como $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^- = [\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ según la reacción 4 [77, 78].



El ion Ga(III) en solución acuosa se presenta en un sistema con equilibrios múltiples, por lo cual, en un diagrama de distribución de especies (Figura 25) se puede apreciar qué especies (y en qué proporción) están presentes a diferentes valores de pH [78].

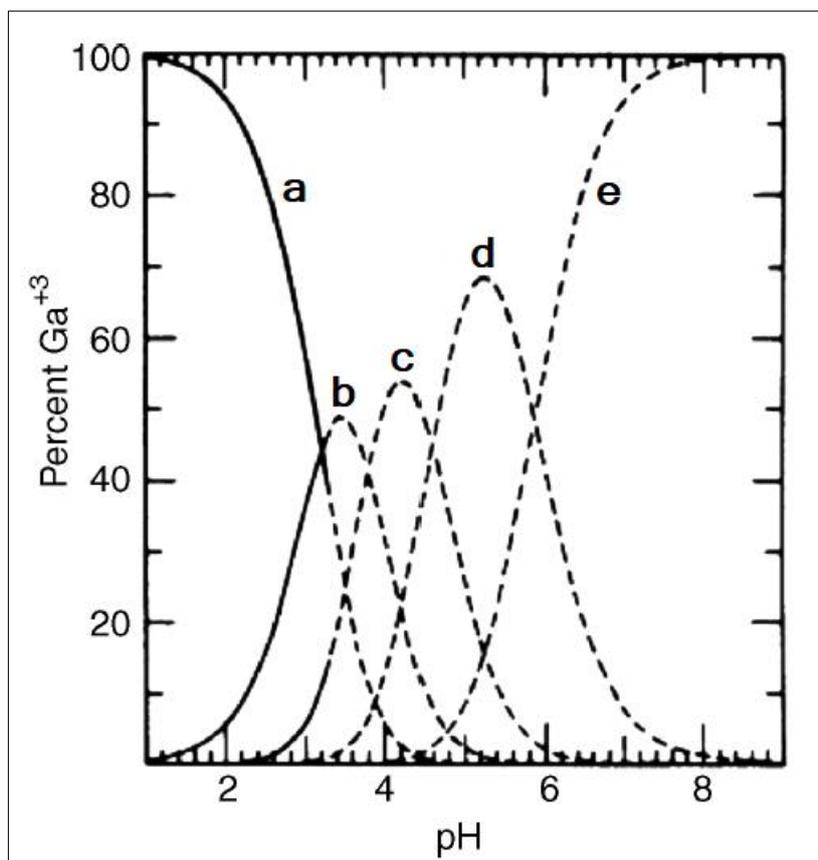


Figura 25. Distribución de las especies en función del pH para Ga^{3+} 10 μM . Las especies son: (a) $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, (b) $[\text{Ga}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, (c) $[\text{Ga}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$, (d) $[\text{Ga}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$, (e) $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ [78].

En resumen, las principales especies de galio formadas en solución acuosa a distintos pH se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Formación de varias especies de Ga dependientes de pH [71].

pH	Especies	Solubilidad
0-3	$\text{Ga}^{3+}; [\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	Soluble
3-7	$\text{Ga}(\text{OH})_3$	Insoluble
>7	$[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$	Soluble

Es así que el pH se vuelve un punto clave en la química del galio, relevante para la síntesis radiofarmacéutica. La mayor cantidad de marcaciones con ^{68}Ga se realizan a través del método del quelante bifuncional (sección 3.4.2), utilizando quelantes basados en poliaminocarboxilatos que forman enlaces de coordinación con el metal. Estos quelantes se encuentran protonados a pH muy bajo, por lo que requieren de un aumento del mismo para desprotonar los grupos ácido carboxílico y amino, y mejorar así la cinética de incorporación del

^{68}Ga al quelante. Habitualmente para ello se hace necesario un $\text{pH} > 3$, con lo cual parte del ^{68}Ga se encuentra insoluble como $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{OH})_3$, y no puede ser incorporado al quelante. Es así que se hace necesaria la utilización de ligandos estabilizadores que mantengan en solución al ^{68}Ga a un $\text{pH} > 3$. Estos ligandos estabilizadores forman rápidamente complejos débiles con el ^{68}Ga , evitando que precipite el radiometal mientras ocurre el proceso de intercambio del mismo con otro ligando que forma un complejo termodinámicamente más estable pero con una cinética más lenta [77]. Se han estudiado varios ligandos estabilizadores, entre ellos el HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico) y el acetato han presentado las mejores características, siendo este último apto para uso farmacéutico. Además estos ligandos se utilizan para proveer el pH necesario en la reacción de marcación, por lo que tienen una doble función, como buffers y como agentes estabilizantes [71, 79].

El $\text{Ga}(\text{III})$ es un ácido duro que puede formar complejos tetra-, penta- y hexacoordinados, siendo los complejos hexacoordinados los más estables con una esfera de coordinación octaédrica. Los átomos donantes de electrones como el oxígeno y el nitrógeno, forman enlaces coordinados estables con el $\text{Ga}(\text{III})$ a través de grupos funcionales tales como amina, carboxilato, hidroxamato y fenolato [15]. El macrociclo DOTA ha sido ampliamente utilizado para trazadores basados en $^{66/67/68}\text{Ga}$ a pesar de no proporcionar los complejos más estables. La estructura de estado sólido del $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})]^+$ revela un patrón de coordinación hexadentado N_4O_2 con geometría octaédrica distorsionada (Figura 26). El gran tamaño del anillo es la causa de una distorsión significativa y dificulta la estabilidad termodinámica del complejo ($\log K_{\text{ML}} = 21.3 - 26.1$), aunque a pesar de ello, presenta buena inercia cinética frente a la labilidad. Además, se suma el hecho de que este quelante también puede ser utilizado en la coordinación de radionucleidos para terapia con radio iónico mayor, como $^{90}\text{Y}(\text{III})$ ($\log K_{\text{ML}} = 24.3 - 24.9$) o $^{177}\text{Lu}(\text{III})$ ($\log K_{\text{ML}} = 21.6 - 29.2$) [26]. Por lo que al utilizar DOTA como agente quelante bifuncional en un radiofármaco, se tiene la posibilidad de obtenerlo tanto con ^{68}Ga para diagnóstico como con $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ para terapia, produciendo teóricamente moléculas marcadas con alteraciones relativamente menores entre sí.

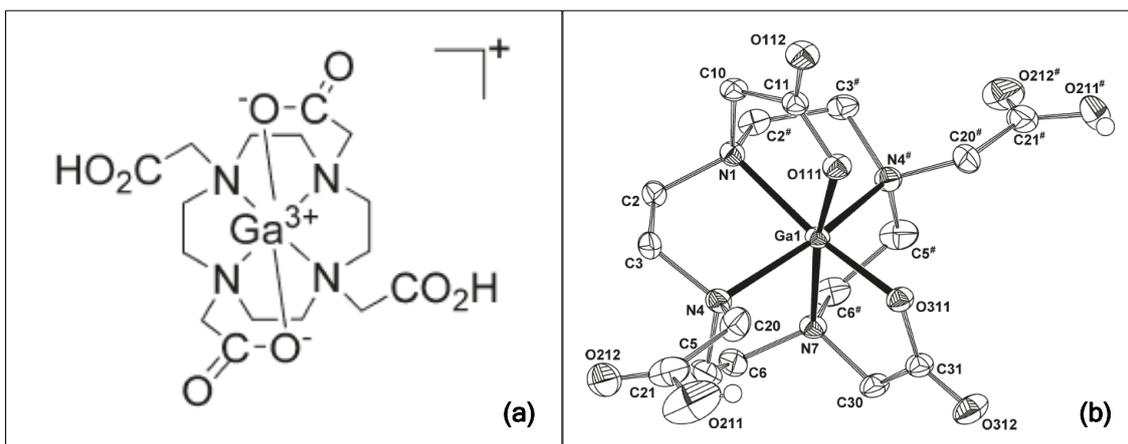


Figura 26. (a) Fórmula estructural y (b) estructura molecular de $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})]^+$ [80].

Un último aspecto a tener en cuenta es que las impurezas contenidas como cationes metálicos compiten en la reacción de marcación del $^{68}\text{Ga}(\text{III})$, disminuyendo así la eficiencia del marcado. Uno de los más importantes competidores es el $\text{Fe}(\text{III})$ porque tiene carga, radio iónico, número de coordinación y configuración electrónica muy similar, lo que hace que ambos tengan también una química muy similar [77]. Con el objetivo de disminuir las impurezas metálicas, se hace necesario utilizar tanto reactivos con una muy elevada pureza, como materiales plásticos (evitar materiales metálicos y de vidrio), hasta que finalice la etapa de marcación. Inevitablemente el $\text{Zn}(\text{II})$ estará siempre presente por ser el producto de decaimiento del ^{68}Ga , y este compite fuertemente en la formación del complejo con DOTA. Así pues, en el caso de utilizar ^{68}Ga de generador, es conveniente realizar una elución regular y previa a la síntesis para reducir la concentración de $\text{Zn}(\text{II})$ estable en el marcado [71].

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

Se utilizó acetato de sodio (NaOAc) y ácido clorhídrico 30% de calidad Suprapur de Merck. El resto de los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica o superior. Se empleó ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), hidróxido de sodio, solución de amoníaco al 25% (NH₄OH) y etanol (EtOH) de Merck. La L-metionina y el nitrato de galio(III) se adquirieron de Sigma-Aldrich, y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 30 volúmenes de DI (Uruguay). El ácido trifluoroacético (TFA) y el HEPES (free acid) fueron obtenidos de J.T. Baker, en tanto el acetonitrilo (grado HPLC), el acetato de amonio (NH₄OAc) y el metanol (MeOH) fueron obtenidos de Carlo Erba. El precursor DOTA-H2-MG11 (Figura 27) se adquirió de piCHEM como su sal de TFA (DOTA APH070 Minigastrin). En tanto el DOTA.6H₂O se obtuvo de Macrocyclics. El péptido Minigastrina I (humana) (Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, peso molecular: 1646.8 g/mol) se adquirió de LifeTein, LLC. El agua bidestilada y el suero fisiológico (NaCl 0.9%) se obtuvieron de Fármaco Uruguayo (FU).

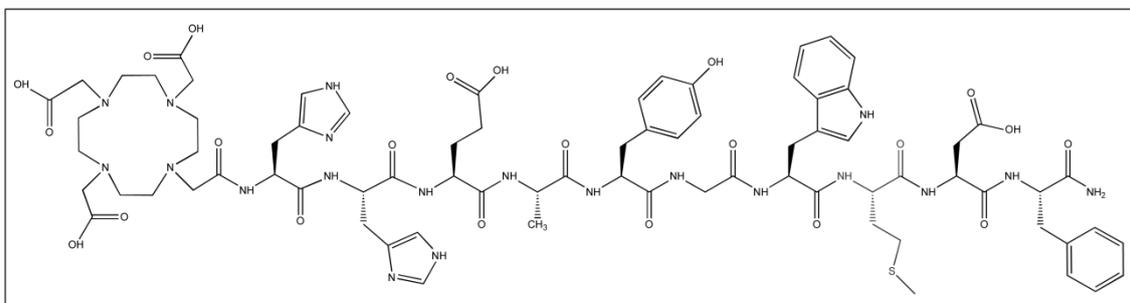


Figura 27. Estructura química de DOTA-H2-MG11 (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), peso molecular: 1677.8 g/mol.

Las reacciones de marcación se realizaron en **a)** criotubos de 5 mL, de polipropileno con rosca exterior, obtenidos de Simport (T310-5A) o **b)** tubos de microcentrifuga (microtubos) de 2 mL, de polipropileno con tapa rosca y fondo cónico obtenidos de Simport (T332-7).

La purificación del radiotrazador de las reacciones de marcación se realizó por extracción en fase sólida a través de cartuchos Sep-Pak® C18 light y Sep-Pak® C8 light de Waters.

El pH de las reacciones de marcación se determinó con cinta indicadora de pH de Macherey-Nagel (rango 0.5 - 5.5) o tiras indicadoras de pH de Merck (rango 5.0 - 10.0).

6.2.2. Equipos

Todas las soluciones conteniendo agua fueron preparadas con agua ultrapura de resistividad de 18.2 MΩ.cm (25°C), obtenida al momento de uso de un equipo Millipore Direct-Q™ 5 (agua Milli-Q).

El ^{68}Ga empleado en las marcaciones fue obtenido en la forma de $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ por elución de generadores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Se utilizaron generadores con matriz orgánica (ITG Isotope Technologies Garching GmbH) eluidos con 4.0 mL de HCl 0.05 M. Cuando fue necesario, se realizó elución fraccionada de manera de aumentar la concentración de actividad a utilizar en los marcados.

El calentamiento de las reacciones de marcación se realizó en una incubadora de baño seco MRC DBD-001 (Dry Bath incubator), equipado con bloque de aluminio con orificios de tamaño adecuado para acomodar los dos tipos de tubos utilizados. Las temperaturas fijadas en 90°C, 100°C y 115°C, fueron medidas con termómetro de mercurio colocado en microtubo conteniendo agua Milli-Q, resultando en 84°C, 92°C y 100°C respectivamente.

Las medidas de actividad se realizaron en un calibrador de dosis Capintec CRC® -ULTRA y un espectrómetro de centelleo sólido con geometría de pozo, con cristal de NaI (TI) de 3 x 3 pulgadas, acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®.

El pH de soluciones no radiactivas se determinó con un pHmetro EquipLab PH220.

6.2.3. Métodos analíticos

6.2.3.1. Análisis por HPLC

El análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se realizó en un equipo “Shimadzu LCsolution” provisto con un detector de arreglo de fotodiodos

(UV-Visible) conectado en serie con un detector gamma (Lablogic). Como fase estacionaria, se utilizó una columna C18, 5 μm , tamaño de poro de 11 nm, 150 x 4.6 mm (Nucleodur 100-5 C18 ec, Macherey-Nagel). Como fase móvil se utilizó un sistema de dos solventes, una fase móvil A (0.1% de TFA en agua) y una fase móvil B (0.1% de TFA en acetonitrilo), en la que se ensayaron cuatro combinaciones para la elución en gradiente (Tabla 10 y Figura 28) y una combinación para elución isocrática (25% B por 18 min [37]), todas a un flujo de 1 mL/min.

Tabla 10. Combinaciones utilizadas para la elución en gradiente del HPLC según el % de la fase móvil B.

t (min)	B (%)			
	Gradiente 0 [81]	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3
0	0	0	20	20
3	0	0	-	-
5	25	25	-	-
18	-	-	-	38
20	40	40	40	20
23	-	0	20	-
25	60	-	-	20
28	0	0	20	-
33	0	-	-	-

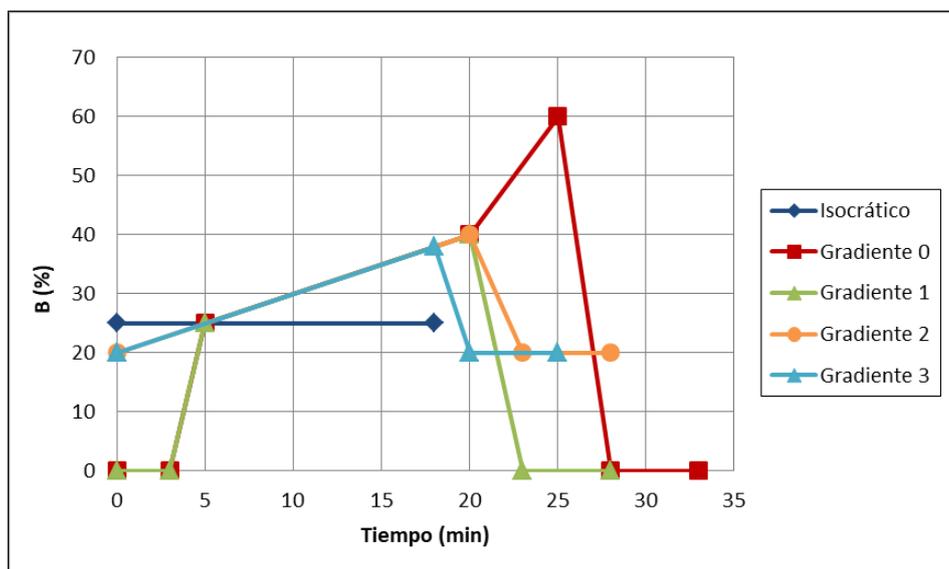


Figura 28. Variación del % de la fase móvil B en función del tiempo para los distintos sistemas de elución ensayados por HPLC.

El porcentaje de actividad de cada pico se calculó como el porcentaje del área presente debajo de cada pico con respecto al área total integrada (todos los

picos radiactivos sumados más todo segmento de línea de base elevada). Cabe destacar que el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide es retenido en la columna, por lo cual la presencia de esta especie no fue determinada por este método analítico.

6.2.3.2. Análisis por TLC

La presencia de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide se determinó por cromatografía en capa fina (TLC), más específicamente por cromatografía en capa fina instantánea (iTLC), empleando como fase estacionaria papel cromatográfico de microfibra de vidrio, sin aglomerante, impregnado con gel de sílice (SG). Este papel de iTLC-SG (Agilent Technologies) se cortó en tiras de 9.5 x 1.0 cm (Figura 29) para su uso. La muestra se sembró a 1.5 cm del borde inferior, se secó con aire frío y se colocó en una cámara conteniendo aproximadamente 1 cm de alto de fase móvil. Se ensayaron diversas fases móviles: a) MeOH:NH₄OAc 1 M en distintas combinaciones: (1:1) [82], (2:1), (1:0) y (0:1), b) 0.1% de TFA en agua:0.1% de TFA en acetonitrilo (75:25), c) NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) [83] y d) TFA en agua a distintas concentraciones: 1% a 5% [84] y 6%.

Se permitió el avance de la fase móvil en la tira hasta 0.5 cm del borde superior, luego se secó con aire caliente y se midió en un escáner EZ-SCAN con detección gamma (Carroll and Ramsey Associates), utilizando un software de integración de cromatografía PeakSimple 2000 (SRI Instruments). Para cada pico, el equipo informa el tiempo de retención (t_R , en minutos) a partir del borde inferior, por lo cual, si se tiene en cuenta la velocidad de barrido del escáner (2 cm/min) se puede calcular su relación de frente (R_f) según:

$$R_f = \frac{t_R - 0.75}{3.75}$$

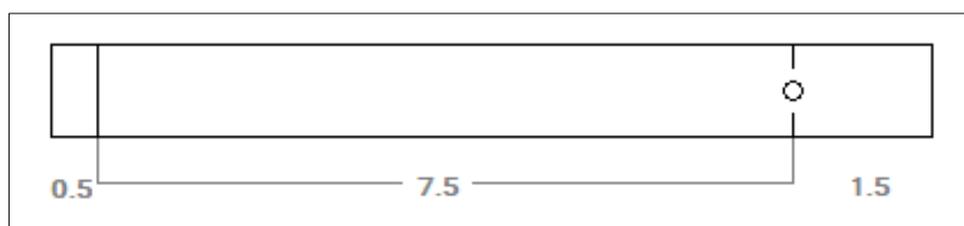


Figura 29. Representación de tira de iTLC-SG. La siembra se realizó a 1.5 cm del borde inferior (derecha) y se permitió su desarrollo hasta 0.5 cm del borde superior (izquierda).

El porcentaje de [⁶⁸Ga]Ga-coloide se determinó de dos maneras, dependiendo de la migración de las especies con la fase móvil (sección 6.3.1.3.).

6.2.4. Oxidación de DOTA-H2-MG11

Está reportado que en la marcación de la molécula DOTA-H2-MG11 con ¹¹¹In y ¹⁷⁷Lu se obtiene indefectiblemente una impureza causada por la oxidación “*in situ*” del residuo de metionina del péptido [68, 81]. Por lo cual, se hizo necesaria la preparación de este producto de oxidación para su identificación en el sistema de HPLC con Gradiente 1, en el que se utilizó el detector UV ($\lambda = 214$ y 280 nm). Esta impureza se preparó por oxidación intencional del precursor (DOTA-H2-MG11) con solución de H₂O₂, ya que este oxidante había sido utilizado con éxito en la oxidación de diversos compuestos organosulfurados [85], así como de péptidos conteniendo metionina en su estructura [64].

El precursor liofilizado (DOTA-H2-MG11) se disolvió en agua Milli-Q de manera de tener una solución de concentración 1 mg/mL (596 μ M). Esta se fraccionó en volúmenes de 20 μ L, 45 μ L y 100 μ L en microtubos de 0.5 mL para almacenar en freezer a -20°C. Cada fracción fue descongelada inmediatamente antes de ser utilizada.

Para el estudio de oxidación, se mezcló 45 μ L de DOTA-H2-MG11 (1 mg/mL) con 45 μ L de H₂O₂ (30 vol. \sim 2.7 M) en microtubo de 2 mL y se mantuvo a temperatura ambiente (T.A.). Se analizó la mezcla por HPLC a $t = 0$ y $t = 30$ min. Por otro lado se mezcló 10 μ L de DOTA-H2-MG11 (1 mg/mL) con 10 μ L de H₂O₂ (30 vol.) en microtubo de 2 mL y se incubó durante 7 min en bloque de calentamiento a 84°C. Se analizó posteriormente por HPLC.

También está reportado que el calentamiento necesario para la marcación de este precursor a temperaturas mayores de (70-80)°C aumenta la oxidación del mismo [68, 81]. Por lo que se realizó un blanco de reacción quitando únicamente el ⁶⁸Ga de la mezcla, para así evaluar si el calentamiento por sí mismo podía producir la oxidación de la molécula precursora. Para ello se mezcló en microtubo de 2 mL: 500 μ L de HCl 0.05 M (en sustitución del eluido), 25 μ L de NaOAc 1.14 M y 12 μ L de DOTA-H2-MG11 (1 mg/mL) que se incubó

durante 7 min en bloque de calentamiento a 84°C. Se analizó por HPLC la mezcla antes y después del calentamiento.

Para corroborar si el efecto del calentamiento repercutía en la oxidación del residuo de metionina del péptido, se realizó una marcación no radiactiva del precursor con Galio, sustituyendo el ^{68}Ga por $^{\text{nat}}\text{Ga}$, y utilizando 10 veces más moles de $^{\text{nat}}\text{Ga}$ que de precursor [86] para asegurar una incorporación cuantitativa. Por tanto, en microtubo de 2 mL se mezcló 8.94 μL de $^{\text{nat}}\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 50 mM, 500 μL de HCl 0.05 M (en sustitución del eluido), 25 μL de NaOAc 1.14 M y 75 μL de DOTA-H2-MG11 (1 mg/mL). Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 92°C. Se analizó posteriormente por HPLC.

En último lugar se realizó la oxidación intencional (con solución de H_2O_2) del péptido marcado anteriormente con $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ($^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DOTA-H2-MG11). Para ello, se mezcló 100 μL de la marcación no radiactiva con 10 μL de H_2O_2 (30 vol.) en microtubo de 2 mL y se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 92°C. Luego se analizó por HPLC.

6.2.5. Marcación inicial de [^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11

Las primeras marcaciones de DOTA-H2-MG11 con ^{68}Ga se basaron en la marcación manual de [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE optimizada en el CUDIM [87].

La reacción de marcación se realizó en criotubo de 5 mL donde se mezcló (100-200) μL de NaOAc 1.14 M con (40-90) μL de DOTA-H2-MG11 (23.8-53.6 nmol), a la cual se le agregó (2.0-4.0) mL de [^{68}Ga]GaCl₃ recientemente eluido del generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ en solución de HCl 0.05 M, con una actividad de (394-922) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en el rango 3.5-4.0 e inmediatamente se incubó durante 7 o 10 min en bloque de calentamiento a 84°C. Al finalizar la marcación se procedió a la purificación del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C18 light (previamente acondicionado con 5 mL de EtOH absoluto y 10 mL de agua bidestilada). Para ello, se pasó la mezcla de reacción por el cartucho, recogiendo el líquido emergente en un vial de 10 mL (descarte). Se enjuagó el vial de reacción con 3 mL de agua bidestilada y se pasó este enjuague por el cartucho, recogiendo el

líquido emergente en el mismo vial de descarte. El producto retenido se eluyó del cartucho al pasar 1 mL de EtOH 50% seguido de 4 mL de suero fisiológico para enjuagar el mismo, de manera de obtener el purificado en un vial de 10 mL con una concentración de etanol del 10% y un pH de 5.0-5.5. Se determinó la pureza radioquímica (PRQ) del crudo de reacción y del purificado, tanto por HPLC con Gradiente 1 como por iTLC-SG con MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1).

Con el fin de aumentar la actividad de las marcaciones se requirió aumentar el volumen de [⁶⁸Ga]GaCl₃, de 2 a 4 mL, lo que dificultó la manipulación en el proceso de purificación. Por ello, para volúmenes de [⁶⁸Ga]GaCl₃ de 3 y 4 mL se utilizó un dispositivo “home made” (Figura 30) elaborado y puesto a punto en el CUDIM para la marcación manual de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE [87].

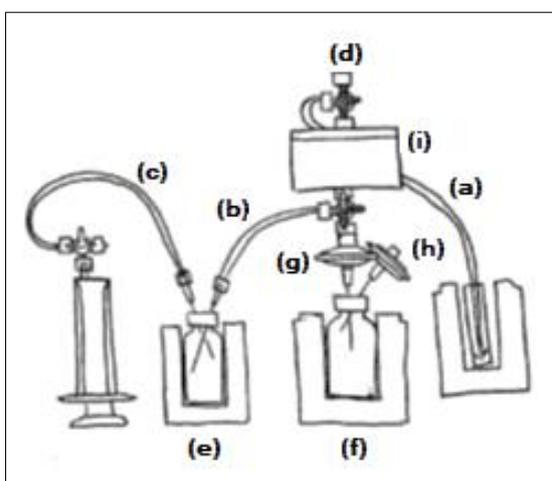


Figura 30. Dispositivo utilizado para la purificación del marcado. Modificado de [87].

Esto permitió una manipulación más segura desde el punto de vista de la radioprotección. Brevemente se describe este proceso de purificación que utiliza 2 válvulas de 3 vías que se posicionan según se necesite. La tubuladura (a) se coloca en el fondo del criotubo que contiene el marcado a purificar para enviar al cartucho en su blindaje ubicado en (i) a través de la válvula de 3 vías (d). El líquido que emerge del cartucho pasa por la segunda válvula de 3 vías hacia la tubuladura (b) que se recoge en el vial de descarte (e), todo esto gracias a la succión realizada por la jeringa conectada a través de la tubuladura (c). Se procede de la misma manera con el enjuague del criotubo. Para la elución del cartucho se mueven las 2 válvulas de 3 vías de manera de enviar el EtOH 50% colocado en jeringa en el puerto libre de la válvula (d) hacia el vial final (f). De la misma manera se procede con el enjuague del cartucho con la

jeringa conteniendo el suero fisiológico. En estos ensayos no se utilizaron los filtros (g) y (h), sólo se colocaron agujas.

6.2.6. Optimización de la marcación de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11

Los siguientes ensayos se realizaron con el objetivo de optimizar distintos parámetros de la marcación de DOTA-H2-MG11 con ⁶⁸Ga. Para comenzar, se redujo el volumen de la mezcla de reacción de manera de simplificar la manipulación y disminuir tanto el consumo de reactivos como la exposición a las radiaciones. Fue así que se redujo de forma proporcional el volumen de cada constituyente utilizado en la marcación inicial.

La evaluación de los efectos producidos en la marcación por los distintos parámetros estudiados, se realizó a través del estudio de la estabilidad de cada marcado. Se analizaron las distintas especies presentes en el crudo de reacción a distintos tiempos post-marcado, manteniendo para ello el microtubo de reacción a T.A. luego de finalizada la incubación. Este análisis se realizó por HPLC e iTLC-SG, desde el final del calentamiento (t = 0) y cada 30 min hasta las 2 h post-marcado.

6.2.6.1. Actividad y temperatura de marcación

La reacción de marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 µL de NaOAc 1.14 M con 15 µL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol), a la cual se le agregó 500 µL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido de generador en solución de HCl 0.05 M, con una actividad de (74-123) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C, 92°C o 100°C.

6.2.6.2. Agregado de antioxidantes

En primer lugar se evaluó el uso del ácido gentísico (AG) como antioxidante en la marcación con ⁶⁸Ga. Para ello se utilizó una solución de NaOAc 0.4 M - ácido gentísico 0.24 M, de pH 4.4 (Buffer ASAG (0.4-0.24)), utilizada en la marcación de DOTA-péptidos con ¹⁷⁷Lu [81]. Esta solución es utilizada con el triple

propósito de: 1) alcanzar el pH adecuado en la reacción de marcación, 2) añadir un ligando estabilizador para mantener al ^{68}Ga en solución (acetato) y 3) añadir un agente antioxidante protector a la mezcla. Fue por ello que primero se determinó en frío el volumen necesario de esta solución para alcanzar un pH \sim 4 al mezclar con 1 mL de HCl utilizado en la elución del generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Para esto, a 1000 μL de HCl 0.05 M se le fue añadiendo paulatinamente porciones del Buffer ASAG (0.4-0.24) y determinando el pH de la mezcla (con pHmetro) luego de cada agregado. Se estableció que fueron necesarios 750 μL para asegurar un pH adecuado, por lo cual se utilizó 375 μL de esta mezcla en la marcación con 500 μL de eluido.

La reacción de marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 375 μL de NaOAc 0.4 M - ácido gentsico 0.24 M, de pH 4.4, con (15-90) μL de DOTA-H2-MG11 (8.9-53.6 nmol), a la cual se le agregó 500 μL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con solución de HCl 0.05 M, con una actividad de (91-142) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C.

Luego se evaluó la influencia del agregado de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, así como el agregado del mismo volumen de agua post-marcado para comparar con los marcados que contienen y no contienen dicho Buffer durante el calentamiento. Para ello se realizaron 3 marcados, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 μL de NaOAc 1.14 M con 15 μL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol), al cual se le agregó 500 μL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de (118-133) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C. Finalizado el calentamiento se agregó 375 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) a uno de los marcados, 375 μL de agua Milli-Q a otro y el tercer marcado permaneció sin agregados.

En segundo lugar se evaluó el uso del aminoácido L-metionina para inhibir la oxidación del residuo de metionina del péptido en su marcación con ^{68}Ga . Se decidió comenzar con el agregado de L-metionina de manera de contener 0.02% (m/v) en la solución de marcado, ya que según [88] se lograron buenos resultados al adicionar metionina a la composición de un polipéptido de manera

de contener de 0.01% (m/v) a 0.3% (m/v). Para ello se realizaron dos marcados similares, la única diferencia fue el momento de agregado de los 375 μ L de L-metionina 0.49 mg/mL (3.3 mM), uno previo al calentamiento y el otro posterior al mismo (post-marcado). Cada marcado se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 μ L de NaOAc 1.14 M con 15 μ L de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol), al cual se le agregó 500 μ L de $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ recientemente eluido con una actividad de (100-112) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C.

Con el propósito de disminuir aún más la oxidación del residuo de metionina del péptido, se aumentó (x4) la cantidad del aminoácido L-metionina a agregar previo al calentamiento, de manera de contener 0.08% (m/v) en la solución de marcado. A la vez, se aumentó la temperatura de marcación con la finalidad de disminuir todo lo posible el ^{68}Ga libre remanente en el marcado. Para ello se realizaron tres marcados, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 μ L de NaOAc 1.14 M con 15 μ L de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol). A los dos primeros se les agregó 375 μ L de L-metionina 2.0 mg/mL (13.4 mM) y al tercero 375 μ L de agua Milli-Q. A los tres microtubos se les adicionó 500 μ L de $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ recientemente eluido con una actividad de (101-139) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento, el primero a 92°C y los dos restantes a 100°C.

En tercer lugar se investigó la adición previa al calentamiento de los dos antioxidantes en simultáneo, la L-metionina y el ácido gentsico (en una menor cantidad optimizada, descripta en página 116). Este último se agregó en una solución de NaOAc 1.14 M - ácido gentsico 0.18 M, de pH 5.0 (Buffer ASAG (1.14-0.18)), con la idea de utilizar 25 μ L en el marcado, sustituyendo los 25 μ L de NaOAc 1.14 M. Primero se determinó en frío el volumen necesario de esta solución para alcanzar un pH \sim 4 al mezclar con 500 μ L de HCl 0.05 M. Se estableció que fueron necesarios 40 μ L para asegurar un pH adecuado de 4.0-4.5 (determinado con cinta y tira), por lo cual se utilizó ese volumen de Buffer en la marcación con 500 μ L de eluido. Se realizaron dos marcados, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 40 μ L de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 15 μ L de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol). A uno se le agregó 375 μ L de L-metionina 13.4 mM y al otro 375 μ L de agua Milli-Q. A ambos se adicionó 500 μ L de

[⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (98-107) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C.

6.2.6.3. Masa de DOTA-H2-MG11

Una vez optimizadas las cantidades de los dos antioxidantes en la marcación, se estudió la variación de masa del precursor para evaluar cómo afectaba a la incorporación del ⁶⁸Ga. Para eso los primeros 6 marcados se realizaron en microtubos de 2 mL donde se mezcló 40 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 375 µL de L-metionina 13.4 mM. A cada uno se le agregó 30 µL de DOTA-H2-MG11 pero de distinta concentración (1 mg/mL a 1/30 mg/mL) de manera de obtener 30, 15, 8, 4, 2 y 1 µg (17.9, 8.9, 4.8, 2.4, 1.2 y 0.6 nmol). Seguidamente se les agregó 500 µL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (82-85) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Luego de finalizar todos los marcados al mismo tiempo, era imposible realizar el análisis de cada uno por HPLC e iTLC-SG a la vez. Fue así que se necesitó frenar la reacción de incorporación del ⁶⁸Ga a la molécula, para que la espera por el análisis no modificara la incorporación obtenida al final del calentamiento (t = 0). Para esto, se tomó una alícuota de 20 µL de cada marcado y se colocó en microtubos conteniendo 100 µL de Ga(NO₃)₃ 50 mM. De esta manera el Galio no radiactivo (^{nat}Ga) que se encuentra en un exceso de 10⁸ respecto al ⁶⁸Ga, se podría incorporar al DOTA-H2-MG11 no coordinado con el ⁶⁸Ga, frenando así una potencial continuación de la marcación con el transcurso del tiempo.

De manera similar se realizó el estudio sin el agregado de antioxidantes. Para eso los siguientes 7 marcados se realizaron en microtubos de 2 mL donde se mezcló 25 µL de NaOAc 1.14 M con 30 µL de DOTA-H2-MG11 pero de distinta concentración (1 mg/mL a 1/60 mg/mL) de manera de obtener 30, 15, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg (17.9, 8.9, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6 y 0.3 nmol). Seguidamente se les agregó 500 µL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido de generador con una actividad de (116-122) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se tomó una

alícuota de 20 μL de cada marcado y se colocó en microtubos conteniendo 100 μL de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 50 mM para su análisis.

Con el fin de evaluar la posibilidad de seguir disminuyendo la masa de precursor en el marcado para obtener una mayor actividad molar (A_m), se decidió sustituir el NaOAc por otro agente estabilizante con mejores rendimientos de incorporación de ^{68}Ga , el HEPES [79, 89]. Se buscó incorporar el HEPES a la reacción de marcación en el menor volumen posible, para lo cual se preparó una solución de este en agua con una concentración de 1.5 M y pH 5.5 (cercana a la mayor concentración posible de 1.68 M, según el dato de solubilidad del fabricante de 40 g/100 mL a 20°C). Luego se determinó en frío el volumen necesario de esta solución para alcanzar un pH ~ 4 al mezclar con 500 μL de HCl 0.05 M. Se estableció que fueron necesarios 150 μL para asegurar un pH adecuado de 4.0 (determinado con cinta), por lo cual se utilizó ese volumen en la marcación con 500 μL de eluido. Para este ensayo los siguientes 7 marcados se realizaron en microtubos de 2 mL donde se mezcló 150 μL de HEPES 1.5 M con 30 μL de DOTA-H2-MG11 pero de distinta concentración (1 mg/mL a 1/60 mg/mL) de manera de obtener 30, 15, 8, 4, 2, 1 y 0.5 μg (17.9, 8.9, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6 y 0.3 nmol). Seguidamente se les agregó 500 μL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de (105-116) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se tomó una alícuota de 20 μL de cada marcado y se colocó en microtubos conteniendo 100 μL de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 50 mM para su análisis.

Asimismo se agregaron los dos antioxidantes a las marcaciones con HEPES para poder realizar una comparación más completa. La idea era agregar el ácido gentísico a la solución de HEPES para lograr una solución similar al Buffer ASAG (1.14-0.18). Para utilizar la misma cantidad de AG contenida en 40 μL del Buffer (7.2×10^{-6} moles), se necesitaba tener una concentración de AG de 0.048 M (en HEPES 1.5 M) para utilizar 150 μL . Con lo cual se preparó una solución de HEPES 1.5 M - ácido gentísico 0.048 M, de pH 5.0 (HEPES-AG (1.5-0.048)), a la que se le determinó un pH adecuado de 4.0 (determinado con cinta y tira) cuando se mezcló 150 μL de la misma con 500 μL de HCl 0.05 M. Por lo cual, para este último ensayo los siguientes 6 marcados se realizaron en

microtubos de 2 mL donde se mezcló 150 μL de solución HEPES-AG (1.5-0.048) con 375 μL de L-metionina 13.4 mM. A cada uno se le agregó 30 μL de DOTA-H2-MG11 pero de distinta concentración (1 mg/mL a 1/30 mg/mL) de manera de obtener 30, 15, 8, 4, 2 y 1 μg (17.9, 8.9, 4.8, 2.4, 1.2 y 0.6 nmol). Seguidamente se les agregó 500 μL de ^{68}Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (72-76) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se tomó una alícuota de 20 μL de cada marcado y se colocó en microtubos conteniendo 100 μL de Ga(NO₃)₃ 50 mM para su análisis.

6.2.6.4. Tiempo de marcación

El siguiente parámetro importante en la optimización de la marcación es el tiempo de incubación a la temperatura elegida de 100°C. Para lo cual se realizaron 5 marcados en microtubos de 2 mL donde se mezcló 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 375 μL de L-metionina 13.4 mM. A cada uno se le agregó 8 μL de DOTA-H2-MG11 (4.8 nmol) y 500 μL de ^{68}Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (74-77) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente cada uno se incubó durante un tiempo distinto (2, 5, 7, 10 o 15 min) en bloque de calentamiento a 100°C. Una vez finalizado cada tiempo, se tomó una alícuota de 20 μL del marcado correspondiente y se colocó en microtubo conteniendo 100 μL de Ga(NO₃)₃ 50 mM para su análisis por HPLC e iTLC-SG. De esta manera se frenó la reacción de incorporación del ⁶⁸Ga a la molécula, para que la espera por el análisis no modificara la incorporación obtenida al final del calentamiento de cada marcado (t = 0). Además se diluyó 6 veces la muestra de manera que se podría considerar que también se “frena” la radiolisis de la molécula marcada.

6.2.6.5. pH de marcación

Otro parámetro muy importante a tener en cuenta en la optimización de la marcación es el pH a la cual se realiza la misma. Este valor se ha fijado en los ensayos anteriores en 4.0-4.5 al utilizar 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 500 μL de HCl 0.05 M. Para ensayar valores de pH por debajo y por encima de ese rango, se decidió agregar a los marcados soluciones de HCl y NaOH

respectivamente. En primer lugar, se determinó la cantidad de moles de HCl necesarios para disminuir el pH de la mezcla compuesta por 20 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) y 250 μL de HCl 0.05 M. Para ello, a esta mezcla se le fue añadiendo paulatinamente porciones de HCl 0.5 M y determinando el pH (con pHmetro) luego de cada agregado. Con la curva obtenida se calcularon los moles de HCl a agregar para obtener valores de pH de 4.0, 3.5 y 3.0. Se estableció que para 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 500 μL de HCl 0.05 M fueron necesarios 3.2 μL , 6.4 μL y 8.7 μL de HCl 2.0 M para asegurar los valores de pH deseados, lo cual se chequeó en la práctica con pHmetro. En segundo lugar se hizo lo mismo con NaOH 0.5 M. Con la curva obtenida se calcularon los moles de NaOH a agregar para obtener valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0. Se estableció que para 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 500 μL de HCl 0.05 M fueron necesarios 2.5 μL , 9.0 μL , 12.9 μL y 14.0 μL de NaOH 2.0 M para asegurar los valores de pH deseados. Todos los valores coincidieron en la práctica excepto el último que dio un pH de 5.7, por lo que se aumentó a 14.5 μL para llegar a un pH de 6.1.

Se realizaron 2 grupos de 4 marcados cada uno, todos en microtubos de 2 mL donde se mezcló 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 375 μL de L-metionina 13.4 mM. Al primer grupo se le agregó distintos volúmenes de HCl 2.0 M (0, 3.2, 6.4 y 8.7 μL), al segundo grupo distintos volúmenes de NaOH 2.0 M (2.5, 9.0, 12.9 y 14.5 μL), completando con agua hasta 14.5 μL según correspondiera. Seguidamente se adicionó 8 μL de DOTA-H2-MG11 (4.8 nmol) y 500 μL de $^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de (83-86) MBq. Se verificó que el pH de cada uno fuera el correcto (con cinta o tira) e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se tomó una alícuota de 20 μL de cada marcado y se colocó en microtubos conteniendo 100 μL de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 50 mM para su análisis por HPLC e iTLC-SG. De esta manera se frenó la reacción de incorporación del ^{68}Ga a la molécula, para que la espera por el análisis no modificara la incorporación obtenida al final del calentamiento de cada marcado ($t = 0$). Además se diluyó 6 veces la muestra de manera que se podría considerar que también se “frena” la radiolisis de la molécula marcada. Una vez decaída la actividad de los 8 marcados, se determinó el pH de la mezcla de reacción con pHmetro.

Por tanto, las condiciones óptimas de marcado se obtuvieron con el agregado de 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) (NaOAc 1.14 M - ácido gentísico 0.18 M, pH 5.0), 375 μL de L-metionina 13.4 mM, 8 μL de DOTA-H2-MG11 (4.8 nmol) y 500 μL de ^{68}Ga] GaCl_3 recientemente eluido con HCl 0.05 M (actividad: 74-86 MBq), que luego de verificado un pH de 4.0-4.5 fuera incubado durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C.

6.2.7. Optimización de la purificación de ^{68}Ga] Ga -DOTA-H2-MG11

Los siguientes ensayos se realizaron con el objetivo de optimizar distintos parámetros de la purificación por extracción en fase sólida del ^{68}Ga] Ga -DOTA-H2-MG11 obtenido. No se utilizó ácido gentísico en las marcaciones para poder ver mejor la purificación de las impurezas peptídicas.

La reacción de marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 μL de NaOAc 1.14 M con 375 μL de L-metionina 13.4 mM. A este se le agregó 15 μL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y 500 μL de ^{68}Ga] GaCl_3 recientemente eluido con una actividad de (36-72) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C.

Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C18 light o C8 light (previamente acondicionados con 5 mL de EtOH absoluto y 10 mL de agua Milli-Q). Para ello, se tomó la mezcla de reacción con jeringa de 1 mL (jeringa M) y se pasó por el cartucho, recogiendo el líquido emergente en un vial de 10 mL (descarte). Se enjuagó el microtubo de reacción con 1 mL de agua Milli-Q, se tomó con la jeringa M y se pasó este enjuague por el cartucho, recogiendo el líquido emergente en el mismo vial de descarte. El producto retenido se eluyó del cartucho al pasar 1 mL de EtOH 50% (C18 light) o 1 mL de EtOH 30% (C8 light). Previo a la elución, se intentó arrastrar impurezas peptídicas más hidrofílicas que el producto realizando un lavado con EtOH más diluido, con 1 mL de EtOH (20, 25 o 30%) para Sep-Pak C18 light, o con 1 mL de EtOH (6, 7, 8, 9 o 10%) para Sep-Pak C8 light. Los lavados y las eluciones se recogieron

por separado en viales de 10 mL, conteniendo volúmenes variables de L-metionina 134 mM (42-200 μ L) y agua Milli-Q (0-3800 μ L). De esta manera se diluyó el lavado (o el eluido) para contener una concentración final de EtOH \leq 12% (y así evitar el desdoblamiento de picos en el HPLC vistos a concentraciones de EtOH $>$ 25%), y también conseguir una concentración final de L-metionina de 5.4 mM (similar a la que tenía en la reacción de marcación) y así impedir la oxidación posterior a la purificación, ya que la L-metionina del crudo de reacción no es retenida por el cartucho. Se midió la actividad del microtubo de reacción antes de la purificación, y la actividad posterior a la purificación de los viales de descarte, lavado y elución, así como la actividad remanente en el microtubo, jeringa M y cartucho. Se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG del crudo de reacción, del descarte, del lavado y de la elución (producto purificado).

6.2.8. Preparación de impurezas marcadas con ^{68}Ga

La gran cantidad de impurezas radiactivas obtenidas en la marcación de DOTA-H2-MG11 con ^{68}Ga , hizo necesario intentar reproducir alguna de ellas para dilucidar su presencia o evaluar su comportamiento biológico.

6.2.8.1. Marcación de [^{68}Ga]Ga-DOTA

Se manejó la posibilidad de que el anillo DOTA se pudiera desacoplar del péptido H2-MG11 por radiolisis, de manera que se efectuó la marcación de este quelante con ^{68}Ga para su identificación en el sistema cromatográfico.

El DOTA.6H₂O se disolvió en agua Milli-Q de manera de tener una solución de concentración 1 mg/mL (1.95 mM). Esta se fraccionó en volúmenes de 100 μ L en microtubos de 0.5 mL para almacenar en freezer a -20°C. Cada fracción fue descongelada inmediatamente antes de ser utilizada.

La reacción de marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 μ L de NaOAc 1.14 M con (5 o 50) μ L de DOTA 1.95 mM (9.8 o 98 nmol), a la cual se le agregó 500 μ L de [^{68}Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (50-129) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 92°C o 100°C. Se

realizó el análisis del crudo de reacción por HPLC (Gradiente 1 e Isocrático) y por iTLC-SG (MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) y TFA 6%).

6.2.8.2. Oxidación de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11

La ineludible oxidación del residuo de metionina de la molécula DOTA-H2-MG11 producida durante la marcación con ⁶⁸Ga (GMGox), hizo que esta impureza estuviera presente, en mayor o menor medida, en todos los marcados. Por lo cual, se tornó necesaria su obtención para poder estudiar luego su comportamiento biológico.

En primer lugar se realizó la oxidación intencional (con solución de H₂O₂) del péptido DOTA-H2-MG11 ya marcado con ⁶⁸Ga (modificado de [64]). Para ello, se realizaron tres marcados, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 µL de NaOAc 1.14 M con 15 µL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol), además los últimos dos tuvieron un agregado de 375 µL de L-metionina 13.4 mM. A los tres microtubos se les adicionó 500 µL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (90-131) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron durante 10 min en bloque de calentamiento, los dos primeros a 92°C y el restante a 100°C. De cada marcado se tomó una alícuota de 20 µL para su análisis por HPLC e iTLC-SG, y al volumen remanente en el microtubo de reacción se le adicionó H₂O₂ 30 vol., de manera de agregar 10 µL de oxidante por cada 100 µL de marcado. Los tres microtubos se volvieron a incubar durante 10 min en bloque de calentamiento, los dos primeros a 92°C y el restante a 100°C. Se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG de los tres oxidados.

En segundo lugar se intentó realizar la oxidación intencional directamente durante la marcación del péptido con ⁶⁸Ga, de manera de simplificar la manipulación, ganar tiempo y actividad, además de evitar un segundo calentamiento de la molécula. La reacción de marcación y oxidación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 25 µL de NaOAc 1.14 M con 375 µL de L-metionina 13.4 mM. A este se le agregó 15 µL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y 500 µL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de 130 MBq. Por último se agregó 91.5 µL de H₂O₂ 30 vol., se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de

calentamiento a 100°C. Se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG del crudo de reacción.

Se hizo necesaria la purificación del GMGox obtenido, lo que se realizó por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light. Esto requirió seleccionar la concentración de EtOH diluido a utilizar en el lavado previo a la elución con EtOH 30%. Se realizaron dos marcados con oxidación, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 150 µL de HEPES 1.5 M con 375 µL de L-metionina 13.4 mM y 4 µL de DOTA-H2-MG11 (2.4 nmol). Seguidamente se agregó 500 µL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de (108-114) MBq. Por último se añadió 103 µL de H_2O_2 30 vol., se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Al finalizar la reacción de marcación-oxidación se realizó la purificación manual del crudo a través del cartucho Sep-Pak C8 light. Para ello se procedió según se detalla en la sección 6.2.7., pero con los siguientes cambios, se enjuagó el microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico (en lugar de agua Milli-Q) y se realizó un lavado del cartucho con 1 mL de EtOH (3.0 o 3.5%) previo a la elución con EtOH 30%. Dicha elución se recogió en vial de 10 mL, conteniendo 120 µL de L-metionina 134 mM y 1880 µL de agua Milli-Q, para conseguir una concentración final de L-metionina de 5.4 mM.

Por último se realizó la marcación-oxidación con distinto agente estabilizante (NaOAc o HEPES), y en presencia de los dos antioxidantes en las cantidades previamente optimizadas en la marcación. Se realizaron dos marcados con oxidación, cada uno en microtubo de 2 mL, en uno se agregó 40 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) y en el otro 150 µL de solución HEPES-AG (1.5-0.048). En ambos se añadió 375 µL de L-metionina 13.4 mM y 6 µL de DOTA-H2-MG11 (3.6 nmol). Seguidamente se adicionó 500 µL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de 84 MBq. Por último se agregó 90 µL de H_2O_2 30 vol., se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se analizaron ambos crudos de reacción por HPLC e iTLC-SG, y el que presentó mayor proporción de GMGox se purificó por cartucho Sep-Pak C8 light, de la manera descrita en el párrafo anterior, utilizando 1 mL de EtOH 3.5% para el lavado del cartucho.

6.2.9. Estudios biológicos primarios

Se realizó una evaluación biológica inicial del [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11 para tener conocimiento de su interacción con el receptor CCK2 *in vitro* en células, así como de su comportamiento *in vivo* en animales de experimentación.

6.2.9.1. Ensayos *in vitro*

Se escogió la línea celular de tumor pancreático de rata AR42J, porque expresa endógenamente el receptor CCK2 [90]. Esta fue adquirida en el American Type Culture Collection Cell (identificada como ATCC® CRL-1492™) para ser utilizada en todos los ensayos de unión e internalización celular. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) y solución antibiótica/antimicótica, bajo atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ a 37°C.

Los ensayos de unión e internalización se realizaron en base al método reportado por Paulmichl *et al.* [91]. Se utilizaron las células en estado de confluencia, cultivadas en placas de 6 pozos al menos 2 días antes del ensayo (~ 3 x 10⁵ células / pozo). El día del ensayo, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células 2 veces con buffer fosfato salino frío (PBS 0.01 M, 1 mL / pozo) y se agregó DMEM conteniendo 1% de SFB (1.2 mL / pozo). A la mitad de los pozos se le añadió buffer de ensayo (captación total), compuesto por solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 0.5 % en PBS 0.01 M (150 µL / pozo). A la otra mitad se le añadió un agente bloqueante (captación no específica), compuesto por una solución de Minigastrina I (humana) en PBS 0.01 M con un exceso molar de unas 3000 veces de este péptido no marcado respecto al precursor utilizado en el marcado (150 µL / pozo). A continuación, a todos los pozos se les añadió la solución de marcado diluida en buffer de ensayo (~ 0.5 MBq en 150 µL / pozo), y de inmediato las placas se incubaron a 37°C durante 1.5 h, tiempo seleccionado según [91]. La incubación fue interrumpida por remoción del medio de incubación y posterior lavado con PBS 0.01 M frío (2 lavados con 1 mL), de manera de eliminar el radiotrazador que no se unió a las células. Luego se agregó 1 mL de buffer glicina frío (glicina 0.05 M / NaCl 0.1 M, pH 2.8), para liberar el radiotrazador unido a la membrana celular.

Después de 5 min, se recolectó el sobrenadante en tubos plásticos. Se repitió el procedimiento una vez y se realizó un enjuague con 1 mL de buffer de ensayo, el sobrenadante se unió a los tubos anteriores (fracción unida a la membrana, 3 mL). Luego, las células se lisaron con NaOH 0.1 M (3 lavados de 1 mL) para liberarlas de las placas, y los sobrenadantes se fueron recolectando en tubos plásticos (fracción internalizada, 3 mL). Finalmente, se midió la actividad de ambas fracciones (por cada pozo) en un contador de centelleo sólido y se corrigieron dichos datos teniendo en cuenta el decaimiento del ^{68}Ga durante el ensayo. Para tener como referencia la actividad total agregada en los pozos, se prepararon 3 tubos con 150 μL de la solución de marcado diluida en buffer de ensayo, estos se llevaron a un volumen final de 3 mL con agua (tubos TOTALES), de modo de conservar la geometría de la muestra al medir en el contador de centelleo sólido.

Los resultados se expresaron como: promedio \pm desviación estándar. Se utilizó la distribución de Student (test de dos colas) para comparar la actividad unida a membrana e internalizada, en los pozos bloqueados y no bloqueados, con un nivel de confianza del 95%. La captación específica (unida a membrana o internalizada) se calculó mediante la resta de la captación no específica (pozos bloqueados) a la captación total (pozos no bloqueados). Luego tanto la captación específica (E) como la captación no específica (NE) fueron expresadas como porcentaje de la actividad total agregada (tubos TOTALES), tanto para unión a membrana como para internalización.

Estos ensayos de unión e internalización se realizaron con 2 moléculas marcadas, la molécula de interés GMG y la principal impureza obtenida por oxidación GMGox.

La marcación de GMG se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 150 μL de HEPES 1.5 M con 375 μL de L-metionina 13.4 mM. A este se le agregó 4 μL de DOTA-H2-MG11 (2.4 nmol) y 500 μL de ^{68}Ga recientemente eluido con una actividad de (89-114) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak

C8 light, según se detalla en la sección 6.2.7. La mezcla de reacción se pasó por el cartucho, seguido del enjuague del microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico y del lavado del cartucho con 1 mL de EtOH 7%. El producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de EtOH 30% que se recogió en un vial de 10 mL conteniendo 120 µL de L-metionina 134 mM y 1880 µL de agua Milli-Q. Se realizaron 3 marcaciones independientes y cada una se incubó en 2 placas de 6 pozos, es decir, cada uno de los 3 ensayos de GMG con células se repitió 6 veces (sextuplicado).

En tanto, la marcación-oxidación de GMGox se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 40 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 375 µL de L-metionina 13.4 mM. A este se le agregó 6 µL de DOTA-H2-MG11 (3.6 nmol) y 500 µL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de 143 MBq. Por último se agregó 90 µL de H₂O₂ 30 vol., se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light, según se detalla en la sección 6.2.8.2. La mezcla de reacción se pasó por el cartucho, seguido del enjuague del microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico y del lavado del cartucho con 1 mL de EtOH 3.5%. El producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de EtOH 30% que se recogió en un vial de 10 mL conteniendo 120 µL de L-metionina 134 mM y 1880 µL de agua Milli-Q. Se realizó una única marcación que se incubó en 3 placas de 6 pozos, es decir, un solo ensayo de GMGox con células que se repitió 9 veces.

6.2.9.2. Ensayos *in vivo*

Los protocolos de experimentación animal se realizaron de acuerdo con pautas institucionales, nacionales e internacionales para el uso de animales de investigación, bajo las regulaciones éticas de la Ley nacional de experimentación animal N° 18.611. A su vez, dichos protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética del CUDIM (N° 13011601).

Se utilizaron ratones machos Swiss (cepa base) y Nude N: NIH (S) - Foxn 1^{nu} (inmunodeprimidos), provenientes del bioterio del CUDIM con una edad de 8-12 semanas. Los animales fueron mantenidos en racks con aire filtrado, bajo

condiciones controladas de humedad (40-60)% y temperatura (24 ± 1)°C, siendo sometidos a ciclos de luz / oscuridad de 14 / 10 horas en el bioterio del CUDIM, con comida y agua *ad libitum*.

La evaluación de la interacción del [^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11 con el receptor CCK2 *in vivo* se realizó en ratones inmunodeprimidos portadores de tumores xenogénicos. Estos tumores fueron generados por implantación subcutánea de células tumorales AR42J en un sitio específico del animal, y posterior espera de su crecimiento con el tiempo. La línea celular AR42J, se cultivó y mantuvo según lo descrito la sección 6.2.9.1, hasta 80% de confluencia bajo atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO_2 a 37°C. La inoculación vía subcutánea de 2.5×10^6 células se realizó en la zona del músculo deltoides izquierdo de ratones Nude. El crecimiento de los tumores fue constatado con los días, y la medida de los mismos se realizó en dos dimensiones empleando un calibre. Los volúmenes tumorales se calcularon asumiendo una geometría elíptica como: $\text{Volumen} = (\text{diámetro menor})^2 \times (\text{diámetro mayor}) \times (\pi/6)$.

En primer lugar, con el fin de determinar el tiempo óptimo de adquisición de imágenes PET/CT se hizo un ensayo preliminar con 4 ratones Nude con tumor xenogénico. Luego, estos resultados permitieron planificar el resto de los ensayos *in vivo* con un número mayor de animales. Todos los estudios de imagenología molecular se realizaron en una cámara trimodal PET/SPECT/CT para pequeños animales (Triumph™, TriFoil Imaging, Inc.). El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Suiza). Fue así que luego de transcurridos 17-21 días de la inoculación subcutánea de las células tumorales, los animales (de 11-12 semanas y 21-24 g) se anestesiaron con isoflurano al 2% en flujo de oxígeno (2 L/min) y fueron inyectados con el radiotrazador bajo cámara por vía intravenosa (2.1-14.3) MBq, en la vena dorsal de la cola. Las imágenes fueron adquiridas en un tiempo total de 2 h, desde la inyección hasta 1 h p.i. (en 1 frame) y desde 1 h a 2 h p.i. (en 1 frame). Los estudios PET fueron co-registrados con el correspondiente CT para asegurar la localización anatómica. Se construyeron Volúmenes de Interés (VOIs) de forma manual sobre las imágenes del tumor (T) y músculo contralateral (NT), con el fin de obtener la concentración de actividad dentro de cada VOI (kBq/cc) y calcular la

relación T/NT. Los resultados se expresaron como: promedio \pm desviación estándar. Se utilizó la distribución de Student (test de dos colas) para comparar los valores de T/NT, con un nivel de confianza del 95%. El radiotrazador GMG se obtuvo según el método de marcación inicial con purificación por Sep-Pak C18 light (sección 6.2.5.). En criotubo de 5 mL se mezcló 150 μ L de NaOAc 1.14 M con 90 μ L de DOTA-H2-MG11 (53.6 nmol) y 3.0 mL de [68 Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (557-704) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 3.5-4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C.

En segundo lugar, se llevaron a cabo estudios de distribución biológica del radiotrazador GMG, tanto en ratones sanos (Swiss) como en ratones Nude con tumor xenográfico. Estos se realizaron a distintos tiempos post-inyección del radiotrazador, teniendo en cuenta el tiempo óptimo de adquisición de imágenes PET/CT determinado en el primer ensayo. Se estipularon 3 tiempos de biodistribución (BD): 0.5, 1.0 y 2.5 h p.i., tanto para los 15 ratones Swiss (12 semanas de edad y peso de 28 ± 2 g, n = 5 para cada tiempo) como para los 15 ratones Nude con tumor xenográfico generado luego de transcurridos 20-22 días de la inoculación subcutánea de las células AR42J (12 semanas de edad y peso de 23 ± 1 g, n = 5 para cada tiempo). El grupo de animales portador de tumor con tiempo de biodistribución de 2.5 h (n = 5), fue utilizado para realizar imágenes bajo cámara PET/CT antes de finalizar la BD (Figura 31).

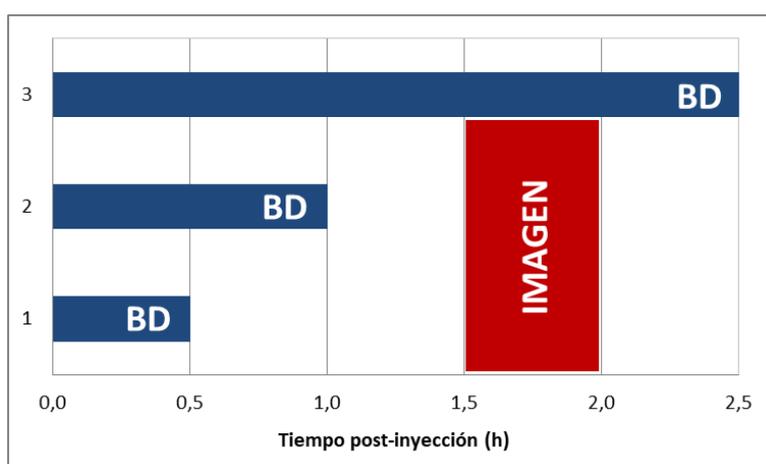


Figura 31. Esquema de tiempo de biodistribución (BD) en ratones sanos y con tumor, y tiempo de imagen para ratones con tumor con BD de 2.5 h.

Se realizó una adquisición de 30 min desde 1.5 a 2.0 h p.i. (en 1 frame) durante la cual el animal permaneció anestesiado con isoflurano al 2% en flujo de

oxígeno. Para comenzar este ensayo, todos los animales fueron inyectados con el radiotrazador por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola, con un nivel de actividad adecuado para lograr una buena estadística de medida de actividad luego del sacrificio (1.5-9.2 MBq). Luego los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en el tiempo post-inyección correspondiente y de inmediato fueron pesados. Se extrajeron diferentes órganos (hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, tiroides, estómago, vesícula biliar, tracto intestinal, páncreas, vejiga + orina total), así como muestras de sangre, músculo y hueso. En el caso de los ratones Nude, el tumor también fue extirpado. Cada órgano y tejido fue pesado y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. Lo mismo se realizó con la cola y la carcasa del animal (con los restos de órganos, tejidos y fluidos) para poder determinar la actividad total presente en el mismo. Las actividades obtenidas, corregidas por geometría y decaimiento, se expresaron como porcentaje de la actividad total presente para cada órgano o tejido (% DI), o como porcentaje de la actividad total presente para cada gramo de órgano o tejido (% DI/g). Los resultados se expresaron como: promedio \pm desviación estándar. Se utilizó la distribución de Student (test de dos colas) para comparar los valores del tumor (T) respecto a los valores del músculo (NT), con un nivel de confianza del 95%. El radiotrazador GMG se obtuvo según el método de marcación inicial con purificación por Sep-Pak C18 light (sección 6.2.5.). En criotubo de 5 mL se mezcló 200 μ L de NaOAc 1.14 M con 90 μ L de DOTA-H2-MG11 (53.6 nmol) y 4.0 mL de [68 Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (683-922) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 3.5-4.0 e inmediatamente se incubó durante 10 min en bloque de calentamiento a 84°C.

Por último, luego de mejorar tanto la PRQ como la estabilidad del radiotrazador GMG, y lograr obtener la principal impureza GMGox con una PRQ cercana al 90%, se efectuó un estudio suplementario con 4 ratones Nude portadores de tumor xenográfico. Luego de transcurridos 20-23 días de la inoculación subcutánea de las células AR42J, los 4 ratones (de 12-14 semanas de edad y peso de 31 \pm 4 g) fueron separados en dos grupos, uno fue inyectado con GMG y el otro con GMGox de manera de obtener imágenes bajo cámara PET/CT de ambos grupos con radiotrazadores distintos. Se realizó una adquisición de 30 min desde 1.5 a 2.0 h p.i. (en 1 frame) durante la cual el animal permaneció anestesiado con isofluorano al 2% en flujo de oxígeno. A los 2-3 días se repitió

el estudio invirtiendo los grupos de manera de obtener finalmente imágenes PET/CT de los dos radiotrazadores en cada ratón. Al finalizar las últimas imágenes se realizó la biodistribución (tal como se describió en el estudio anterior) a las 2.5 h p.i. de los 4 ratones, 2 de ellos inyectados con GMG y los otros 2 con GMGox. Para comenzar este ensayo, todos los animales fueron inyectados con los radiotrazadores por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola, con un nivel de actividad adecuado para lograr una buena estadística de medida de actividad luego del sacrificio (5.2-12.5 MBq). Los resultados se expresaron como: promedio \pm desviación estándar. Se utilizó la distribución de Student (test de dos colas) para comparar los valores de T/NT obtenidos de los VOIs construidos en las imágenes, con un nivel de confianza del 95%.

La obtención del radiotrazador GMG con una actividad adecuada para este ensayo requirió aumentar el volumen de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ en el mercado de 500 μL a 4000 μL , lo que implicaba un volumen de reacción de 7.4 mL al sumarle las soluciones de buffer, antioxidantes y precursor. Como no se contaba con tubos adecuados para la marcación con tales volúmenes, se decidió utilizar una solución de L-metionina 10 veces más concentrada y realizar 4 marcados simultáneos en microtubos de 2 mL, de manera de concentrar la actividad al purificarlos a través del mismo Sep-Pak. Por tanto, en cada microtubo se mezcló 80 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 75 μL de L-metionina 134 mM. A cada uno se le agregó 12 μL de DOTA-H2-MG11 (7.2 nmol) y 1000 μL de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ recientemente eluido con una actividad de (113-140) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron los 4 microtubos durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light, según se detalla en la sección 6.2.7. La mezcla de reacción de los 4 microtubos se tomó con jeringa de 5 mL y se pasó por el cartucho, seguido del enjuague de cada microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico y del lavado del cartucho con 1 mL de EtOH 7%. El producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de EtOH 30% que se recogió en un vial de 10 mL conteniendo 120 μL de L-metionina 134 mM y 2000 μL de suero fisiológico. Se realizaron 2 marcaciones independientes y de cada una se inyectaron 2 ratones.

En tanto, la marcación-oxidación de GMGox también se realizó a través de 4 marcaciones simultáneas. En cada microtubo de 2 mL se mezcló 80 μ L de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 75 μ L de L-metionina 134 mM. A cada uno se le agregó 12 μ L de DOTA-H2-MG11 (7.2 nmol) y 1000 μ L de [^{68}Ga]GaCl₃ recientemente eluido con una actividad de (133-138) MBq. Por último se les añadió 100 μ L de H₂O₂ 30 vol., se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron los 4 microtubos durante 10 min en bloque de calentamiento a 100°C. Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light, según se detalla en la sección 6.2.8.2. La mezcla de reacción de los 4 microtubos se tomó con jeringa de 5 mL y se pasó por el cartucho, seguido del enjuague de cada microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico y del lavado del cartucho con 1 mL de EtOH 3.5%. El producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de EtOH 30% que se recogió en un vial de 10 mL conteniendo 120 μ L de L-metionina 134 mM y 2000 μ L de suero fisiológico. Se realizaron 2 marcaciones independientes y de cada una se inyectaron 2 ratones.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Métodos analíticos

6.3.1.1. Análisis por HPLC (determinación del % relativo de las especies no coloidales)

En un marcado típico con Galio-68 se observaron por lo menos 3 picos en el HPLC (Figura 32). El primer pico se asignó al ^{68}Ga no incorporado a la molécula (^{68}Ga libre), ya que coincidió con el t_R del eluido del generador ($[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$). El segundo, se asignó a un producto secundario de la reacción, correspondiente a la oxidación de la molécula de interés [81] denominado $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOXA-H2-MG11ox}$ (GMGox), impureza que se detalla más adelante. Mientras que el tercer pico, mayoritario, se asignó a la molécula de interés $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOXA-H2-MG11}$ (GMG), por coincidir con el t_R de la molécula sin marcar (DOXA-H2-MG11) detectada al UV (lo que se describe más adelante).

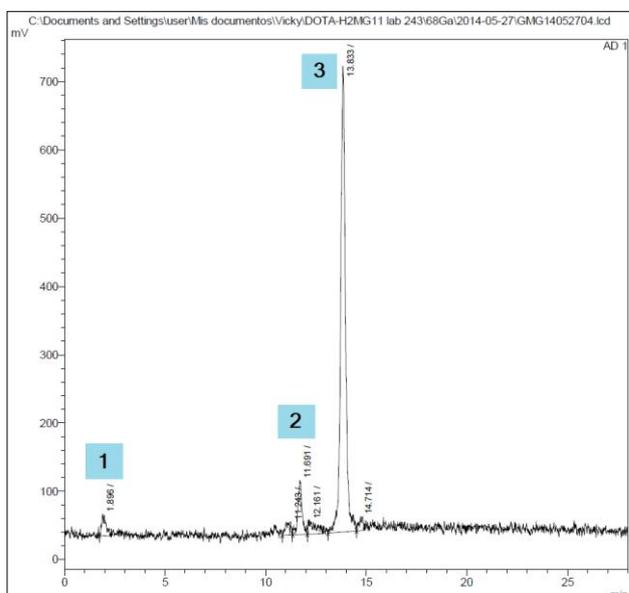


Figura 32. Cromatograma típico obtenido por HPLC (detección γ) utilizando el Gradiente 1.

Con el avance de los distintos estudios (descritos en los siguientes puntos), se hicieron más evidentes otros picos en el HPLC, más específicamente en torno a los picos 2 y 3, por lo que se vio necesario optimizar el sistema para separar mejor ambas especies, y en consecuencia las de su entorno, como también disminuir el tiempo de corrida. El análisis se inició con el sistema de elución “Gradiente 0” (según [81]), obteniendo una separación de 2 min entre los dos

picos con un tiempo de corrida de 33 min, hasta llegar al sistema optimizado “Gradiente 3” con el que se consiguió una separación de 4 min en un tiempo de corrida de 25 min (Tabla 11 y Figura 28).

Tabla 11. Tiempos de retención obtenidos para las 3 especies principales en los distintos sistemas de elución ensayados por HPLC.

Especie	t_R prom \pm DS (min) (n)				
	Gradiente 0	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Isocrático
^{68}Ga libre	1.8 ± 0.1 (5)	1.9 ± 0.1 (201)	1.5 ± 0.1 (3)	1.5 ± 0.0 (95)	1.5 ± 0.0 (69)
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-H2-MG11ox}$	12.6 ± 0.1 (5)	11.8 ± 0.2 (243)	9.2 ± 0.1 (3)	9.1 ± 0.2 (102)	3.8 ± 0.1 (87)
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-H2-MG11}$	14.7 ± 0.1 (5)	13.9 ± 0.2 (239)	13.1 ± 0.1 (3)	13.0 ± 0.1 (81)	9.0 ± 0.2 (67)

prom= promedio, DS= desvío estándar, n= N° de determinaciones.

Durante el estudio con el “Gradiente 1”, se decidió realizar pruebas con el sistema de elución Isocrático (según [37]). Este último presentaba las ventajas de tener tanto un tiempo de corrida menor (18 min) como una mejor separación entre los dos picos de interés (5 min), pero este sistema ocasionó el ensanchamiento de varios picos (comparado con los de “Gradiente 1”), desmejorando así la separación y posible identificación de otras especies (Figura 33).

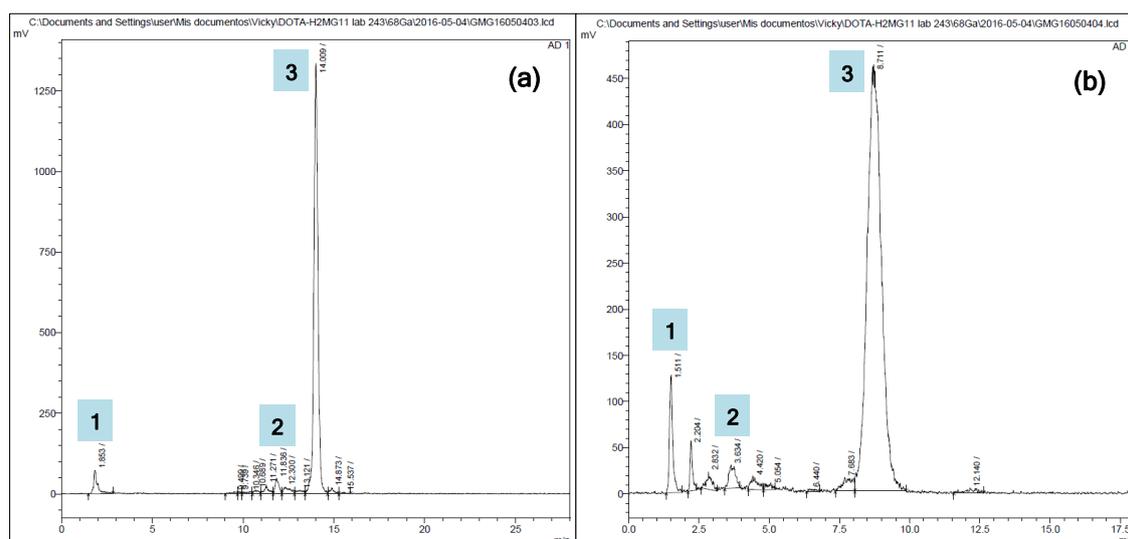


Figura 33. Cromatogramas obtenidos por HPLC (detección γ) del mismo crudo de reacción utilizando los sistemas de elución (a) Gradiente 1 y (b) Isocrático.

Fue por ello que se decidió continuar con la modificación del sistema por gradiente y se consiguió llegar hasta el sistema “Gradiente 3”, donde se obtuvo una mejor separación de las 14 especies detectadas (Figura 34).

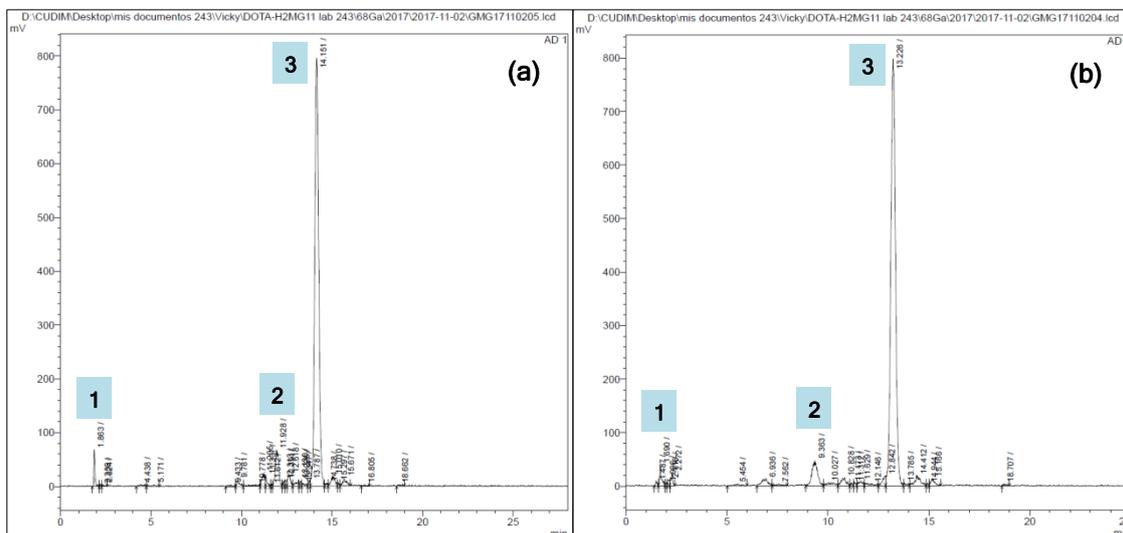


Figura 34. Cromatogramas obtenidos por HPLC (detección γ) del mismo crudo de reacción utilizando los sistemas de elución (a) Gradiente 1 y (b) Gradiente 3.

6.3.1.2. Análisis por TLC (determinación del % real de coloide)

La cromatografía en iTLC-SG se empleó para poder determinar la cantidad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide presente en el marcado, ya que esta especie permanece en el origen del cromatograma (punto de siembra) con las distintas fases móviles ensayadas. El análisis se inició con la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) (según [82] para $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TOC), donde tanto el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide como el ^{68}Ga libre permanecen en el origen, en tanto la molécula marcada y sus impurezas peptídicas migran en conjunto (Figura 35).

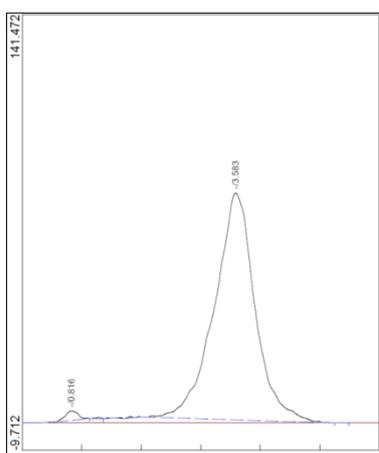


Figura 35. Cromatograma obtenido por iTLC-SG de un marcado típico de DOTA-H2-MG11 con ^{68}Ga utilizando la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1), donde se observan especies en el origen con $t_R = 0.8$ ($R_f = 0$) y especies que migran con $t_R = 3.6$ ($R_f = 0.8$).

Se ensayaron otras combinaciones de MeOH y NH₄OAc 1 M con la idea de separar el ⁶⁸Ga libre del [⁶⁸Ga]Ga-coloide en la misma cromatografía por iTLC-SG, pero no se obtuvieron buenos resultados (Tabla 12). La relación 2:1 no varió respecto a la relación 1:1, y cuando se utilizó únicamente MeOH o únicamente NH₄OAc 1 M no se logró separar ninguna especie, permaneciendo todas cerca del origen.

Tabla 12. R_f obtenidos para las 4 especies principales ensayadas en iTLC-SG con fases móviles conteniendo distintas combinaciones de MeOH:NH₄OAc 1 M.

Especie	R _f prom ± DS (n)			
	1:1	2:1	1:0	0:1
[⁶⁸ Ga]Ga-coloide	0.0 ± 0.0 (181)	0.0 (1)	0.0 (1)	0.1 (1)
⁶⁸ Ga libre	0.0 ± 0.0 (181)	0.0 (1)	0.0 (1)	0.1 (1)
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-H2-MG11ox	0.7 ± 0.1 (181)	0.7 (1)	0.0 (1)	0.1 (1)
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-H2-MG11	0.7 ± 0.1 (181)	0.7 (1)	0.0 (1)	0.1 (1)

prom= promedio, DS= desvío estándar, n= N° de determinaciones.

La fase móvil correspondiente al sistema de elución isocrático utilizado para el HPLC (0.1% de TFA en agua:0.1% de TFA en acetonitrilo (75:25)) tampoco logró separar ninguna especie, obteniendo para todas un R_f = 0.1.

Se ensayó la fase móvil NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) utilizada en [83] para [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11, donde tanto el [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide como el ¹⁷⁷Lu libre permanecen en el origen y el resto de las especies migran juntas. Por lo que se esperaba un comportamiento similar para el marcado de la molécula con ⁶⁸Ga, pero se obtuvo un cromatograma con mucho arrastre, incongruente con el obtenido con la fase móvil de referencia MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) (Figura 36).

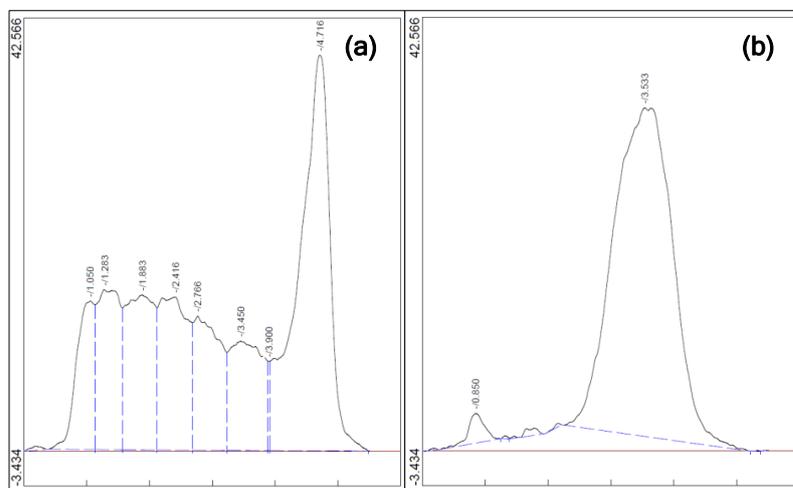


Figura 36. Cromatogramas obtenidos por iTLC-SG del mismo crudo de reacción utilizando las fases móviles (a) NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) y (b) MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1).

Por último se ensayó TFA en agua en concentraciones de 1% a 5% (según [84]), en donde se logró mover del origen y en conjunto a las especies GMG y GMGox. Esto ocurrió a medida que se fue acrecentando la concentración de TFA, aumentando lentamente el R_f de estas especies desde $R_f = 0.1$ (TFA 1%) a $R_f = 0.5$ (TFA 5%) (Figura 37). De acuerdo a lo reportado en [84], se esperaba un $R_f \sim 1$ para el ^{68}Ga libre, lo que se verificó al realizar una cromatografía del eluido del generador (^{68}Ga]GaCl₃) en TFA al 5%.

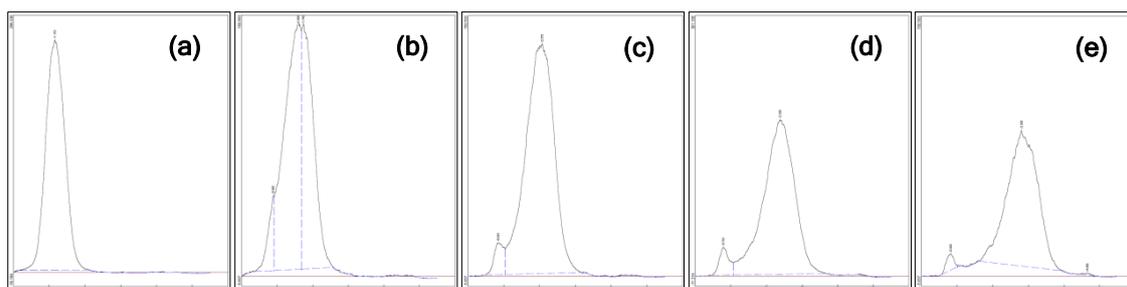


Figura 37. Cromatogramas obtenidos por iTLC-SG del mismo crudo de reacción utilizando como fase móvil TFA en agua a distintas concentraciones: (a) 1%, (b) 2%, (c) 3%, (d) 4% y (e) 5%.

Por tanto, la fase móvil TFA 5% logró separar en un solo cromatograma a las tres especies principales, el ^{68}Ga libre ($R_f = 1$), la molécula marcada (junto con su impureza oxidada) ($R_f = 0.5$) y el ^{68}Ga]Ga-coloide ($R_f = 0$). En vista de que el pico de la molécula marcada también se fue ensanchando con el aumento de TFA, se vio necesario mejorar la separación entre el ^{68}Ga]Ga-coloide (origen) y la molécula marcada, por lo que se aumentó la concentración de TFA a 6%. Esto provocó un aumento adecuado del R_f de la molécula marcada, mejorando la separación de los tres picos (Tabla 13 y Figura 38(a)).

Tabla 13. R_f obtenidos para las 4 especies principales con fases móviles conteniendo TFA (5% y 6% en agua) ensayadas por iTLC-SG.

Especie	R_f prom \pm DS (n)	
	5%	6%
^{68}Ga]Ga-coloide	0.0 \pm 0.0 (5)	0.0 \pm 0.0 (113)
^{68}Ga libre	1.0 \pm 0.0 (5)	1.0 \pm 0.0 (225)
^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11ox	0.5 \pm 0.0 (5)	0.6 \pm 0.1 (217)
^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11	0.5 \pm 0.0 (5)	0.6 \pm 0.1 (217)

prom= promedio, DS= desvío estándar, n= N° de determinaciones.

Es así que para continuar con el análisis por TLC se seleccionó el TFA 6%, de manera de determinar directamente el [⁶⁸Ga]Ga-coloide (única especie retenida en el origen), en sustitución de la fase móvil de referencia MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1), que también retiene al ⁶⁸Ga libre en el origen (Figura 38).

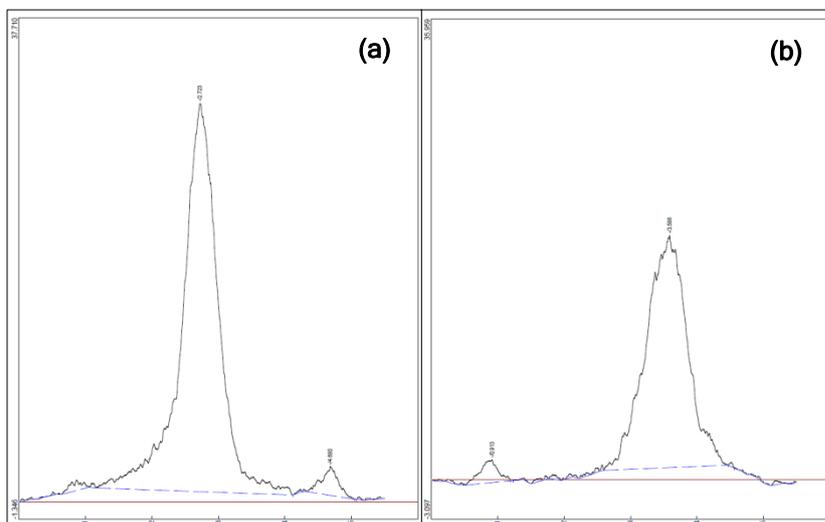


Figura 38. Cromatogramas obtenidos por iTLC-SG del mismo crudo de reacción utilizando las fases móviles **(a)** TFA 6% y **(b)** MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1).

6.3.1.3. Análisis global (determinación del % real de cada especie)

Debido a que no se dispone de un único método analítico que permita cuantificar todas las especies presentes en el marcado, se necesitó combinar los dos métodos analíticos utilizados, TLC y HPLC, para lograrlo. Fue así que se idearon cálculos matemáticos a fin de determinar el % real de cada especie.

Primeramente se estableció una relación entre los métodos, haciendo corresponder la sumatoria de picos por HPLC (100%) a la sumatoria de picos por TLC menos el % de coloide (100 - C)%, ya que el coloide queda retenido en la columna del HPLC.

$$\begin{array}{rcl}
 \text{HPLC (relativo)} & \dots\dots\dots & \text{TLC (real)} \\
 100\% & \dots\dots\dots & (100 - C)\% \\
 x & \dots\dots\dots & x \text{ real} = \frac{x(100 - C)}{100}
 \end{array}$$

Por tanto, para una especie x con un determinado % por HPLC se pudo determinar su % real a través de la ecuación (1):

$$(1) \quad x_{real} = \frac{x(100 - C)}{100}$$

Siendo: C = % de coloide por TLC, x = % de especie por HPLC y x_{real} = % real de la especie.

Por tanto, si se conoce directamente el % de coloide por TLC, se puede determinar el % real de cada especie determinada por HPLC a través de la ecuación (1). De esta manera se calcularon las especies al emplear TFA 6% como fase móvil en la iTLC-SG.

En cambio, si no se conoce directamente el % de coloide por TLC, se necesitaría realizar una estimación por cálculo. En el caso de la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) para la iTLC-SG, tanto el [⁶⁸Ga]Ga-coloide como el ⁶⁸Ga libre quedan retenidos en el origen, mientras que el resto de las especies migran a cierta distancia con la fase móvil. Por ello, se estableció lo siguiente:

- si x = % de ⁶⁸Ga libre por HPLC, se puede calcular x_{real} = % real de ⁶⁸Ga libre a través de la ecuación (1),

- si α = % retenido en el origen de la TLC, correspondiente a la suma de ⁶⁸Ga libre y [⁶⁸Ga]Ga-coloide, se puede escribir la ecuación (2):

$$(1) \quad x_{real} = \frac{x(100 - C)}{100}$$

$$(2) \quad \alpha = x_{real} + C$$

Quedando un sistema de 2 ecuaciones con 2 incógnitas (x_{real} y C) del que se puede despejar el % de coloide:

$$(3) \quad C = \frac{100(\alpha - x)}{100 - x}$$

Luego de determinado C , se puede calcular el % real del resto de las especies con la ecuación (1).

Existe una limitación en la utilización de la ecuación (3), cuando $\alpha = 100$ la ecuación da 100% de coloide, pero en realidad esta cantidad queda indeterminada. Por lo cual, siempre es conveniente determinar directamente el % de coloide, ya sea por TLC con una fase móvil que separe esta especie del resto o por estimación de la actividad retenida en la columna de HPLC.

Cabe destacar que en la monografía de la Farmacopea Europea para [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC [82] se utiliza directamente la ecuación (1) para el cálculo de la PRQ del radiofármaco, pero utiliza la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1), donde tanto el [^{68}Ga]Ga-coloide como el ^{68}Ga libre permanecen en el origen [84]. Por tanto, a mi entender habría un error en ese cálculo porque se asume que en el origen de la TLC sólo está contenido el [^{68}Ga]Ga-coloide cuando en realidad también está el ^{68}Ga libre, por lo que así se obtiene una PRQ menor a la real. Esto podría subsanarse si se calcula en primer lugar el % de coloide con la ecuación (3) y luego la PRQ con la ecuación (1).

6.3.2. Oxidación de DOTA-H2-MG11

Del análisis del precursor por HPLC con detección UV (Figura 39(a)) se desprende que este péptido inicialmente presentó una pureza de 98.0%, además de que su t_R de 13.6 min coincidió posteriormente con el del producto principal de la marcación con ^{68}Ga (detección γ). Inmediatamente después de agregarle el agente oxidante, en la mezcla de oxidación a T.A. se observó la aparición de un pico de menor t_R con un área de 60.6% (Figura 39(b)). Esta conversión se vio completada (con un área de 99.2%) a los 30 min post-incubación a T.A. (Figura 39(c)), así como a los 7 min post-calentamiento a 84°C con un área de 97.7% (Figura 39(d)). El t_R del producto de oxidación fue de 11.4 min que coincidió posteriormente con el del producto secundario de la marcación con ^{68}Ga (detección γ), por lo que se asumió que podría ser producto de la oxidación del residuo de metionina del péptido ya reportado, proporcionándole esta identificación al mismo. No se realizó una caracterización posterior del producto de oxidación, por lo que no se sabe si este corresponde a la metionina sulfóxido, a la metionina sulfona o a una mezcla de ambos. El pico que se aprecia entre 8-10 min es debido al cambio en el gradiente de los solventes (ver Apéndice 1).

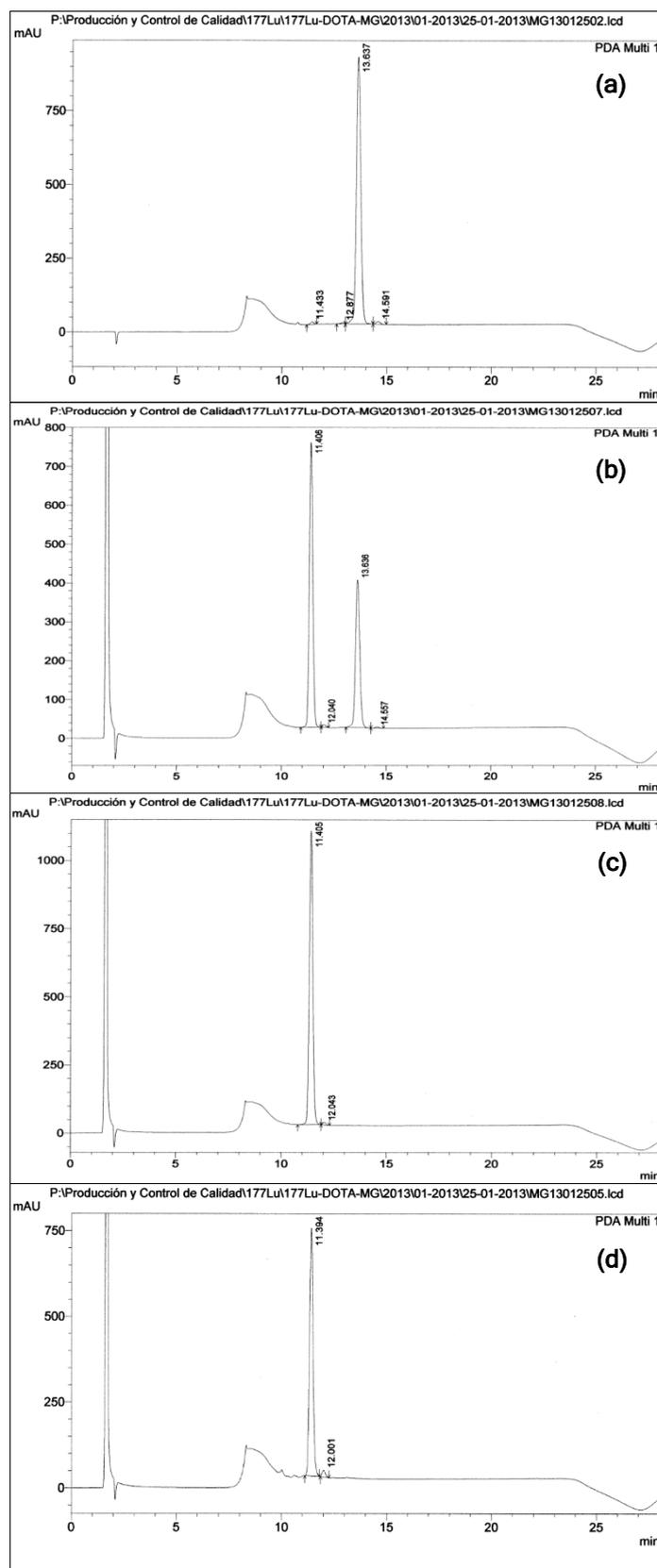


Figura 39. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección UV a $\lambda = 214$ nm) de **(a)** precursor, **(b)** mezcla de oxidación a T.A. a $t = 0$, **(c)** mezcla de oxidación a T.A. a $t = 30$ min, **(d)** mezcla de oxidación a 84°C por 7 min.

En los cromatogramas del blanco de reacción, en el que están presentes todos los componentes excepto el ^{68}Ga , tanto antes como después del calentamiento se apreció el pico del precursor intacto, lo que indicaría que las condiciones de este marcado (7 min a 84°C) por sí solas no consiguieron oxidar al residuo de metionina del péptido. En tanto, el marcado de DOTA-H2-MG11 no radiactivo, realizado con ^{nat}Ga en lugar de ^{68}Ga , produjo un pico muy similar (97.4%) al del precursor intacto (97.3%), demostrando que las condiciones del marcado a 92°C por 10 min tampoco lograron oxidar al residuo de metionina del péptido (Figura 40(b) y (a)). Mientras que en la oxidación ocasionada al marcado no radiactivo, se obtuvo un pico atribuible a la oxidación del residuo de metionina del péptido, logrando una alta pureza (94.8%) si se considera que resistió a un doble calentamiento (Figura 40(c)).

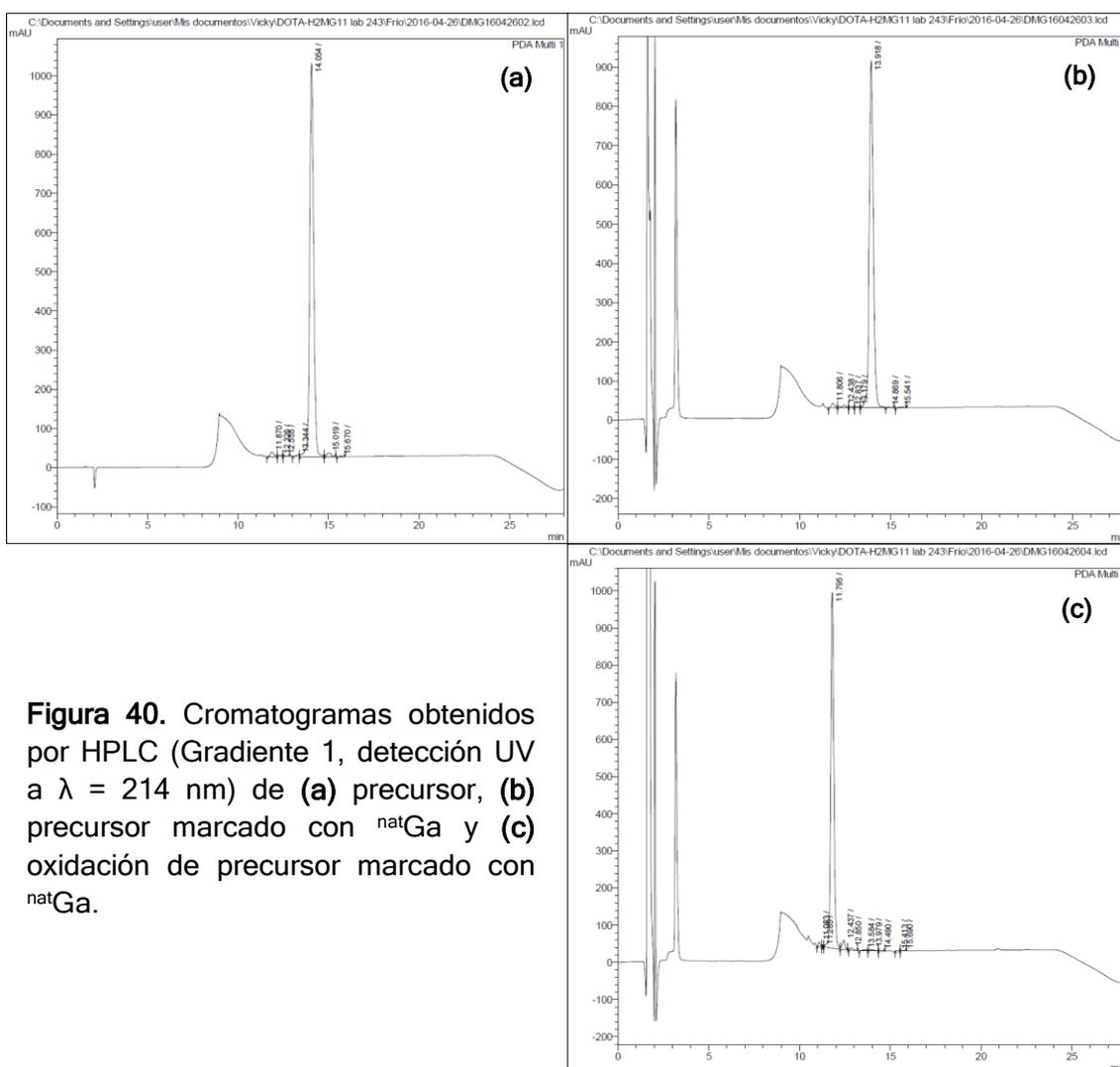


Figura 40. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección UV a $\lambda = 214 \text{ nm}$) de (a) precursor, (b) precursor marcado con ^{nat}Ga y (c) oxidación de precursor marcado con ^{nat}Ga .

En consecuencia, la oxidación del residuo de metionina del péptido podría ser producida exclusivamente por los efectos de las radiaciones ionizantes sobre el medio de reacción, donde la radiolisis del agua tendría un papel preponderante. No obstante la velocidad de reacción de la radiolisis podría aumentar con el calentamiento utilizado para el marcado.

6.3.3. Marcación inicial de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11

Las condiciones de marcado con mejores resultados fueron obtenidas con 53.6 nmol de DOTA-H2-MG11 con (3.0 o 4.0 mL) de [⁶⁸Ga]GaCl₃ en HCl 0.05 M y (150 o 200) µL de NaOAc 1.14 M, incubados durante 10 min a 84°C. Las actividades de marcado estuvieron entre (557-704) MBq y (683-712) MBq para 3.0 mL y 4.0 mL de eluido respectivamente, obteniendo una concentración de actividad promedio bastante similar de 210 MBq/mL y 174 MBq/mL respectivamente. Además de determinar las 4 especies principales presentes, se determinaron otras impurezas peptídicas marcadas con ⁶⁸Ga, ubicadas en la cercanía de GMG y GMGox en el HPLC. Las cantidades promedio de las distintas especies obtenidas en los crudos de reacción al utilizar 3.0 y 4.0 mL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ fueron bastante similares (Tabla 14), no logrando superar el 85% del producto de interés y encontrando aún ⁶⁸Ga libre. En tanto la purificación por Sep-Pak logró eliminar el ⁶⁸Ga libre, no incorporado a la molécula, y así aumentar la cantidad de GMG, aunque no se logró superar el 89% ya que no se modificaron el resto de las impurezas. De esta manera, la A_m promedio que alcanzó el [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2MG11 en el purificado fue de 6.5 ± 0.4 MBq/nmol (3.0 mL de eluido) y 6.5 ± 0.2 MBq/nmol (4.0 mL de eluido).

Tabla 14. Porcentaje de las especies presentes en el crudo de reacción y en su purificado al utilizar dos volúmenes distintos de [⁶⁸Ga]GaCl₃.

Especie	3.0 mL de eluido (n= 3)		4.0 mL de eluido (n= 4)	
	Crudo	Purificado	Crudo	Purificado
[⁶⁸ Ga]Ga-coloide	2 ± 1	3 ± 0	4 ± 3	4 ± 1
⁶⁸ Ga libre	5 ± 1	0 ± 0	6 ± 3	0 ± 0
Otras impurezas peptídicas	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 2
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-H2-MG11ox	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 2
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-H2-MG11	85 ± 2	89 ± 1	82 ± 5	88 ± 1

Promedio ± DS, n= N° de determinaciones.

El proceso de marcación, purificación y formulación tuvo una duración aproximada de 30 minutos, con un rendimiento promedio de $(81 \pm 2)\%$ y $(78 \pm 4)\%$ para 3.0 mL y 4.0 mL de eluido respectivamente, tomando como actividad inicial (100%) la medida previa a la marcación corregida por decaimiento (dc: decay corrected).

Según los resultados obtenidos en este ensayo inicial se hace necesario mejorar tanto la marcación como la purificación de esta molécula marcada, de manera de obtener finalmente un radiotrazador para diagnóstico con una pureza radioquímica mínima de 90%.

Dentro de este primer grupo de marcados vale la pena analizar dos ensayos no incluidos en la Tabla 14, correspondientes a los valores de actividad más bajos y más altos de marcación. En ambos se utilizaron 4.0 mL de eluido pero provenientes de generadores con distinta fecha de calibración, con actividades de ^{68}Ga de 394 MBq (generador con 11 meses de edad y 68 h de período de interrelución) y 922 MBq (generador con 4 meses de edad y 24 h de período de interrelución) respectivamente. Ambos marcados dieron resultados muy diferentes (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de las especies presentes en el crudo de reacción y en su purificado al utilizar dos niveles de actividad de $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ distintos.

Especie	394 MBq		922 MBq	
	Crudo	Purificado	Crudo	Purificado
$^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-coloide}$	86	73	0	3
^{68}Ga libre	10	0	4	0
Otras impurezas peptídicas	0	0	1	1
$^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DOTA-H2-MG11ox}$	0	2	19	21
$^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-DOTA-H2-MG11}$	4	25	76	75

El crudo de menor actividad dio sólo un 4% de la molécula de interés, obteniendo mayoritariamente $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}]\text{-coloide}$ y en menor proporción ^{68}Ga libre. Esto pudo deberse a la edad del generador, ya que tenía 5 meses más que cuando se utilizó en los ensayos para 4.0 mL de la Tabla 14, a lo que se le sumó el período de interrelución mayor a 48 h que es lo máximo sugerido por el fabricante. De esta manera el eluido podría contener mayor cantidad de impurezas orgánicas desprendidas de la matriz del generador (debido a la

radiación recibida durante 11 meses) y tener una muy alta concentración de ^{68}Zn (debido al decaimiento del ^{68}Ga en 68 h), lo que probablemente interfirió en la marcación de la molécula con ^{68}Ga . Además la purificación por Sep-Pak C18 light fue limitada, si bien pudo eliminar la totalidad del ^{68}Ga libre, no pudo retener todo el ^{68}Ga -colóide. Mientras que en el crudo de reacción con 922 MBq se obtuvo una buena incorporación del ^{68}Ga (96%), pero una baja proporción de GMG (76%). Esto fue debido a que se produjo un alto porcentaje de la principal impureza (19%) ocasionada por la oxidación del residuo de metionina de la molécula. Este aumento en la oxidación pudo deberse al incremento de la radiactividad en la solución de marcado, lo que limita la actividad de ^{68}Ga a utilizar en las marcaciones (en estas condiciones). En tanto la purificación del crudo únicamente pudo eliminar el ^{68}Ga libre, sin obtener una mejora en el porcentaje de la molécula de interés.

6.3.4. Optimización de la marcación de ^{68}Ga -DOTA-H2-MG11

6.3.4.1. Actividad y temperatura de marcación

Primeramente se evaluó el efecto del aumento de actividad de ^{68}Ga en la marcación, manteniendo fija la temperatura. Para ello se compararon dos marcados realizados a 84°C con distintos niveles de actividad, 84 MBq y 120 MBq. La incorporación de ^{68}Ga fue mayor al 95% en ambas reacciones, pero el marcado con mayor actividad dio una menor proporción de GMG a $t = 0$ (73% vs. 81%) debido a una mayor proporción de GMGox (19% vs. 8%) (Figura 41). Este aumento en la oxidación del residuo de metionina originado por el aumento de actividad en la solución, en principio podría ser explicado por la formación de más radicales libres oxidantes generados en la interacción de las radiaciones ionizantes con el agua del medio de reacción. Conjuntamente a tiempo inicial se obtuvo 2% y 5% de ^{68}Ga libre para los marcados de mayor y menor actividad respectivamente, en tanto coincidieron en los valores de otras impurezas peptídicas (7%) y ^{68}Ga -colóide (0%).

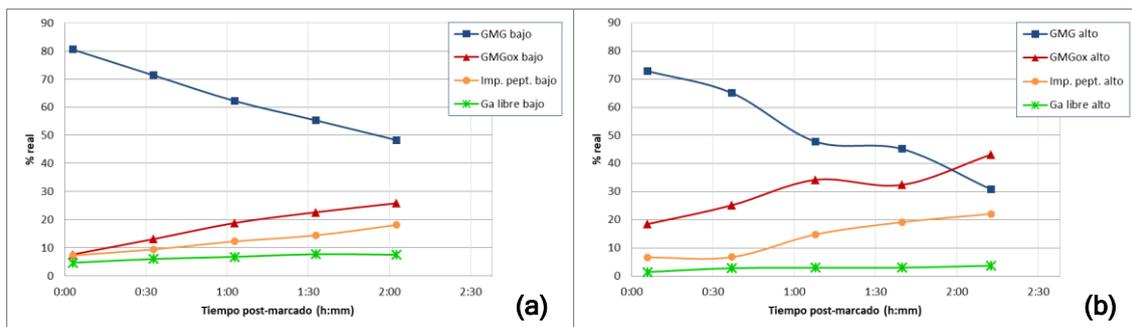


Figura 41. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados a 84°C con distinto nivel de actividad: (a) 84 MBq (bajo) y (b) 120 MBq (alto).

Con el transcurso del tiempo, se observó una disminución de GMG en ambos marcados, mientras se obtuvo un aumento de GMGox y del resto de las impurezas peptídicas, haciéndose más notable en el marcado con mayor actividad (Figura 41). Pasadas las 2 h post-marcado se obtuvo 48% y 31% de GMG, 26% y 43% de GMGox, 18% y 22% de otras impurezas peptídicas, y 7% y 4% de ^{68}Ga libre para los marcados de menor y mayor actividad respectivamente, en tanto se obtuvo el mismo valor para ambos de ^{68}Ga -Galoide (0%). Esto indicaría una importante inestabilidad de la molécula de interés con el tiempo, transformándose probablemente en otras moléculas peptídicas dañadas por los radicales libres, incluyendo la GMGox (Figura 42).

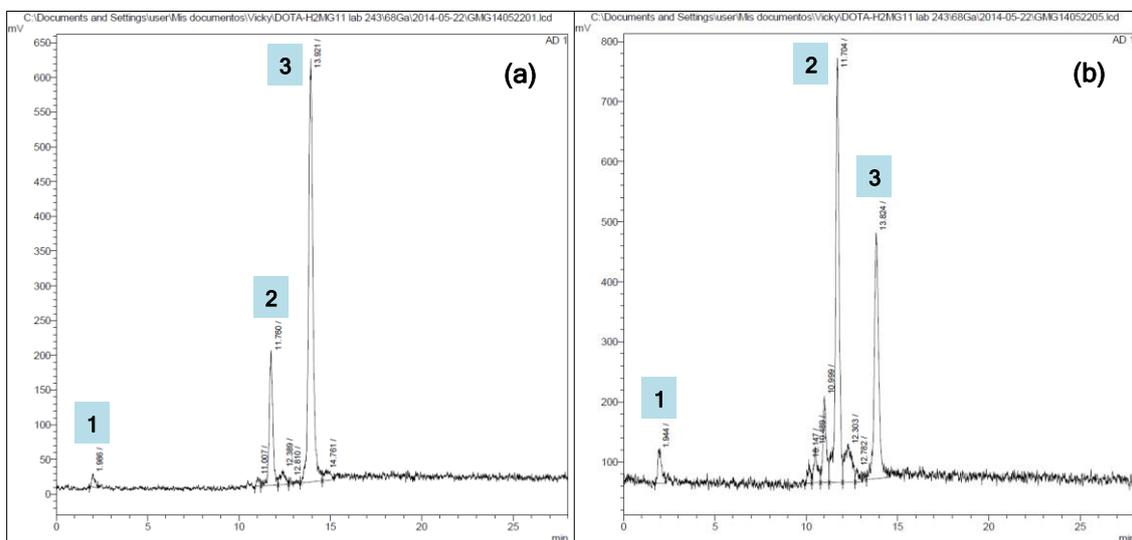


Figura 42. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado a 84°C con alta actividad (120 MBq) a distintos tiempos post-marcado: (a) 6 min y (b) 2 h 13 min.

Aunque ambos marcados tuvieron un exceso considerable de moles de péptido respecto a moles de ^{68}Ga (10800 veces para 84 MBq y 7600 veces para 120

MBq), se obtuvo cierta cantidad de ^{68}Ga no incorporado, y además, en contra de lo esperado, se obtuvo más ^{68}Ga libre en el mercado con menor actividad. Esto podría explicarse por la calidad del eluido utilizado, ya que para el marcado con actividad más baja se utilizó un generador con 11 meses de edad y 23 h de período de interrelución, y para el marcado con actividad más alta se utilizó un generador con 6 meses de edad y 8 h de período de interrelución. Es así que el eluido con la actividad más baja podría contener mayor cantidad de impurezas orgánicas y ^{68}Zn , que podrían interferir en la marcación de la molécula con ^{68}Ga .

En segundo lugar se evaluó el efecto del aumento de temperatura en la marcación, manteniendo fija la actividad de ^{68}Ga . Para ello se realizó un marcado con 123 MBq a 100°C , de manera de compararlo con el marcado anterior realizado con 120 MBq a 84°C . En ambos mercados, la incorporación de ^{68}Ga fue alta (mayor a 97%) pero la cantidad correspondiente a la molécula de interés tuvo un máximo de aproximadamente 70% a $t = 0$, obteniendo 73% y 70% de GMG para los mercados de menor y mayor temperatura respectivamente (Figura 43). Asimismo a tiempo inicial se obtuvieron para ambos los mismos valores de ^{68}Ga libre (2%) y ^{68}Ga -coloide (0%).

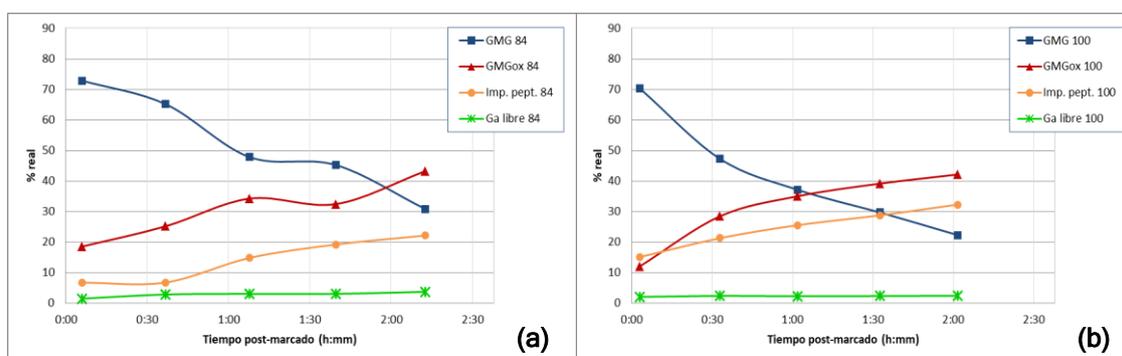


Figura 43. Evolución de las distintas especies con el tiempo para mercados con la misma actividad a distintas temperaturas: (a) 84°C (120 MBq) y (b) 100°C (123 MBq).

Aunque la reacción a mayor temperatura dio una menor proporción de GMGox a tiempo inicial (12% vs. 19%), con el transcurso del tiempo esta impureza aumentó en ambos mercados llegando a igualarse a las 2 h (43% a 84°C y 42% a 100°C). Lo que parecería indicar en este caso, que la oxidación del residuo de metionina dependió principalmente de la actividad de marcación y no tanto de la temperatura. En cambio a $t = 0$, el resto de las impurezas peptídicas

(constituido por todos los picos de la Figura 44(a) exceptuando los 3 picos principales), se produjo en mayor proporción a mayor temperatura (15% vs. 7%). Esto podría indicar que las velocidades de reacción entre los distintos radicales libres (producidos por la radiólisis del agua) y la molécula de GMG, que producen una gran variedad de productos secundarios, se ven más afectadas con la temperatura que la propia oxidación del residuo de metionina. Con el transcurso del tiempo, ambos marcados presentaron un aumento de estas impurezas peptídicas (con velocidad similar), alcanzando 32% para 100°C y 22% para 84°C a las 2 h post-marcado.

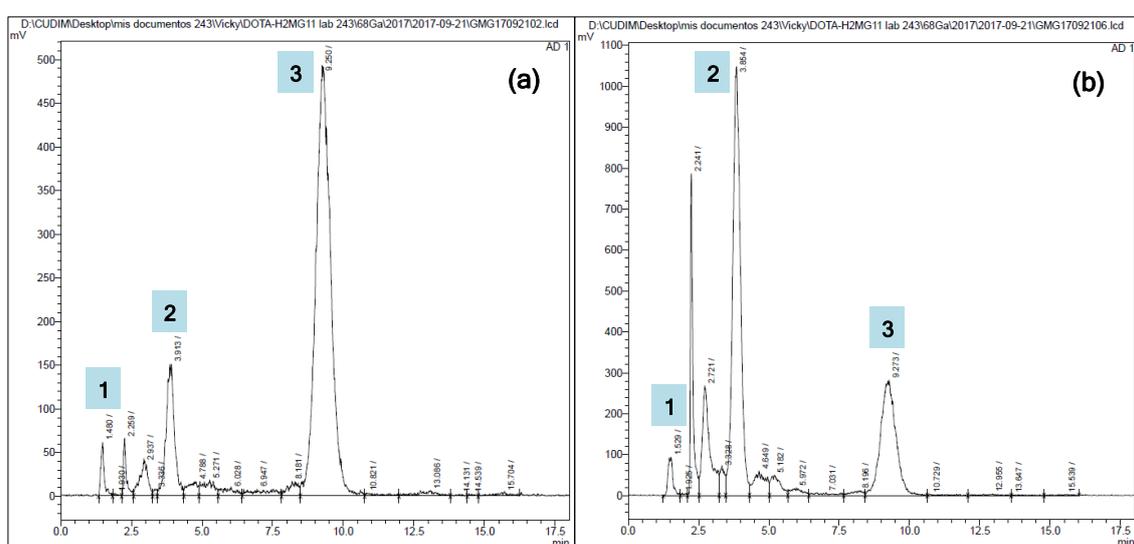


Figura 44. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Isocrático, detección γ) del marcado con 123 MBq a alta temperatura (100°C) a distintos tiempos post-marcado: **(a)** 3 min y **(b)** 2 h 2 min.

Todo lo anterior provocó una disminución de la molécula de interés con el tiempo, haciéndose más notable en el marcado a mayor temperatura, alcanzando al final del estudio los valores de 31% (84°C) y 22% (100°C) (Figuras 43 y 44). En tanto, durante todo ese tiempo se mantuvieron bajas las cantidades de ^{68}Ga libre y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide, alcanzando a las 2 h post-marcado los valores de 4% (84°C) y 2% (100°C) para el primero, y de 0% (84°C) y 1% (100°C) para el segundo.

Esto indicaría una mayor inestabilidad de la molécula marcada de interés a mayor actividad y a mayor temperatura de marcación. Por lo cual, se decide continuar con la menor temperatura (84°C) y tratar de remediar el impacto de

las altas actividades en el marcado, por lo que se hace necesario buscar alternativas para disminuir la producción de todas las impurezas peptídicas.

6.3.4.2. Agregado de antioxidantes

En el ensayo realizado para la determinación del volumen de Buffer ASAG (0.4-0.24) (NaOAc 0.4 M - ácido gentísico 0.24 M, de pH 4.4) necesario para alcanzar un pH ~ 4 en el marcado con ^{68}Ga , se obtuvo un pH > 4 a partir del agregado de 550 μL a 1000 μL de HCl 0.05 M (Figura 45). Se eligió utilizar un volumen de 750 μL de Buffer cada 1000 μL de eluido para asegurar un pH adecuado en el marcado (pH = 4.14).

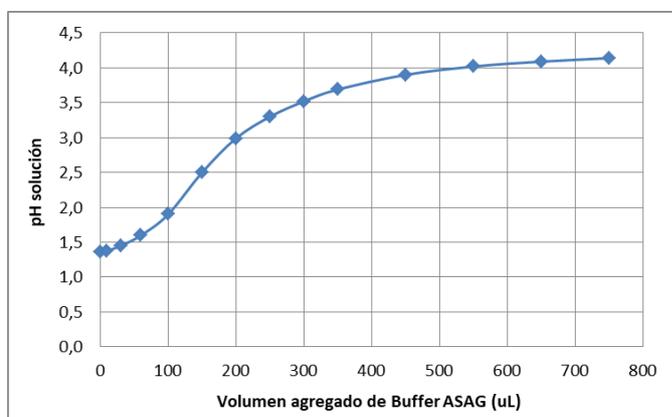


Figura 45. pH de la solución en función del agregado de Buffer ASAG (0.4-0.24) a 1000 μL de HCl 0.05 M.

El agregado del Buffer ASAG (0.4-0.24) disminuyó el rendimiento de marcación. Esto se vio al comparar dos marcados con 15 μg de precursor, en uno se utilizó 25 μL de NaOAc 1.14 M (Sin Buffer ASAG (0.4-0.24)) y en el otro 375 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24), manteniendo el resto de las condiciones iguales. La incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (GMG + GMGox + otras impurezas peptídicas) a tiempo inicial disminuyó de 95% a 12% al sustituir la solución de NaOAc por el Buffer ASAG (0.4-0.24), con lo cual aumentaron el ^{68}Ga libre de 5% a 49% y el ^{68}Ga -coloide de 0% a 40% (Figura 46(a)). Esta caída en la incorporación del ^{68}Ga al utilizar el Buffer ASAG (0.4-0.24) podría deberse a tres factores: 1) aumento del volumen de marcación, de 540 a 890 μL , lo que disminuiría la velocidad de incorporación por dilución de los reactivos, 2) aumento de la cantidad de NaOAc, de 28.5 a 150 μmol , lo que podría dificultar el intercambio del ^{68}Ga entre el ligando estabilizador (en mayor exceso) y el anillo DOTA, y 3) presencia importante de ácido gentísico (90 μmol), que podría comportarse como un ligando estabilizador para el ^{68}Ga o

directamente contener impurezas metálicas que compitan por el DOTA, ya que se utiliza ácido gntísico de calidad “para síntesis” donde el certificado de análisis (CoA: Certificate of Analysis) no informa el contenido de impurezas metálicas, por lo que seguramente contenga mayor cantidad respecto a los reactivos de mejor calidad “Suprapur”.

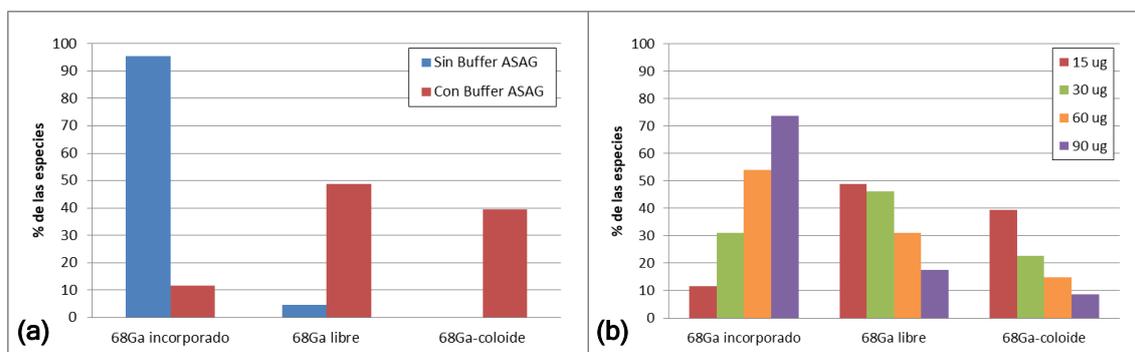


Figura 46. Influencia del Buffer ASAG (0.4-0.24) en la incorporación del ⁶⁸Ga al DOTA-péptido: (a) en presencia o no de Buffer ASAG (0.4-0.24) y (b) en presencia de Buffer ASAG (0.4-0.24) y distinta cantidad de precursor.

En la Tabla 16 se resume la cantidad calculada de los distintos componentes presentes en ambos marcados. A pesar de que el exceso en moles de DOTA-H2-MG11 respecto a ⁶⁸Ga es de ~ 10000, podrían existir suficientes impurezas metálicas que compitan con el radiometal. La cantidad de moles de Fe y Zn (metales que compiten con el Ga) aportados por el NaOAc en ambos marcados es del orden del ⁶⁸Ga presente, por lo cual no competirían con este último ya que habría suficiente DOTA-péptido para todos. Pero no se puede descartar que el ácido gntísico (AG) contenga mayor cantidad de impurezas metálicas que compitan con el ⁶⁸Ga por el anillo DOTA, disminuyendo así el rendimiento del marcado con Buffer ASAG (0.4-0.24).

Tabla 16. Cantidad calculada de moles de los distintos componentes presentes en los marcados “Sin Buffer ASAG” y “Con Buffer ASAG”.

	NaOAc	AG	DOTA-H2-MG11	⁶⁸ Ga	Fe máx.*		Zn máx.*	
					NaOAc	AG	NaOAc	AG
Sin Buffer ASAG	2.9 x 10 ⁻⁵	-	8.9 x 10 ⁻⁹	1.2 x 10 ⁻¹²	4.2 x 10 ⁻¹³	-	1.8 x 10 ⁻¹³	-
Con Buffer ASAG	1.5 x 10 ⁻⁴	9.0 x 10 ⁻⁵	8.9 x 10 ⁻⁹	8.9 x 10 ⁻¹³	2.2 x 10 ⁻¹²	NI	9.4 x 10 ⁻¹³	NI

*Máxima cantidad de Fe y Zn aportada según CoA por NaOAc (0.01 ppm y 0.005 ppm) y AG (NI= No informado en CoA).

Seguidamente se estudió el aumento de la masa del precursor en presencia del Buffer ASAG (0.4-0.24), para ver si se producía variación en el rendimiento de marcación. Se obtuvo un incremento en la incorporación de ^{68}Ga al DOTA-péptido al aumentar el precursor gradualmente de 15 a 90 μg , pasando de 12% a 74%, con lo cual disminuyeron el ^{68}Ga libre de 49% a 18% y el ^{68}Ga -coloide de 40% a 9% (Figura 46(b)). Esto parecería confirmar que el ^{68}Ga tuviera que competir para su coordinación con el anillo DOTA, ya que con el aumento de la cantidad de precursor aumentó su incorporación.

Se comparó el marcado anterior de 15 μg de precursor conteniendo 375 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) durante el calentamiento (“con Buffer ASAG”), con el marcado realizado en presencia de NaOAc 1.14 M y agregado post-marcado de 375 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) (al finalizar calentamiento), manteniendo iguales el resto de las condiciones. A tiempo inicial se obtuvo una notable mejora en la incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (GMG + GMGox + otras impurezas peptídicas) al agregar el Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, pasando de 12% a 92%, disminuyendo el ^{68}Ga libre de 49% a 8% y el ^{68}Ga -coloide de 40% a 0% (Figura 47). Esto fortalecería la idea de que el Buffer ASAG (0.4-0.24) podría interferir durante la marcación del DOTA-H2-MG11 con el ^{68}Ga . Si se agrega agua en lugar de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, se obtiene una mayor incorporación de ^{68}Ga , pasando de 92% a 98%, disminuyendo el ^{68}Ga libre de 8% a 2% y manteniendo en 0% el ^{68}Ga -coloide (Figura 47). Esto indicaría que incluso el Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado desestabilizaría en cierta proporción la coordinación ^{68}Ga - DOTA producida en el marcado. Mientras que el agregado de agua post-marcado no cambió el % de ^{68}Ga incorporado, ya que se obtuvieron los mismos valores que con el marcado sin agregados (sin Buffer ASAG (0.4-0.24)).

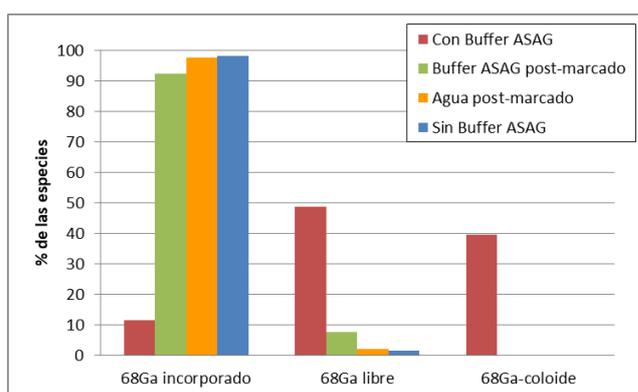


Figura 47. Influencia del Buffer ASAG (0.4-0.24) en la incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido a $t = 0$, dependiendo del momento de agregado del Buffer.

Al estudiar en detalle los últimos tres marcados de la Figura 47 y su estabilidad con el tiempo, se lograron ver ciertas diferencias (Figura 48).

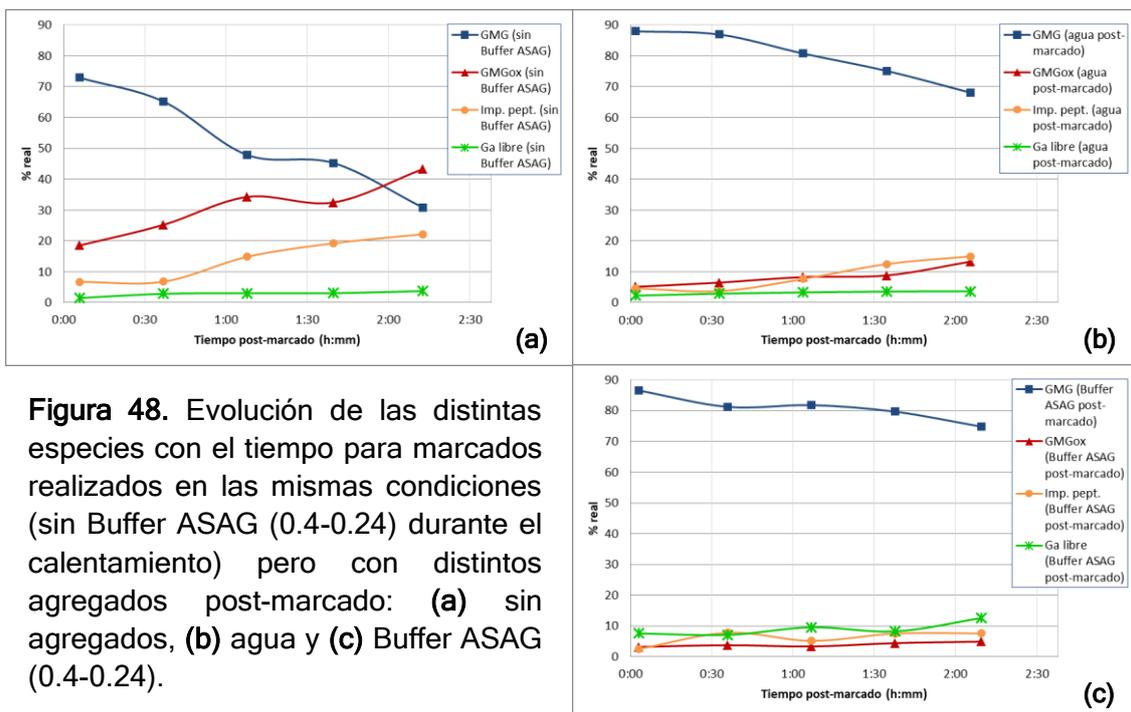


Figura 48. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados realizados en las mismas condiciones (sin Buffer ASAG (0.4-0.24) durante el calentamiento) pero con distintos agregados post-marcado: (a) sin agregados, (b) agua y (c) Buffer ASAG (0.4-0.24).

A $t = 0$ se alcanzó la cantidad más alta de GMG (88%) en el marcado con agregado de agua post-marcado (Figura 48(b)), debido a las bajas cantidades de GMGox (5%), otras impurezas peptídicas (5%) y ^{68}Ga libre (2%). Se observó la disminución de GMG con el tiempo obteniendo 68% a las 2 h, y un aumento de las impurezas peptídicas, alcanzando en ese tiempo 13% para GMGox y 15% para el resto. El ^{68}Ga libre aumentó muy poco con el tiempo, llegando a 4% a las 2 h, en tanto el ^{68}Ga -coloide se mantuvo en 0% en todo momento. Por tanto el efecto de la dilución post-marcado, aumentando el volumen de 540 μL (marcado) a 915 μL (luego de agregarle 375 μL de agua post-marcado), proporcionó una mejora significativa al disminuir todas las impurezas peptídicas (Figura 48(b) y (a), Figura 49(b) y (a)). Esto se explicaría por una disminución en la velocidad de interacción entre los radicales libres y la molécula marcada al disminuir la concentración de ambos.

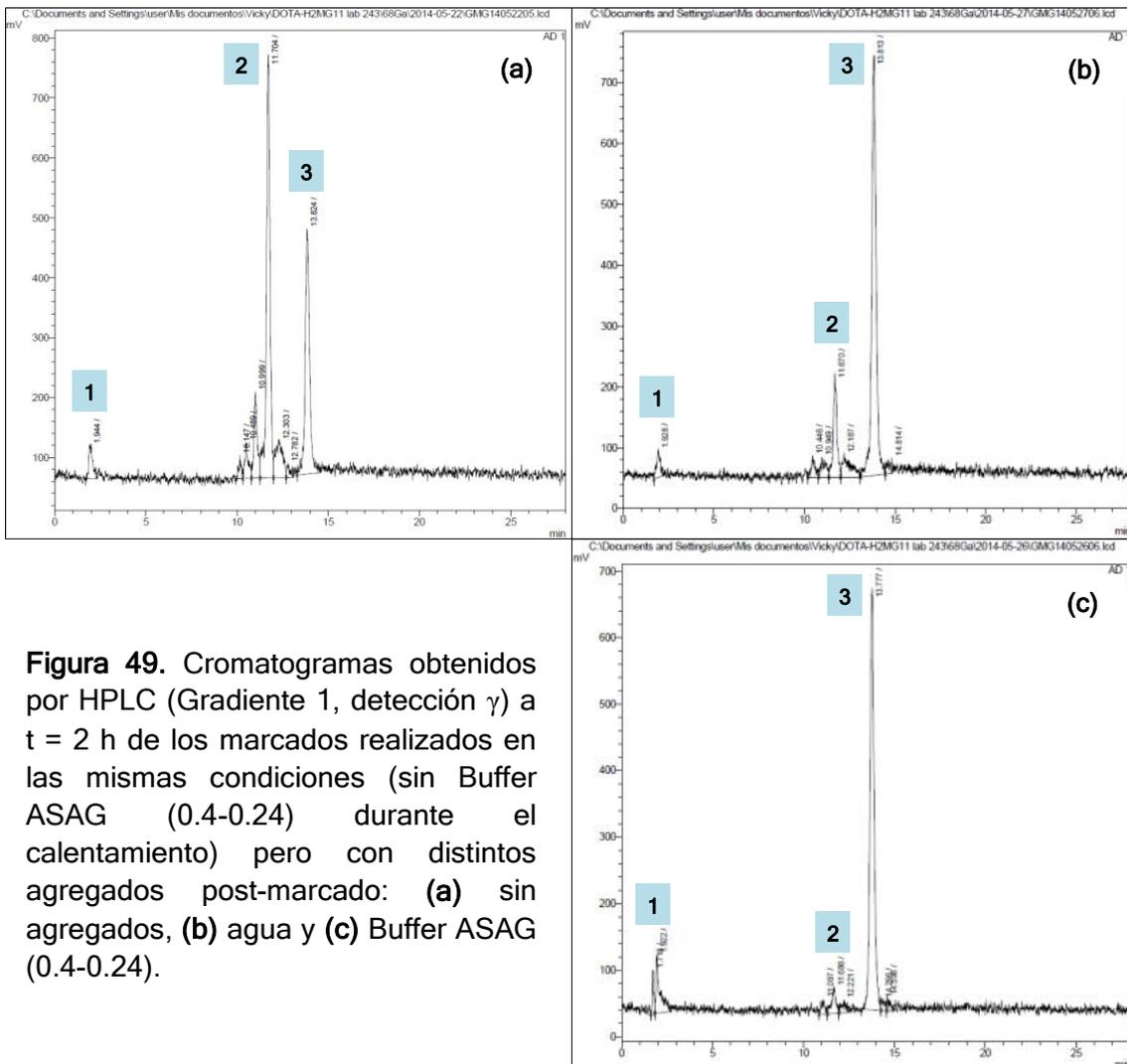


Figura 49. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) a $t = 2$ h de los marcados realizados en las mismas condiciones (sin Buffer ASAG (0.4-0.24) durante el calentamiento) pero con distintos agregados post-marcado: (a) sin agregados, (b) agua y (c) Buffer ASAG (0.4-0.24).

En el caso del agregado de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, a $t = 0$ también se obtuvo una alta cantidad de GMG (87%) (Figura 48(c)), debido a las bajas cantidades de GMGox (3%) y otras impurezas peptídicas (3%), mientras el ^{68}Ga libre subió un poco (8%). Se observó la disminución de GMG con el tiempo obteniendo 75% a las 2 h, y un aumento de las impurezas peptídicas, alcanzando en ese tiempo 5% para GMGox y 8% para el resto. El ^{68}Ga libre aumentó a 13% a las 2 h, en tanto el ^{68}Ga -coluido se mantuvo en 0% en todo momento. Por tanto el agregado del antioxidante ácido genticónico post-marcado presentó una mejora respecto al agregado de agua post-marcado, al disminuir un poco más todas las impurezas peptídicas por la interacción entre los radicales libres y el antioxidante, en el lugar de la molécula marcada (Figura 48(c) y (b), Figura 49(c) y (b)). Sin embargo presentó una desmejora al aumentar el ^{68}Ga libre, al desestabilizar la coordinación ^{68}Ga - DOTA producida

en el marcado. Esta desestabilización al utilizar Buffer ASAG (0.4-0.24) podría explicarse si se formaran nuevamente complejos de ^{68}Ga con el ligando estabilizador en gran exceso (acetato), o incluso con el gentisato ya que se ha reportado la complejación de metales con polifenoles [92], ácidos fenólicos [93], y más específicamente de Fe^{3+} con ácido gentísico [94]. La idea de que el ^{68}Ga libre pudiera estar presente en más de una especie en el marcado con agregado de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, surgió al observar el desdoblamiento del pico correspondiente en el HPLC con el transcurso del tiempo (Figura 50(a)). Mientras que este desdoblamiento no se aprecia cuando se agregó agua post-marcado (Figura 50(b)).

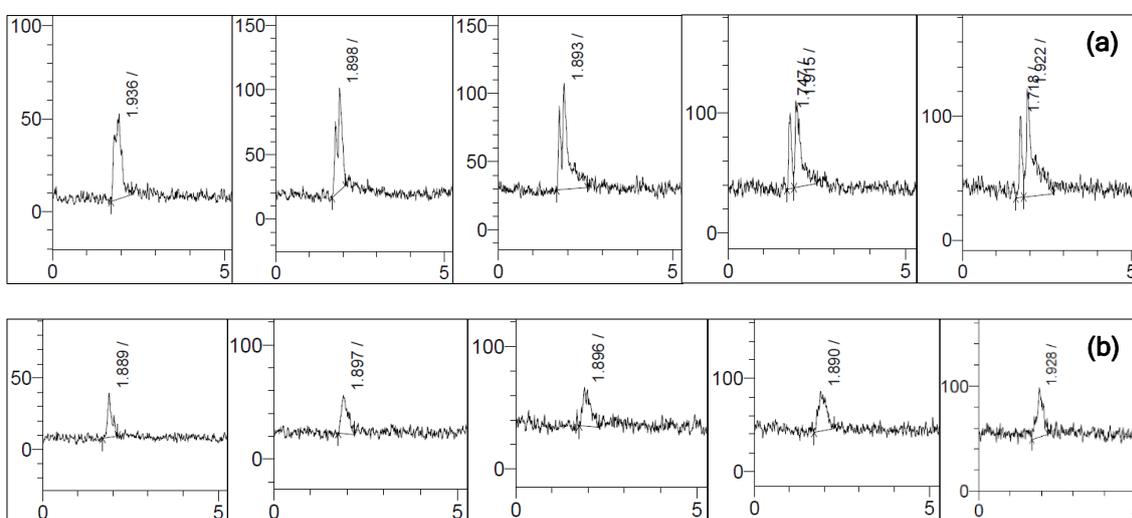


Figura 50. Pico de ^{68}Ga libre obtenido por HPLC a distintos tiempos post-marcado, de izquierda a derecha: 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 h, **(a)** en marcado con agregado de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado y **(b)** en marcado con agregado de agua post-marcado.

Con la finalidad de evitar la desestabilización del ^{68}Ga del DOTA-H2-MG11 se ensayó otro antioxidante, la L-metionina, utilizada para inhibir la oxidación del residuo de metionina del propio péptido marcado. En primer lugar se agregó la L-metionina 3.3 mM post-marcado, en un volumen de 375 μL , para poder comparar con el agregado de 375 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado. A tiempo inicial se obtuvo una pequeña mejora en la incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (GMG + GMGox + otras impurezas peptídicas) al agregar la L-metionina (95% vs. 92%) por disminución del ^{68}Ga libre (5% vs. 8%) ya que se obtuvo 0% de ^{68}Ga -coloide para ambos. Con el transcurso del tiempo se observó un comportamiento similar de ambos marcados (Figura 51(a) y (b)), ya que al agregar la L-metionina post-marcado se observó una disminución de

GMG de 86% a 74% desde $t = 0$ hasta las 2 h, un pequeño aumento de GMGox (5% a 6%) y un aumento un poco más notorio del resto de las impurezas peptídicas (5% a 9%). El ^{68}Ga libre se incrementó muy poco con el tiempo (5% a 7%) pero el ^{68}Ga coloide aumentó de 0% a 5%. Por lo cual, la solución de L-metionina (de la cual se desconoce el contenido de metales traza, por no estar informado en el CoA del reactivo) desestabilizaría en menor medida la coordinación ^{68}Ga - DOTA producida en el marcado, con respecto al Buffer ASAG (0.4-0.24), por lo que seguidamente se ensayó su incorporación previo al calentamiento.

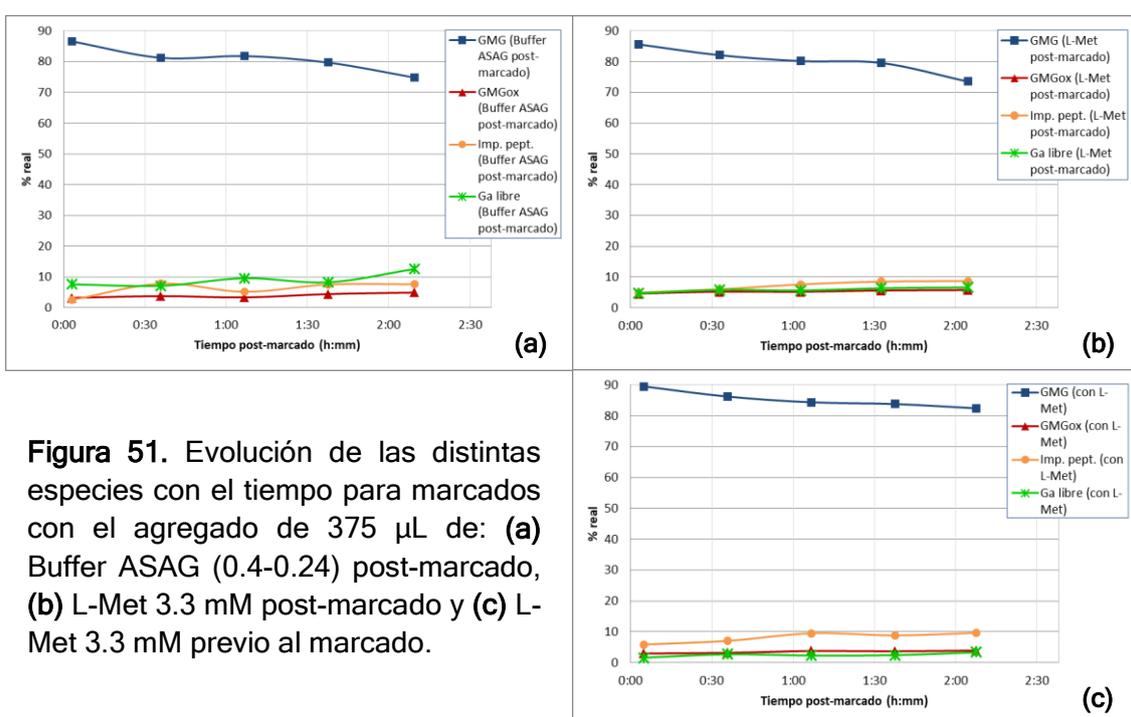


Figura 51. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados con el agregado de 375 μL de: (a) Buffer ASAG (0.4-0.24) post-marcado, (b) L-Met 3.3 mM post-marcado y (c) L-Met 3.3 mM previo al marcado.

Fue así que se agregó el mismo volumen de L-metionina 3.3 mM previo al calentamiento para evaluar si este afectaba el rendimiento de marcación. Se obtuvieron muy buenos resultados ya que a $t = 0$ se alcanzó un 98% de incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (GMG + GMGox + otras impurezas peptídicas), un 2% de ^{68}Ga libre y 0% de ^{68}Ga coloide. Además a tiempo inicial se consiguió obtener la cantidad más alta de GMG (90%) hasta el momento (Figura 51(c)), debido a las bajas cantidades de GMGox (3%) y otras impurezas peptídicas (6%). Se observó la menor disminución de GMG con el tiempo consiguiendo 82% a las 2 h, el menor aumento de GMGox (4%) pero un aumento más notorio del resto de las impurezas peptídicas (10%). El ^{68}Ga libre

aumentó muy poco con el tiempo, llegando a 3% a las 2 h, así como el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide llegó a 1%, por lo que la solución de L-metionina no interfirió en la coordinación ^{68}Ga - DOTA. Por tanto el agregado de este aminoácido previo al calentamiento logró obtener y mantener en el tiempo bajos niveles de ^{68}Ga libre, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide y GMGox, pero no pudo controlar muy bien la formación de otras impurezas peptídicas (Figura 52).

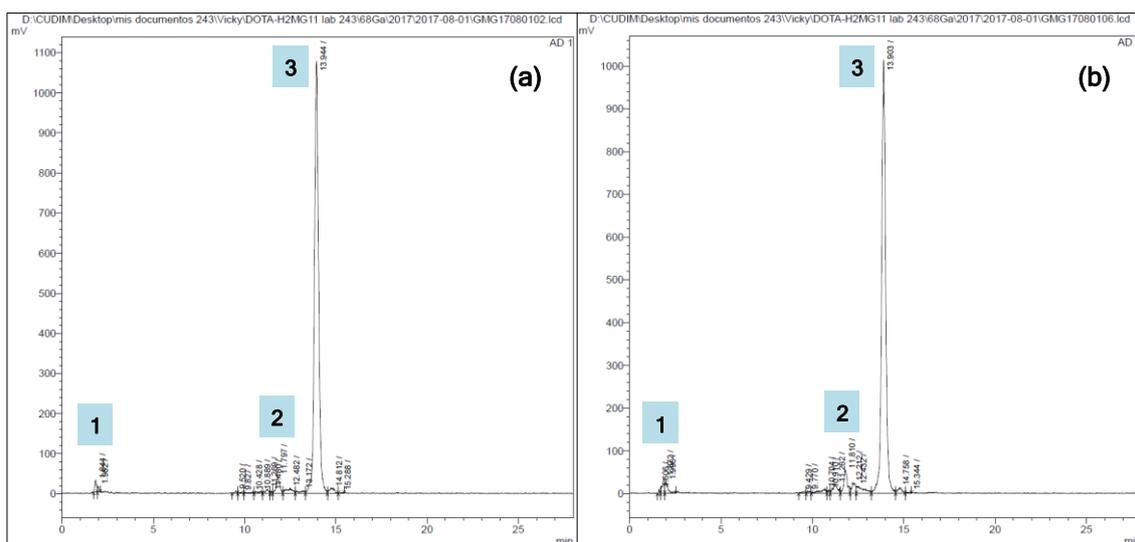


Figura 52. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado con agregado de L-metionina previo al calentamiento a dos tiempos post-marcado: (a) 5 min y (b) 2 h 8 min.

Con el afán de disminuir al máximo los niveles de GMGox y ^{68}Ga libre, se aumentaron tanto la concentración (x4) de L-metionina a agregar previo al calentamiento como la temperatura de marcación (de 84°C a 92°C y 100°C). A tiempo inicial se logró aumentar la incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (GMG + GMGox + otras impurezas peptídicas) con el aumento de temperatura, obteniendo 98% (92°C) y 99% (100°C), al tener 2% (92°C) y 1% (100°C) de ^{68}Ga libre y 0% de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide en ambos. Para el primer aumento de temperatura (92°C) con L-metionina 13.4 mM, a $t = 0$ se consiguió obtener 91% de GMG debido a las bajas cantidades de GMGox (3%) y otras impurezas peptídicas (4%) (Figura 53(a)). Se observó una menor disminución de GMG con el tiempo consiguiendo 85% a las 2 h así como una cantidad invariable de GMGox (3%). En tanto en ese tiempo se obtuvo un menor aumento del resto de las impurezas peptídicas (7%), de ^{68}Ga libre (3%) y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide (2%). Por tanto el aumento de L-metionina (3.3 mM a 13.4 mM) y la temperatura (84°C a 92°C) en la marcación logró obtener y mantener en el tiempo altos niveles de

GMG gracias a los bajos niveles de todas las impurezas peptídicas (Figura 51(c) vs. Figura 53(a)), pero no pudo disminuir los niveles de ^{68}Ga libre y ^{68}Ga coloide.

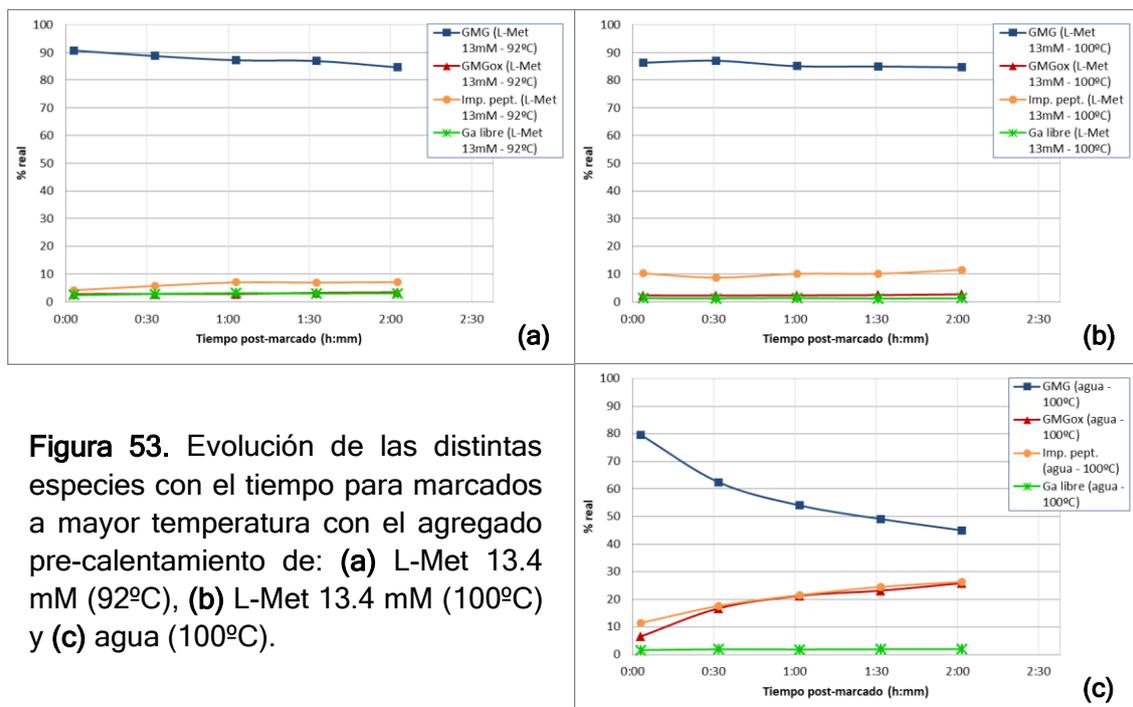


Figura 53. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados a mayor temperatura con el agregado pre-calentamiento de: (a) L-Met 13.4 mM (92°C), (b) L-Met 13.4 mM (100°C) y (c) agua (100°C).

En el segundo aumento de temperatura (100°C) con L-metionina 13.4 mM, a t = 0 se consiguieron las menores cantidades de ^{68}Ga libre (1%) y GMGox (2%), sin presentar ^{68}Ga coloide (0%). Sin embargo se obtuvo una menor cantidad de GMG (86%) debido a un aumento de las otras impurezas peptídicas (10%) (Figura 53(b)). Se logró mantener casi constantes todas las especies durante las 2 h post-marcado, obteniendo en ese tiempo una leve disminución de GMG (85%) y un leve aumento de GMGox (3%) y del resto de las impurezas peptídicas (12%), manteniendo invariados los niveles de ^{68}Ga libre (1%) y ^{68}Ga coloide (0%). Por tanto el aumento de temperatura a 100°C junto con el incremento de la L-metionina (13.4 mM) logró obtener muy buenos resultados respecto a las especies principales, exceptuando a las otras impurezas peptídicas, no obstante todas las especies se mantuvieron casi invariables durante todo el tiempo de estudio. El incremento de estas impurezas peptídicas provocado por el aumento de temperatura (Figura 53(a) y (b)) ya se había detectado al aumentar la temperatura en ausencia de antioxidantes (Figura 43), y aunque la L-metionina no evitó su formación durante el tiempo de incubación, permitió mantenerlas casi constantes luego

del marcado (hasta 2 h). Esto pudo verse claramente al sustituir la L-metionina por agua en el marcado a 100°C, ya que estas impurezas aumentaron de 11% a 26% desde t = 0 hasta las 2 h (Figura 53(c)), junto con un aumento esperado de GMGox (7% a 26%). En consecuencia disminuyó la cantidad de GMG de 80% a 45%, ya que se mantuvieron constantes el ⁶⁸Ga libre (2%) y el [⁶⁸Ga]Ga-coloide (1%).

Por lo cual, se decidió continuar los marcados a 100°C utilizando 375 µL de L-metionina 13.4 mM y evaluar la manera de disminuir el resto de las impurezas peptídicas. Fue así que se recapacitó sobre el agregado de ácido gentísico, pero sumado como segundo antioxidante y con ciertas consideraciones. Al analizar la dependencia encontrada previamente entre la incorporación de ⁶⁸Ga y la masa del precursor en presencia del Buffer ASAG (0.4-0.24) (Figura 46(b)), se sugirió acerca de una posible competencia entre el ácido gentísico y el precursor DOTA-H2-MG11 por el ⁶⁸Ga. En ese ensayo los moles de AG se mantuvieron fijos (9.0×10^{-5}) y en exceso respecto al precursor que fue aumentando, con lo cual la relación de moles entre el primero y el segundo fue disminuyendo, con una probable disminución de la competencia del AG, permitiendo una mayor incorporación del ⁶⁸Ga al precursor (Tabla 17).

Tabla 17. Incorporación del ⁶⁸Ga al precursor en función de la relación de moles entre el ácido gentísico y el precursor DOTA-H2-MG11.

Masa precursor (µg)	Moles precursor (nmol)	Relación moles AG / precursor	Incorporación de ⁶⁸ Ga (%)
15	8.9	10000	12
30	17.9	5000	31
60	35.8	2500	54
90	53.6	1700	74

Fue así que se pensó en disminuir la cantidad de AG en la reacción, considerando un trabajo científico sobre la marcación de un péptido análogo de minigastrina con ¹¹¹In donde se utilizó una relación de moles AG / precursor ~ 700 [37]. A la vez, la cantidad de L-metionina optimizada hasta el momento, 375 µL de concentración 13.4 mM, presenta una relación de moles L-metionina / DOTA-H2-MG11 ~ 550. Por lo tanto, se eligió disminuir a 500 la relación de moles AG / DOTA-H2-MG11, con lo cual para 8.9×10^{-9} moles de precursor se

necesitaban 4.5×10^{-6} moles de AG. Con la idea de incorporar el ácido gentísico en la misma solución de NaOAc 1.14 M, y en el mismo volumen de 25 μL , se calculó una concentración de 0.18 M necesaria para el AG. Es así que se preparó la solución de NaOAc 1.14 M - ácido gentísico 0.18 M, de pH 5.0 (Buffer ASAG (1.14-0.18)) para utilizar en los marcados. Primero se comprobó si la mezcla de 25 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18) con 500 μL de HCl 0.05 M tenía el pH adecuado (~ 4). Con lo que se vio necesario aumentar a 40 μL de Buffer para asegurar un pH adecuado de 4.0-4.5 en la marcación con 500 μL de eluido (Tabla 18).

Tabla 18. pH de la solución formada por 500 μL de HCl 0.05 M con distintos volúmenes de Buffer ASAG (1.14-0.18).

Volumen Buffer ASAG (1.14-0.18)	25 μL	40 μL	50 μL
pH	3.5-4.0	4.0-4.5	4.5

En consecuencia aumentaron los moles a utilizar en el marcado, tanto de NaOAc (2.9×10^{-5} a 4.6×10^{-5}) como de AG (4.5×10^{-6} a 7.2×10^{-6}), con lo que la relación final de moles AG / precursor resultó en ~ 800 (para 8.9×10^{-9} moles de precursor).

Esta disminución del ácido gentísico en la reacción de marcación permitió un aumento en la incorporación del ^{68}Ga , alcanzando el 95% al agregar L-metionina y Buffer ASAG (1.14-0.18) previo al calentamiento, fortaleciendo la hipótesis de la posible competencia del gentisato con el precursor por la formación de complejos con el ^{68}Ga . Además la suma del ácido gentísico como segundo antioxidante a la reacción de marcación permitió reducir la formación de impurezas peptídicas, respecto a la utilización de L-metionina como único antioxidante (Figura 54(b) y (a)). A tiempo inicial se obtuvo un 6% de impurezas peptídicas (vs. 10%) y la misma cantidad de GMGox (2%), pero debido a que aumentaron un poco las cantidades de ^{68}Ga libre (4% vs. 1%) y ^{68}Ga -Gacoloide (1% vs. 0%) no se obtuvo variación en GMG (87% vs. 86%). También se logró mantener casi constantes todas las especies durante las 2 h post-marcado, obteniendo en ese tiempo una leve disminución de GMG (84%) y un

leve aumento de GMGox (3%) y del resto de las impurezas peptídicas (8%), manteniendo invariados los niveles de ^{68}Ga libre (4%) y ^{68}Ga -coloide (1%).

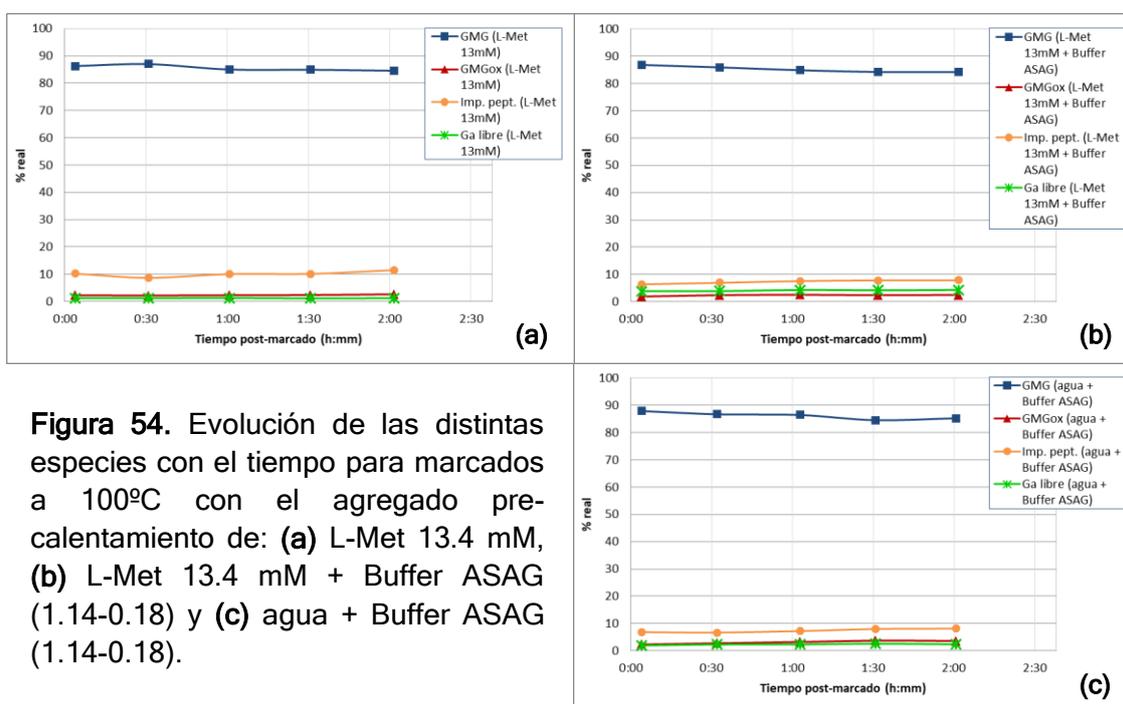


Figura 54. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados a 100°C con el agregado precalentamiento de: (a) L-Met 13.4 mM, (b) L-Met 13.4 mM + Buffer ASAG (1.14-0.18) y (c) agua + Buffer ASAG (1.14-0.18).

El uso del ácido genticónico como único antioxidante en la reacción de marcación también dio muy buenos resultados, esto pudo verse al sustituir la L-metionina por agua en el marcado con Buffer ASAG (1.14-0.18), obteniéndose una incorporación de ^{68}Ga del 97%. Además permitió controlar todas las especies presentes desde $t = 0$ hasta las 2 h post-marcado (Figura 54(c)), obteniendo un leve aumento de GMGox (2% a 4%) y del resto de las impurezas peptídicas (7% a 8%), manteniendo constantes el ^{68}Ga libre (2%) y el ^{68}Ga -coloide (1%), lo que ocasionó una leve disminución de GMG (88% a 85%). No obstante, se decidió continuar con los marcados a 100°C utilizando los dos antioxidantes (375 μL de L-metionina 13.4 mM y 40 μL de Buffer ASAG (1.14-0.18)), porque con esta combinación a tiempo inicial se obtuvo la menor cantidad de GMGox (2%) y del resto de impurezas peptídicas (6%), en tanto el ^{68}Ga libre (4%) y el ^{68}Ga -coloide (1%) podrían eliminarse fácilmente si se realizara una purificación por extracción en fase sólida al finalizar la marcación.

6.3.4.3. Masa de DOTA-H2-MG11

Luego de seleccionar las condiciones de marcado con la cantidad optimizada de los dos antioxidantes, se hizo necesario evaluar la posibilidad de disminuir la masa del precursor para conseguir una mayor actividad molar. Se observó que al utilizar NaOAc como agente estabilizante con el agregado de los dos antioxidantes (Buffer ASAG (1.14-0.18) + L-metionina 13.4 mM) se obtuvo una incorporación de $^{68}\text{Ga} \geq 96\%$ a partir de 2.4 nmol de precursor (Figura 55(a)). Se comparó con el estudio donde se utilizó sólo NaOAc, y en este se necesitó menos masa de precursor (1.2 nmol) para alcanzar una incorporación de $^{68}\text{Ga} \geq 96\%$. Eso puede deberse a que este último contiene menos competidores para el anillo DOTA del precursor, tales como el AG, potenciales impurezas metálicas provenientes del AG y la L-metionina, menor cantidad de NaOAc y un volumen de reacción menor que tal vez favorezca la marcación.

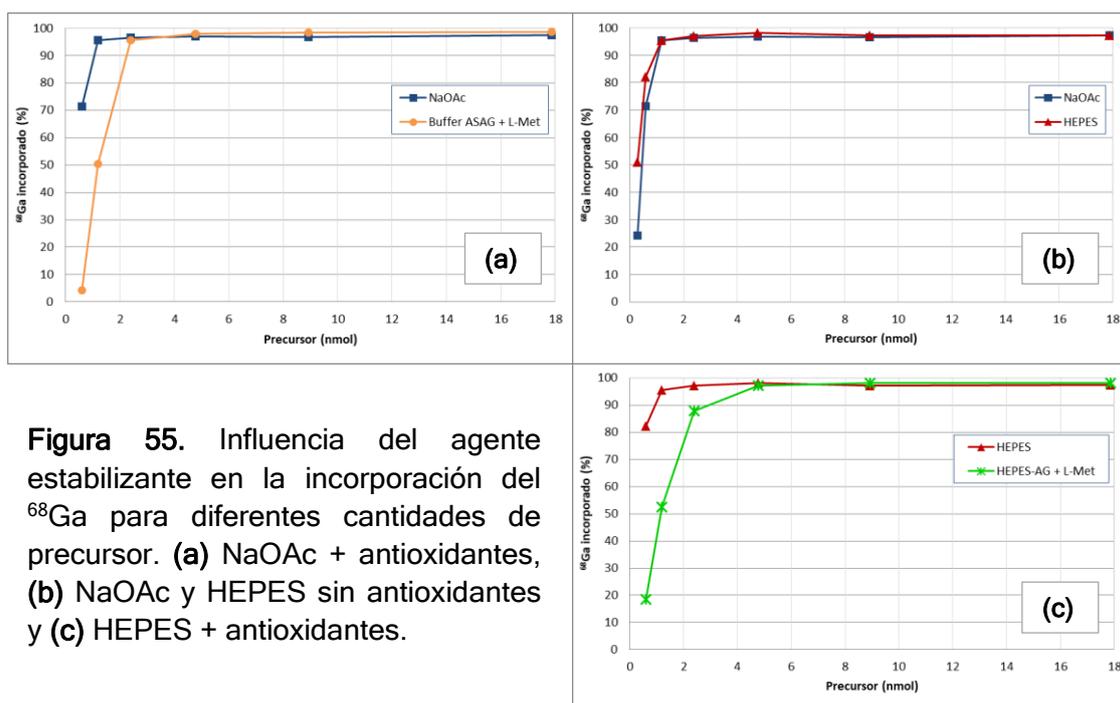


Figura 55. Influencia del agente estabilizante en la incorporación del ^{68}Ga para diferentes cantidades de precursor. (a) NaOAc + antioxidantes, (b) NaOAc y HEPES sin antioxidantes y (c) HEPES + antioxidantes.

Con la intención de ver cuánto más se podía disminuir la masa del precursor en la marcación, se cambió el agente estabilizante, sustituyendo el NaOAc por el HEPES que según bibliografía se han obtenido mejores rendimientos de incorporación de ^{68}Ga en DOTA-péptidos [79, 89]. Es así que se preparó una solución de HEPES 1.5 M de pH 5.5 y se determinó el volumen necesario para alcanzar un pH ~ 4 al mezclar con 500 μL de HCl 0.05 M. Se eligió utilizar un

volumen de 150 μL de HEPES para asegurar un pH adecuado de 4.0 en la marcación con 500 μL de eluido (Tabla 19).

Tabla 19. pH de la solución formada por 500 μL de HCl 0.05 M con distintos volúmenes de HEPES 1.5 M.

Volumen HEPES 1.5 M	250 μL	225 μL	200 μL	150 μL
pH	4.5	4.0-4.5	4.0-4.5	4.0

El cambio de HEPES por NaOAc no mejoró el rendimiento de marcación ya que se necesitó la misma masa de precursor (1.2 nmol) para alcanzar una incorporación de $^{68}\text{Ga} \geq 95\%$ (Figura 55(b)). La diferencia se presentó en las menores masas de precursor (0.6 y 0.3 nmol) donde se obtuvo mayor rendimiento para el HEPES. La incorporación de los dos antioxidantes a la marcación con HEPES a través del agregado de HEPES-AG (1.5-0.048) + L-metionina 13.4 mM, disminuyó el rendimiento de marcación ya que se necesitó mayor masa de precursor (4.8 nmol) para alcanzar una incorporación de $^{68}\text{Ga} \geq 97\%$ (Figura 55(c)). Probablemente debido a que contiene más competidores para el anillo DOTA (AG y potenciales impurezas metálicas provenientes del AG y la L-metionina) y un volumen de reacción mayor que pudiera desfavorecer la marcación.

Por lo tanto, el HEPES no mejoró los resultados obtenidos con el NaOAc. Además, el agregado a este último de las cantidades optimizadas de los dos antioxidantes (Buffer ASAG (1.14-0.18) + L-metionina 13.4 mM) no disminuyó mucho la incorporación del ^{68}Ga , permitiendo con estos resultados poder disminuir casi 4 veces la cantidad de precursor que se venía utilizando en las marcaciones.

6.3.4.4. Tiempo de marcación

El tiempo habitual en la marcación de DOTA-péptidos con ^{68}Ga es de 10 min, y en este caso se confirmó ese tiempo mínimo para la marcación a 100°C de manera de obtener una incorporación de ^{68}Ga del 97% (Figura 56). Un tiempo de 7 min produjo una incorporación menor (93%) y un tiempo de 15 min no logró aumentar la incorporación, la mantuvo en 97%, y lo único que logró fue

aumentar las impurezas peptídicas (de 8% a 11%). Con lo cual se continúa utilizando el tiempo de 10 min para el resto de las marcaciones.

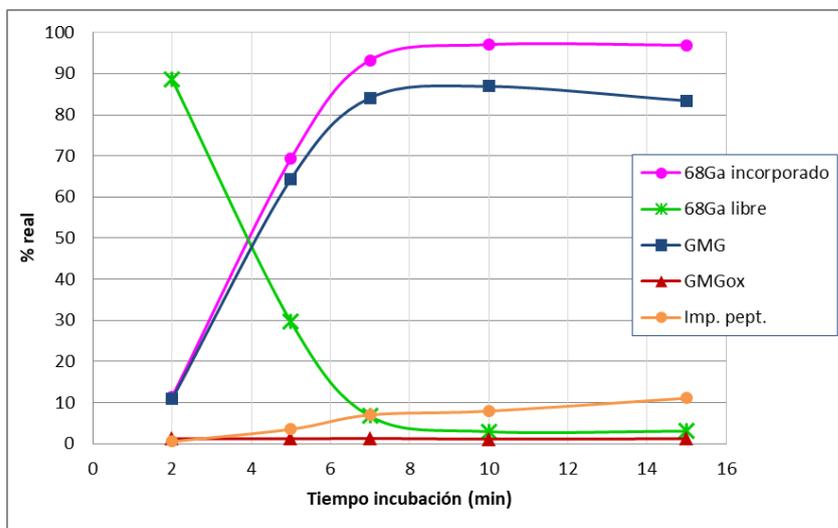


Figura 56. Incorporación del ⁶⁸Ga al DOTA-peptido (y especies presentes) a t = 0 según el tiempo de incubación a 100°C.

6.3.4.5. pH de marcación

En primer lugar se trazaron las curvas de la cantidad de moles agregados de HCl y NaOH que disminuyeron y aumentaron el pH, respectivamente, de la mezcla compuesta por 20 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) y 250 µL de HCl 0.05 M (Figura 57). A partir de estas se determinaron los moles necesarios de HCl para obtener valores de pH de 4.0, 3.5 y 3.0, y los necesarios de NaOH para obtener valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0. Se decidió utilizar HCl 2.0 M y NaOH 2.0 M para ajustar el pH de la mezcla compuesta por 40 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) y 500 µL de HCl 0.05 M, de esta manera el mayor volumen necesario para el ajuste fue de apenas 14.5 µL.

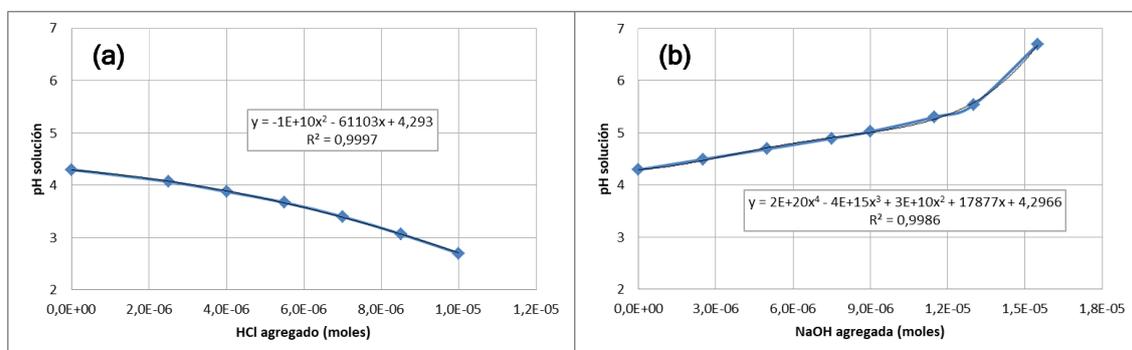


Figura 57. pH de la solución en función del agregado de: (a) HCl 0.5 M o (b) NaOH 0.5 M, a la mezcla de 20 µL de Buffer ASAG (1.14-0.18) y 250 µL de HCl 0.05 M.

La mayor incorporación de ^{68}Ga (98-97%) se obtuvo en el rango de pH 4.0-4.5, teniendo una leve disminución (95-94%) para pH menores (3.0-3.5) y otra muy notoria (92-46%) para pH mayores (5.0-6.0), según se observa en la Figura 58.

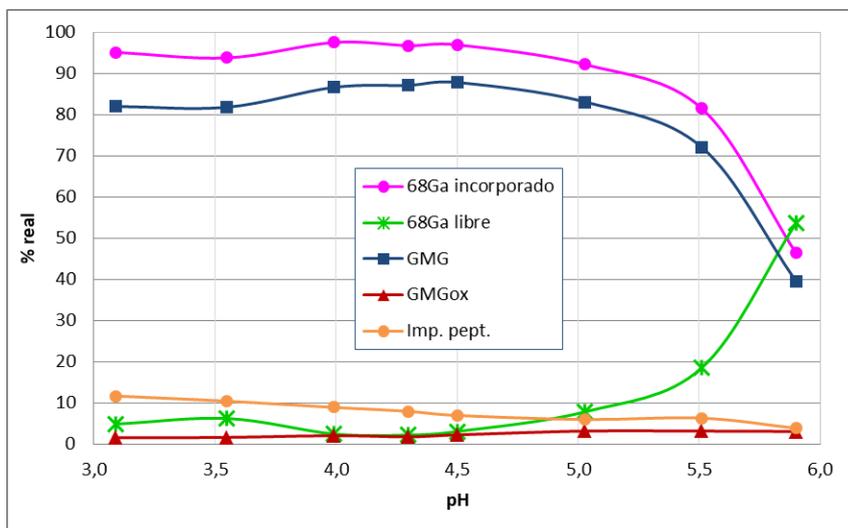


Figura 58. Incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido (y especies presentes) a $t = 0$ según el pH de la reacción.

La notoria disminución en la incorporación del ^{68}Ga a $\text{pH} > 4.5$ fue únicamente debida al aumento del ^{68}Ga libre, ya que no se detectó ^{68}Ga Ga-coloide. Esto podría deberse a la formación de la especie $[\text{Ga}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^- = [\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ a esos valores de pH (ver Figura 25), que no permita al ^{68}Ga formar complejos débiles con el NaOAc ni posteriormente incorporarlo al anillo DOTA. Un hecho que incitó la atención fue una leve y continua disminución de impurezas peptídicas detectadas al aumentar el pH de la reacción. Al comparar los marcados con una incorporación de ^{68}Ga mayor al 90%, desde pH 3.0 a 5.0, se observó una variación de estas impurezas (12% a 6%), en la que se destacó alguna impureza como la resaltada en la Figura 59 que no fue elucidada.

De manera que se continuó utilizando el rango de pH 4.0-4.5 para el resto de las marcaciones.

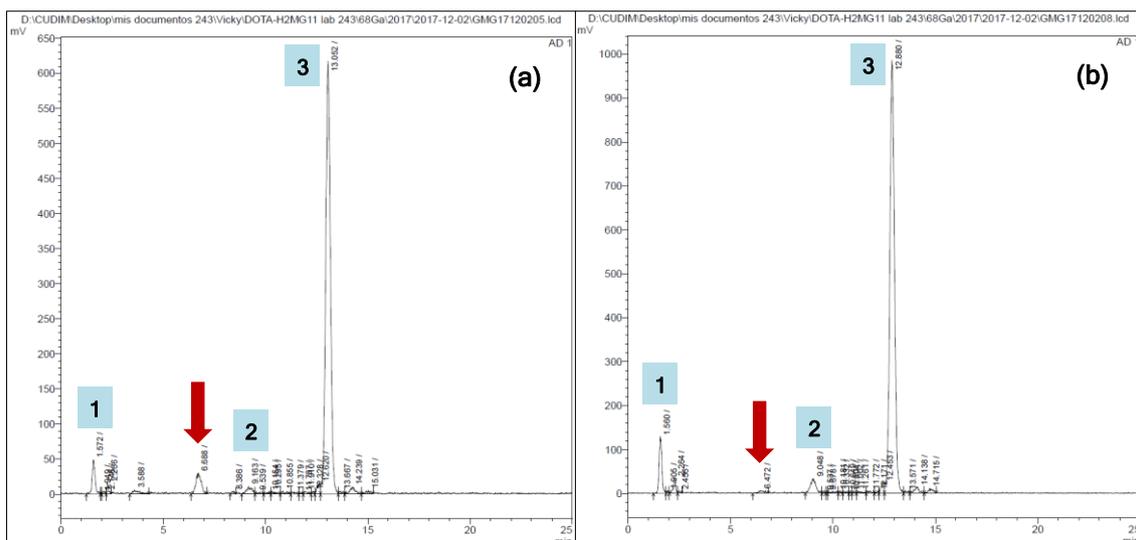


Figura 59. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) de los marcados realizados a distintos valores de pH: (a) 3.09 y (b) 5.03.

6.3.5. Optimización de la purificación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-H2-MG11}$

Los estudios realizados con el fin de optimizar la marcación del DOTA-H2-MG11 con ^{68}Ga permitieron aumentar la PRQ obtenida en las marcaciones iniciales y además mantenerla estable durante 2 h post-marcado. Sin embargo rara vez esta pudo superar el 90% por lo que se hizo necesario purificar el crudo de reacción.

Especulando con eliminar fácilmente el ^{68}Ga libre y el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-coloide}$, se purificó el marcado por extracción en fase sólida utilizando cartucho Sep-Pak C18 light y EtOH 50% para la elución del producto, repitiendo lo realizado en las marcaciones iniciales. De esta forma se eliminaron el ^{68}Ga libre junto con el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-coloide}$ (3% a 0%), se mantuvieron las impurezas peptídicas (6%), pero aumentó el GMGox (2% a 4%) con lo cual el GMG aumentó muy poco (89% a 91%) en la purificación (Figura 60). Además se tuvo una pérdida de actividad en el proceso, tanto por adsorción en distintos elementos (microtubo, cartucho y jeringa) como por el tiempo transcurrido (5-7 min), recuperando un 74% de la actividad corregida por decaimiento (dc: decay corrected).

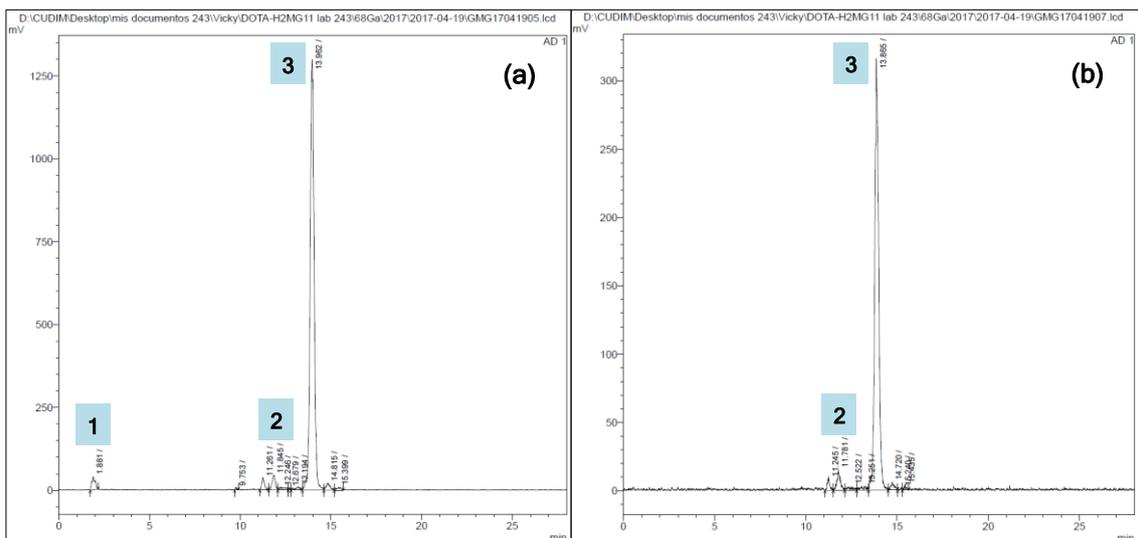


Figura 60. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado: **(a)** previo y **(b)** posterior a la purificación por Sep-Pak C18 light eluido con EtOH 50%.

Con el propósito de reducir la cantidad de impurezas peptídicas más hidrofílicas que el GMG (incluyendo el GMGox), se realizó un lavado previo a la elución utilizando EtOH de menor concentración para arrastrar las mismas. Se observó que al ir aumentando la concentración de EtOH del lavado (20% a 30%) se pudo aumentar la eliminación de las impurezas peptídicas más hidrofílicas, y así aumentar la PRQ, pero con el inconveniente de eliminar cada vez más parte del producto de interés con el lavado, disminuyendo bastante la actividad recuperada (Figura 61(a)).

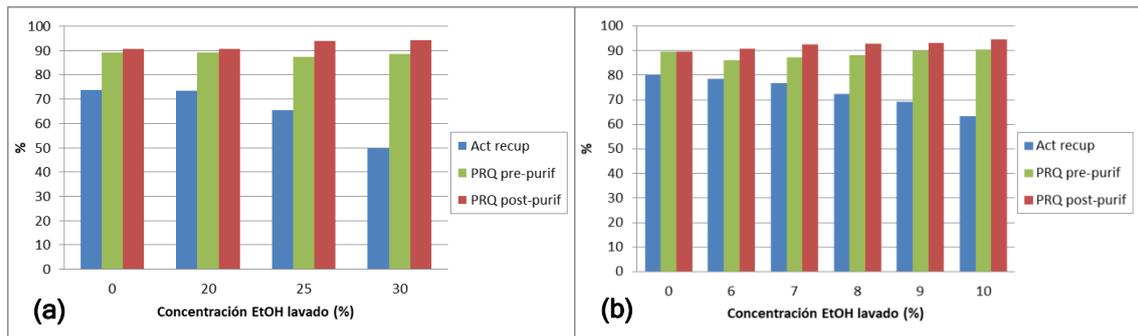


Figura 61. Actividad recuperada (dc) y Pureza Radioquímica obtenida previo y posterior a la purificación por extracción en fase sólida, en función de la concentración de EtOH utilizada para el lavado pre-elución del cartucho Sep-Pak: **(a)** C18 light eluido con EtOH 50% y **(b)** C8 light eluido con EtOH 30%.

El mejor resultado se obtuvo al utilizar EtOH 25% para el lavado pre-elución, ya que la PRQ aumentó de 88% a 94% con una actividad recuperada del 65% (dc). Este aumento del GMG fue debido a que en la purificación se eliminó el

^{68}Ga libre (3% a 0%), se disminuyeron las impurezas peptídicas (6% a 4%) y el GMGox (3% a 2%) (Figura 62), así como se mantuvo sin ^{68}Ga coloide.

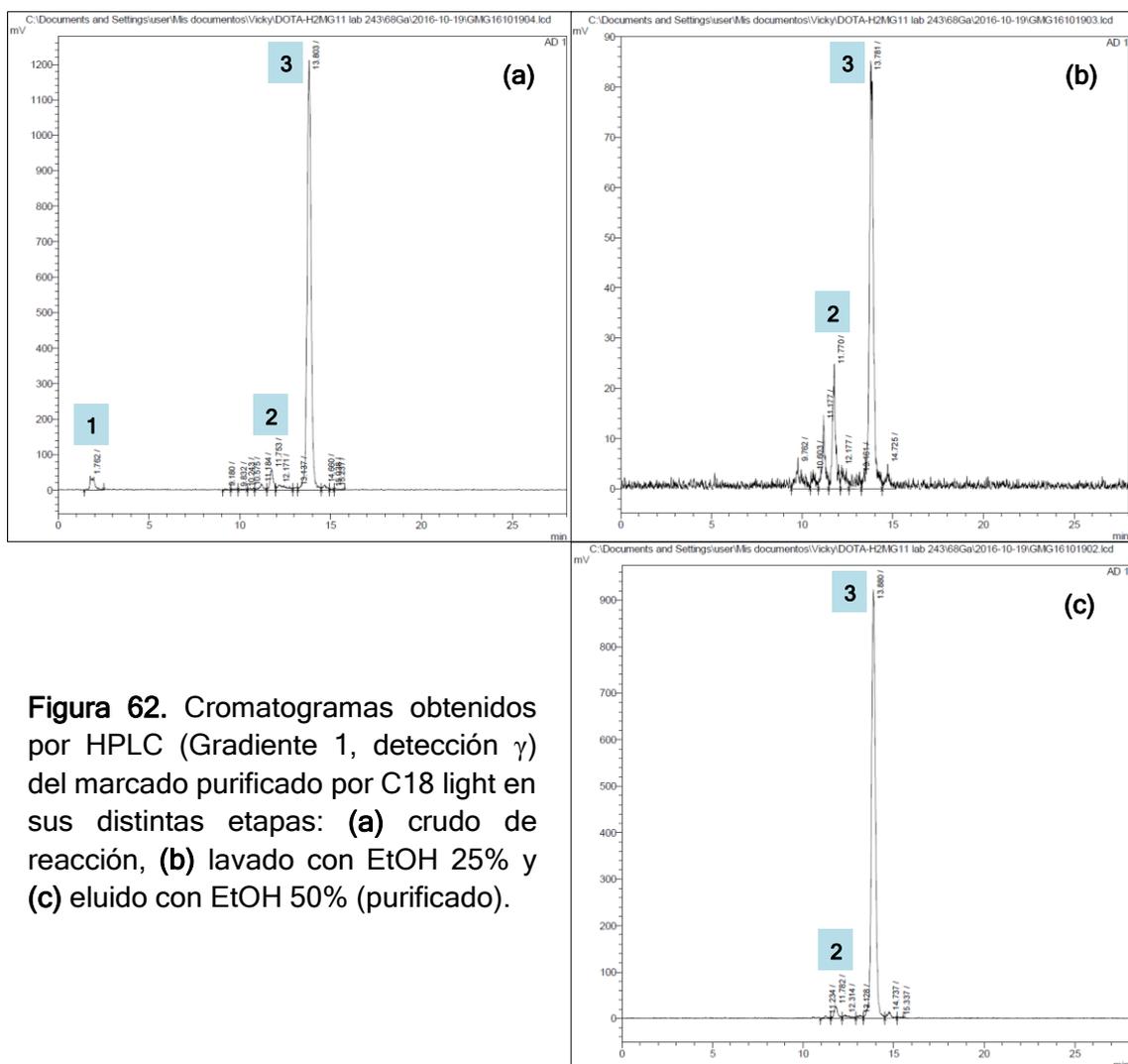


Figura 62. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado purificado por C18 light en sus distintas etapas: (a) crudo de reacción, (b) lavado con EtOH 25% y (c) eluido con EtOH 50% (purificado).

Con la idea de disminuir aún más las impurezas peptídicas más hidrofílicas que el producto, se cambió el cartucho C18 por el C8, ya que en teoría se retendrían menos los péptidos más hidrofílicos y sería más fácil arrastrarlos con EtOH diluido. En primer lugar se purificó el marcado por extracción en fase sólida utilizando cartucho Sep-Pak C8 light y EtOH 30% para la elución del producto, sin realizar ningún lavado previo a la elución. De esta forma se eliminó el ^{68}Ga libre (3% a 0%), se mantuvieron el GMGox (3%) y el ^{68}Ga coloide (0%), pero aumentaron las impurezas peptídicas (5% a 7%) con lo cual el GMG se mantuvo en 90% luego de la purificación. Además, también se tuvo una pérdida de actividad en el proceso, recuperando un 80% de la actividad (dc), lo que hace improductiva esta purificación sin lavado pre-elución.

Luego, al ir aumentando la concentración de EtOH del lavado (6% a 10%) se pudo aumentar la eliminación de las impurezas peptídicas más hidrofílicas, y así aumentar la PRQ, pero con el mismo inconveniente de eliminar cada vez más parte del producto de interés con el lavado, disminuyendo así la actividad recuperada (Figura 61(b)). El mejor resultado se obtuvo al utilizar EtOH 7% para el lavado pre-elución, ya que la PRQ aumentó de 87% a 93% con una actividad recuperada del 77% (dc). Este aumento del GMG fue debido a que en la purificación se eliminó el ^{68}Ga libre (3% a 0%), se disminuyó el GMGox (4% a 3%) y se mantuvieron las impurezas peptídicas (5%) (Figura 63), así como también el ^{68}Ga -coloide (0%).

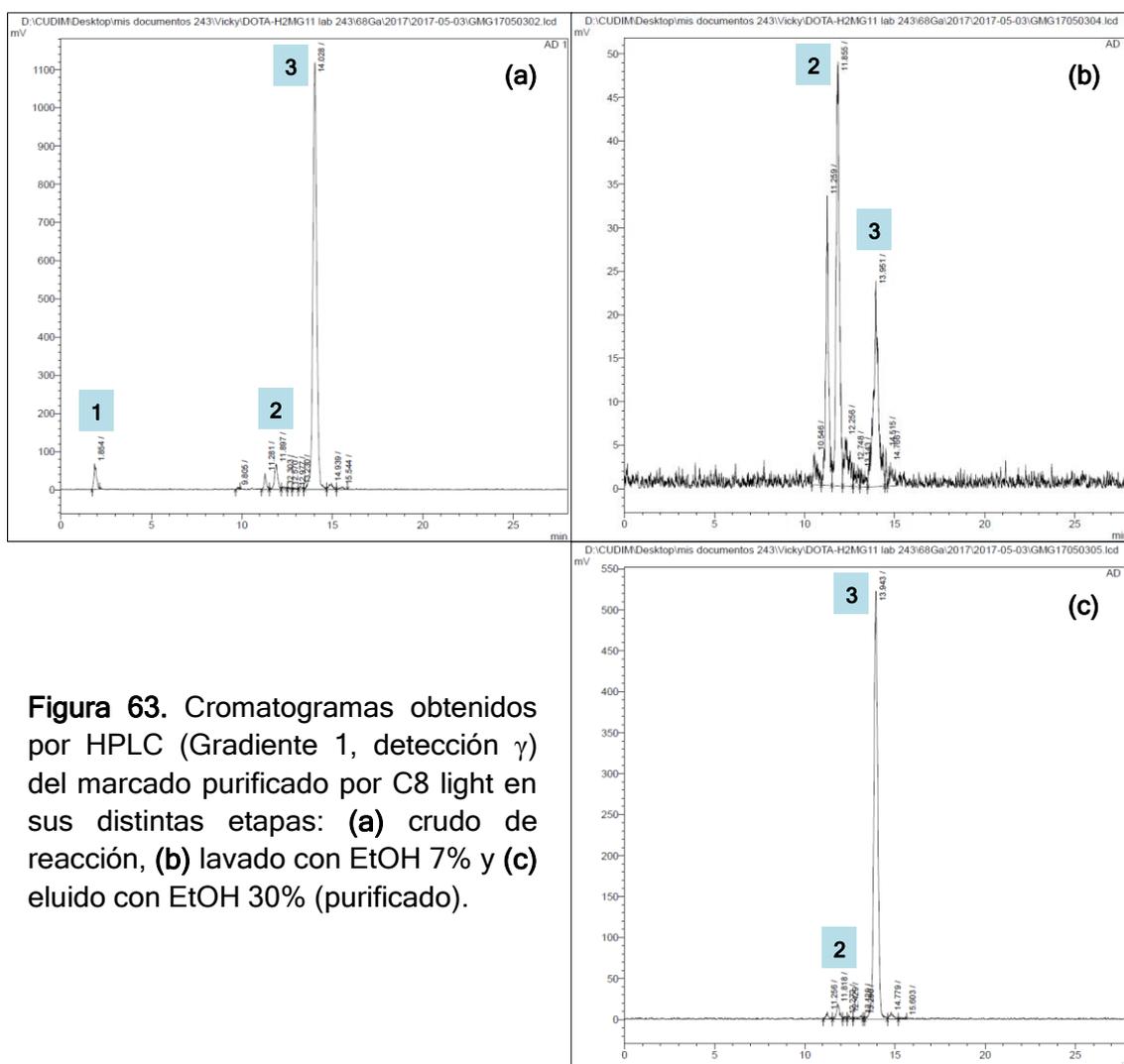


Figura 63. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado purificado por C8 light en sus distintas etapas: (a) crudo de reacción, (b) lavado con EtOH 7% y (c) eluido con EtOH 30% (purificado).

Por tanto, la purificación por Sep-Pak C8 light con lavado de EtOH 7% y elución del producto con EtOH 30% dio los mejores resultados, ya que se obtuvo una PRQ similar a la obtenida con el cartucho C18, pero con una mayor

recuperación de actividad. Además el menor contenido de EtOH en el purificado es otra ventaja, ya que se necesita de una menor dilución para formular el producto a ser inyectado por vía intravenosa en animales (EtOH \leq 10%), sin disminuir tanto la concentración de actividad. Por lo cual, este fue el método de purificación elegido para continuar con los estudios.

6.3.6. Preparación de impurezas marcadas con ^{68}Ga

6.3.6.1. Marcación de [^{68}Ga]Ga-DOTA

Todas las marcaciones realizadas produjeron un único pico en el HPLC que coincidió con el pico correspondiente al ^{68}Ga libre (Gradiente 1 con $t_R = 1.9$ min e Isocrático con $t_R = 1.5$ min), por lo que estos sistemas no sirvieron para determinar si el marcado se había producido. Sin embargo, la cromatografía en iTLC-SG con la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) permitió comprobar que el anillo DOTA se había marcado con éxito (Figura 64), ya que se obtuvo un único pico que se movió con el frente del solvente ($R_f = 1.0$), diferenciándose bien del ^{68}Ga libre y del [^{68}Ga]Ga-coloide que permanecen en el origen en este sistema ($R_f = 0.0$). En principio esta especie también podría diferenciarse de las moléculas GMG y GMGox, ya que estas presentan un $R_f = 0.7$.

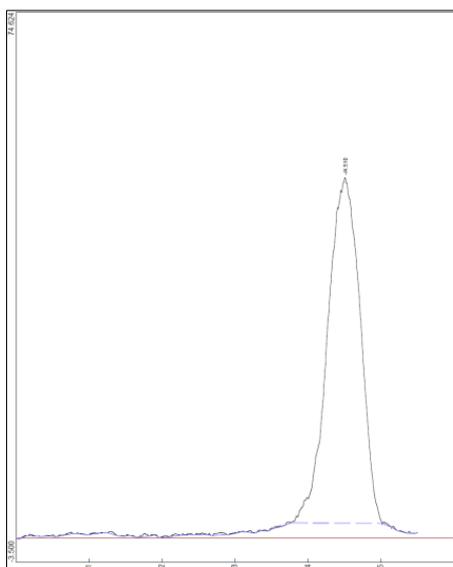


Figura 64. Cromatograma obtenido por iTLC-SG del marcado de DOTA con ^{68}Ga utilizando la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1), donde se observa una única especie que migra con el frente del solvente, con $t_R = 4.5$ ($R_f = 1.0$).

La cromatografía por iTLC-SG desarrollada en la fase móvil TFA 6% no sirvió para determinar que el marcado se había producido, ya que el [^{68}Ga]Ga-DOTA se movió con el frente del solvente ($R_f = 1.0$), al igual que lo hace el ^{68}Ga libre.

6.3.6.2. Oxidación de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11

La oxidación de GMG por calentamiento con H₂O₂ posterior al marcado se comprobó en el HPLC gracias al aumento del pico correspondiente a GMGox con t_R = 11.8 min (Figura 65(a) y (b)), que podría deberse a la oxidación del residuo de metionina a metionina sulfóxido, ya que la formación de metionina sulfona requeriría de condiciones de oxidación más fuertes [95].

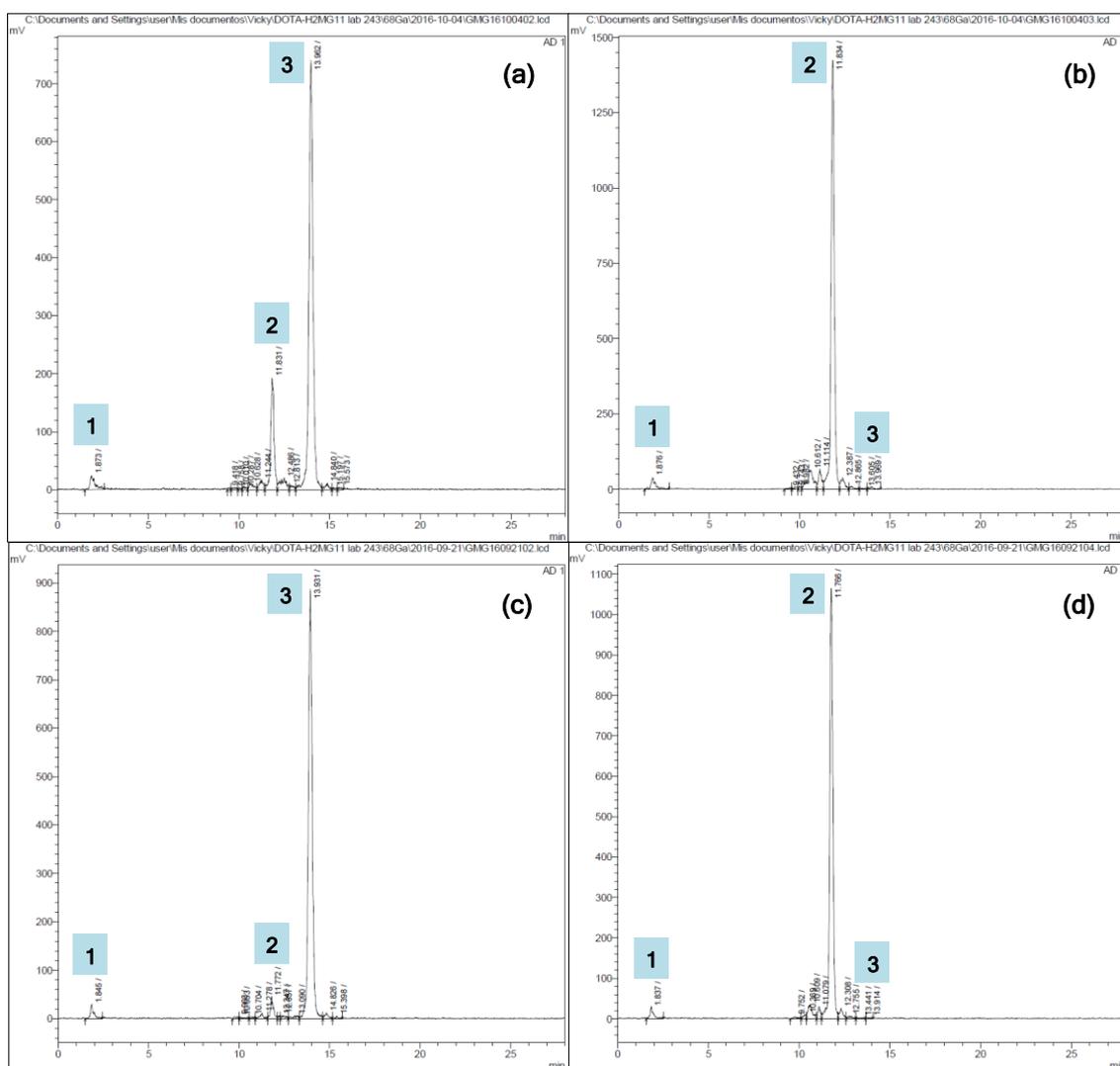


Figura 65. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) de: (a) marcado sin L-metionina a 92°C y (b) su oxidación posterior con H₂O₂ a 92°C; (c) marcado con L-metionina a 92°C y (d) su oxidación posterior con H₂O₂ a 92°C.

La marcación realizada sin L-metionina a 92°C, y su posterior oxidación en una segunda incubación a la misma temperatura produjo un aumento de GMGox (15% a 82%) y de las impurezas peptídicas (9% a 15%), en tanto no se obtuvo variación del ⁶⁸Ga libre (3%) ni del [⁶⁸Ga]Ga-coloide (0%). Mientras que el GMG

disminuyó desde 73% hasta casi desaparecer, puesto que aún se detectó un 1% al finalizar la oxidación (Figuras 65(a), 65(b) y 66). En tanto, la marcación realizada a la misma temperatura (92°C) pero en presencia de L-metionina, y su posterior oxidación en una segunda incubación a igual temperatura produjo mejores resultados. Se obtuvo una mayor cantidad de GMGox ya que aumentó de 3% a 87%, gracias a una menor cantidad de impurezas peptídicas iniciales (6%) que proporcionó una menor cantidad en la oxidación (10%). Mientras que se obtuvo poca variación del ^{68}Ga libre (3% a 2%) y del ^{68}Ga -coloide (1% a 0%), y casi se logró la desaparición de GMG (88% a 0.2%) (Figuras 65(c), 65(d) y 66).

Con la intención de oxidar por completo el GMG, se aumentó la temperatura a 100°C, tanto para la marcación en presencia de L-metionina como para su posterior oxidación con H_2O_2 . Esto logró lo deseado, ya que no se detectó GMG en la reacción de oxidación. Sin embargo, se obtuvo una menor cantidad de GMGox (79%) debido a un aumento de las impurezas peptídicas (17%) (Figura 66), conservando el ^{68}Ga libre (3%) y el ^{68}Ga -coloide (1%). Para simplificar la manipulación, ganar tiempo y actividad, y evitar posibles impurezas por el doble calentamiento se pensó en realizar la oxidación durante la marcación. Sorprendentemente, la marcación en presencia de L-metionina y H_2O_2 a 100°C fue exitosa, ya que no hubo variación en ^{68}Ga libre (3%) y ^{68}Ga -coloide (1%) y no se detectó GMG en el crudo de reacción. Además, se obtuvo un aumento de GMGox (85%) gracias a una disminución de las impurezas peptídicas (11%) por tener un único calentamiento (Figura 66). Por todo lo anterior, se eligió continuar con las oxidaciones durante la marcación.

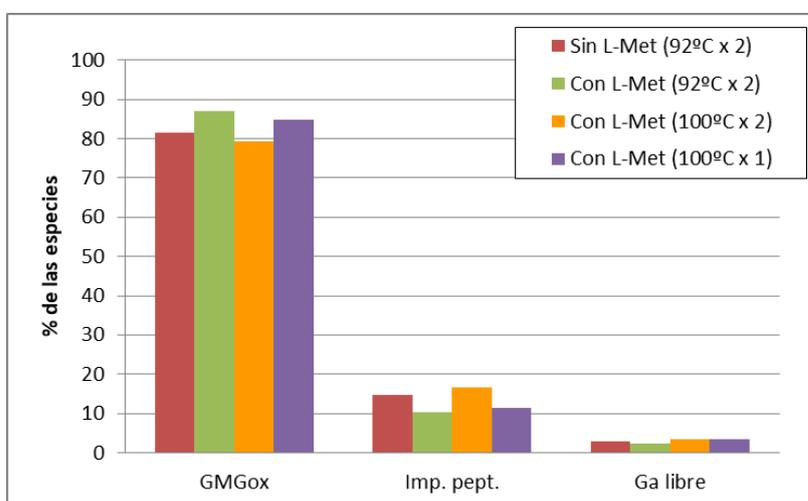


Figura 66. Influencia de las condiciones de oxidación con H_2O_2 para la obtención de GMGox.

Ninguna de las preparaciones logró conseguir una PRQ > 90% de GMGox, por lo que se hizo necesaria la purificación del crudo de reacción por extracción en fase sólida. Se utilizó el mismo cartucho Sep-Pak C8 light seleccionado en la purificación de GMG, porque este también retenía a la impureza oxidada, pero se necesitó seleccionar una concentración de EtOH de lavado < 7% (para arrastrar impurezas más hidrofílicas), previo a la elución del GMGox con EtOH 30%. Las dos oxidaciones durante la marcación fueron realizadas con menos precursor de lo habitual (2.4 vs. 8.9 nmol), pensando en los futuros estudios biológicos que requieren de una mayor actividad molar, y con HEPES como agente estabilizante porque era el que tenía mejores resultados en ese momento en los marcados. Esto dio como resultado una baja PRQ del GMGox (marcado-oxidado 1: 67% y marcado-oxidado 2: 61%) por aumento de ^{68}Ga libre e impurezas más hidrofílicas que el producto oxidado (Figura 67(a)).

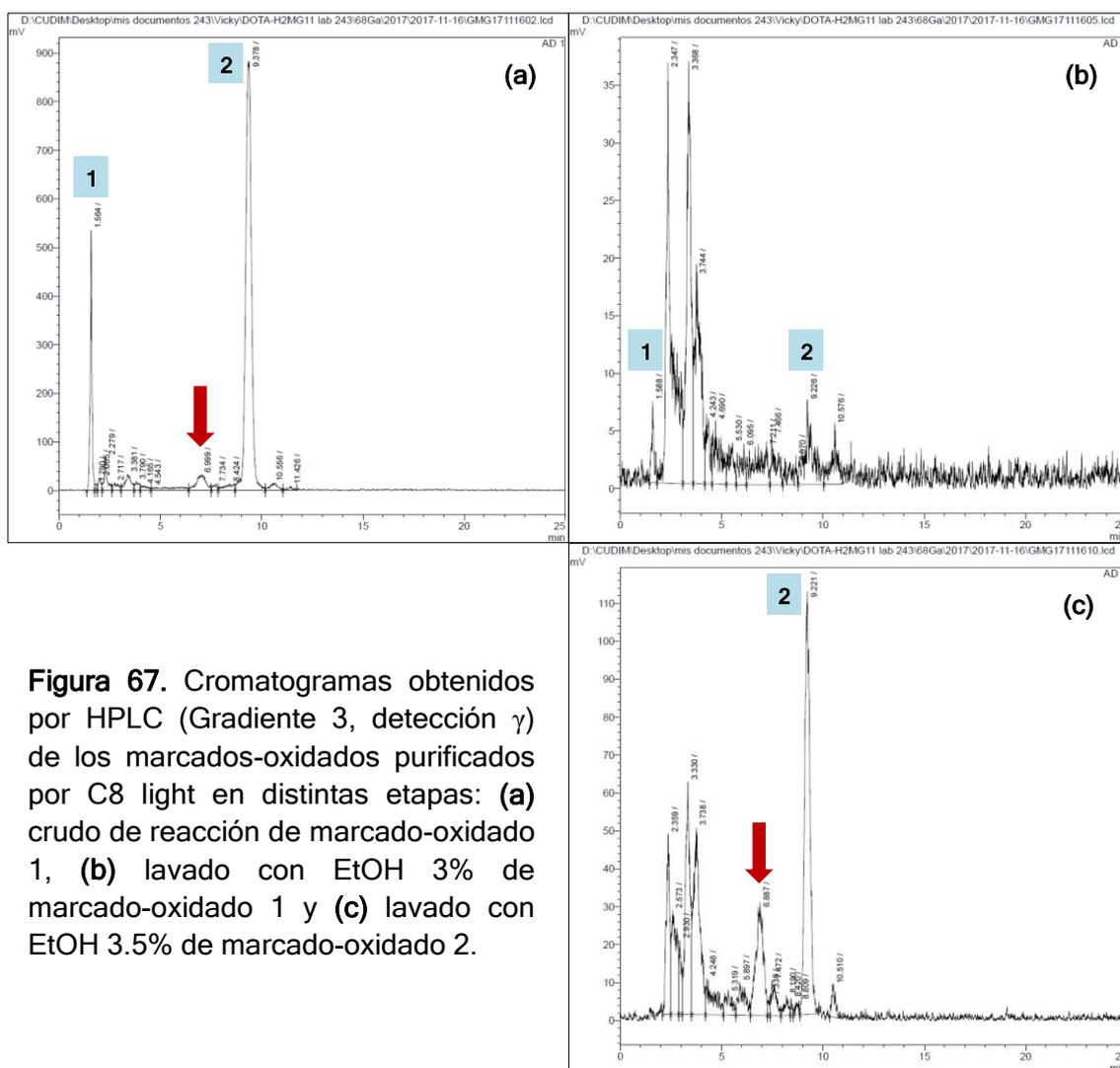


Figura 67. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) de los marcados-oxidados purificados por C8 light en distintas etapas: (a) crudo de reacción de marcado-oxidado 1, (b) lavado con EtOH 3% de marcado-oxidado 1 y (c) lavado con EtOH 3.5% de marcado-oxidado 2.

Estos malos resultados en la marcación con oxidación fueron propicios para seleccionar las mejores condiciones de purificación por Sep-Pak, ya que se podían detectar mejor las impurezas a separar del GMGox. Al marcado-oxidado 1 se le realizó un lavado con EtOH 3.0%, en el que se eliminaron algunas impurezas con $t_R < 4$ min (Figura 67(b)), con lo cual la PRQ se incrementó de 67% a 83% y se recuperó un 76% de la actividad (dc). Al marcado-oxidado 2 se le hizo un lavado con EtOH 3.5% que logró eliminar mayor cantidad de impurezas, incluyendo una bastante notoria con $t_R \sim 7$ min (Figura 67(c)). Esto hizo que la PRQ se incrementara de 61% a 79%, pero como también eliminó algo de GMGox la actividad recuperada fue algo menor (68% dc). De todas formas se eligió esta última concentración para el lavado ya que tenía la posibilidad de eliminar más impurezas, y la actividad recuperada podía ser suficiente para los futuros estudios biológicos.

La incorporación de los dos antioxidantes (ácido gentísico y L-metionina) durante la marcación con oxidación permitió obtener altas cantidades de GMGox con una baja cantidad de precursor (3.6 nmol), pero con distintos resultados dependiendo del agente estabilizante utilizado. Se obtuvo menor cantidad de GMGox al utilizar HEPES (70%) respecto a NaOAc (78%), debido a una mayor cantidad de impurezas peptídicas (19% vs. 14%) y ^{68}Ga libre (11% vs. 8%) (Figuras 68(a), 68(b) y 69), sin lograr detectar [^{68}Ga]Ga-coloide en ninguno de ellos. La purificación por Sep-Pak C8 light del marcado-oxidado en NaOAc con antioxidantes, logró incrementar a 90% la PRQ del GMGox (Figuras 68(b), 68(c) y 69) gracias a una disminución de las impurezas peptídicas (10%) y del ^{68}Ga libre (< 1%). En tanto la actividad recuperada luego de la purificación fue de 68% (dc), por lo que se seleccionaron estas condiciones para la obtención de GMGox a utilizar en los próximos ensayos biológicos.

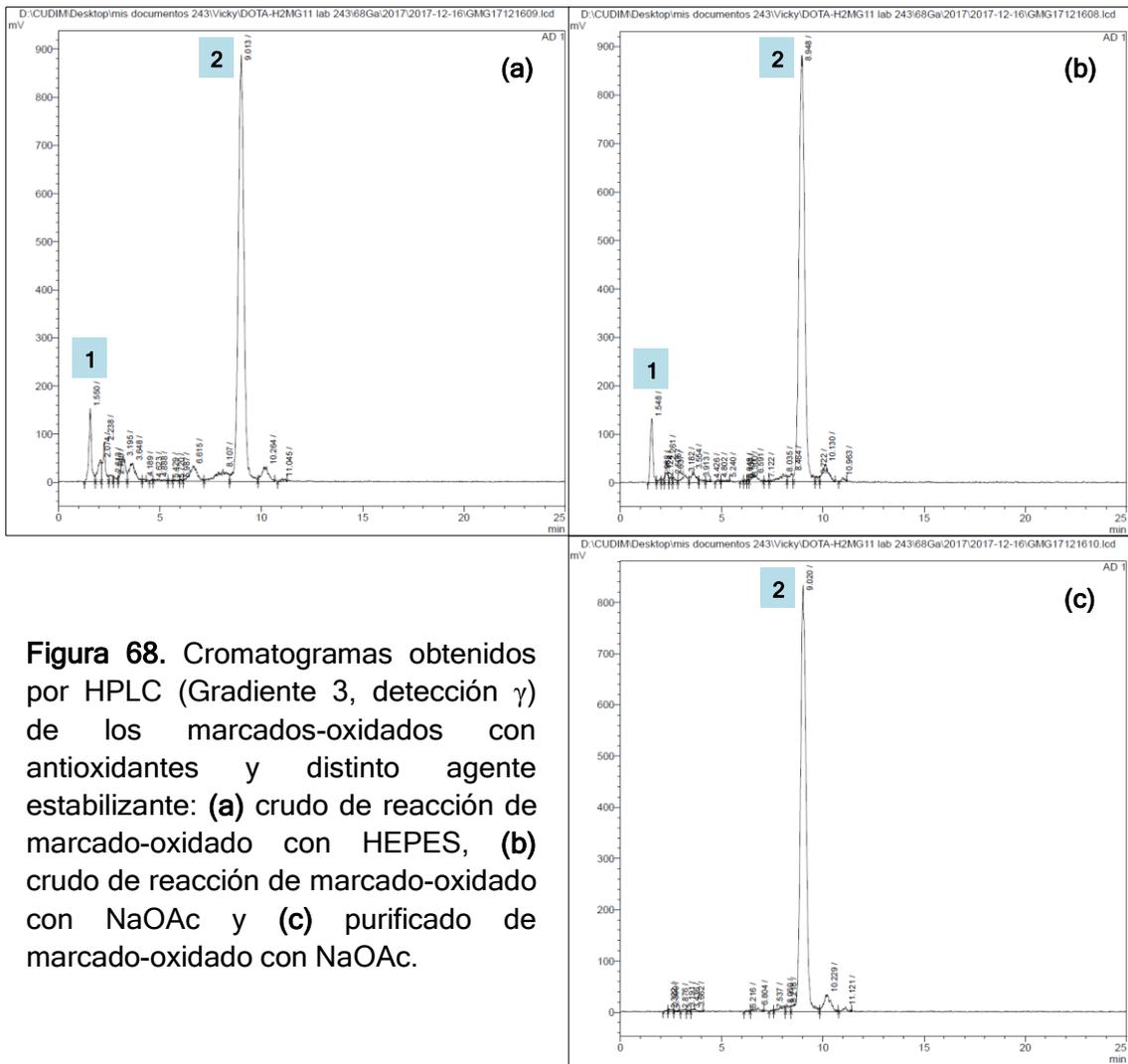


Figura 68. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) de los marcados-oxidados con antioxidantes y distinto agente estabilizante: (a) crudo de reacción de marcado-oxidado con HEPES, (b) crudo de reacción de marcado-oxidado con NaOAc y (c) purificado de marcado-oxidado con NaOAc.

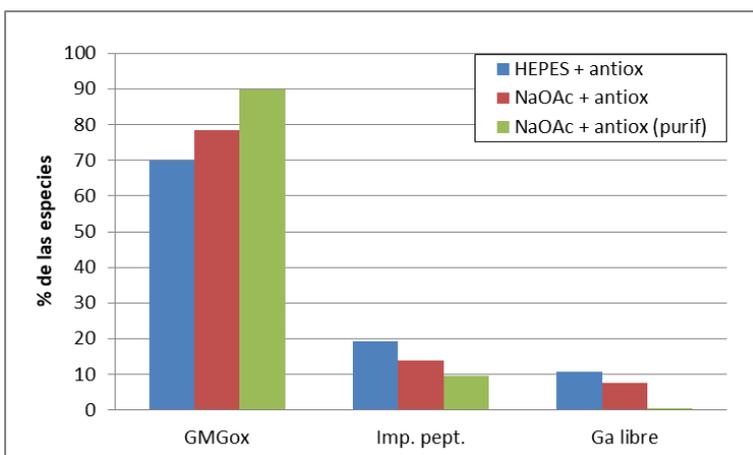


Figura 69. Influencia del agente estabilizante en los marcados-oxidados con antioxidantes para la obtención de GMGox, y la mejora post-purificación.

6.3.7. Estudios biológicos primarios

6.3.7.1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos biológicos *in vitro* con células AR42J que expresan el receptor CCK2, se realizaron en primer lugar para determinar si el trazador obtenido [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11 tenía la capacidad de asociarse a las células de forma específica, es decir, de unirse a la membrana celular e internalizarse, por tratarse de un péptido agonista del receptor. La GMG purificada utilizada en los 3 ensayos tuvo una PRQ de $(92 \pm 2)\%$ y una A_m estimada calculada al inicio de la incubación con las células de 11 ± 3 MBq/nmol. La actividad obtenida en los pozos no bloqueados fue significativamente mayor a la actividad de los pozos bloqueados ($p < 0.05$), tanto para la fracción unida a la membrana celular como para la fracción internalizada. Con lo cual, la unión a membrana del radiotrazador dio una captación no específica de $(0.3 \pm 0.1)\%$ y una captación específica de $(7.0 \pm 0.8)\%$. En tanto, la internalización de GMG en las células dio una captación no específica de $(0.07 \pm 0.01)\%$ y una captación específica de $(2.9 \pm 0.9)\%$, siendo todos los porcentajes referidos a la actividad total añadida a las células (Figura 70, izquierda). Estos valores fueron comparables a los publicados con péptidos análogos marcados con ¹¹¹In [96], lo que reveló una interacción específica de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-H2-MG11 con los CCK2R.

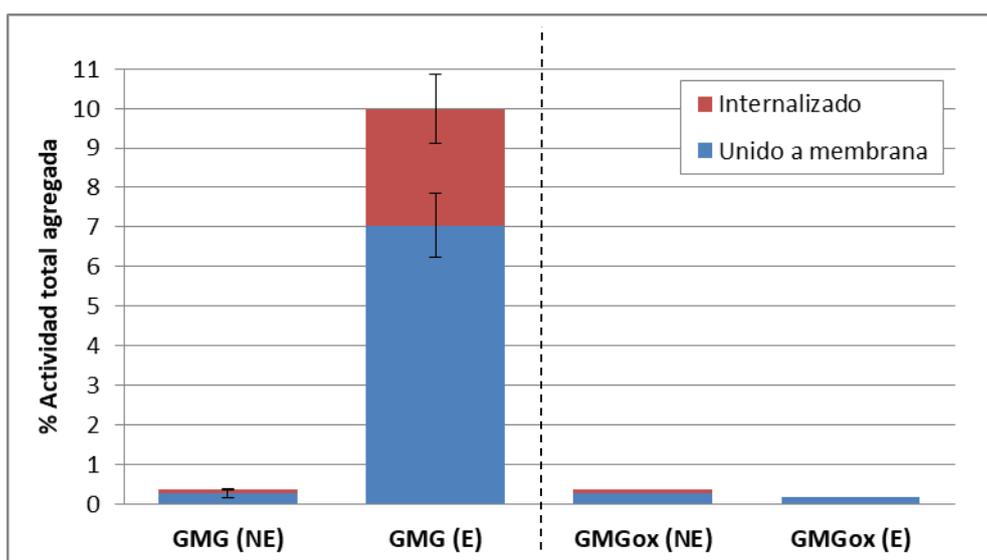


Figura 70. Porcentaje de los radiotrazadores unidos a membrana o internalizados por las células AR42J, respecto a la actividad total agregada. **Izquierda:** GMG no específico (NE) y específico (E), $n = 3$. **Derecha:** GMGox no específico (NE) y específico (E), $n = 1$.

En la bibliografía se encontraron resultados contradictorios sobre la interacción de la principal impureza oxidada (GMGox) con el receptor CCK2, por un lado se afirmaba que la oxidación del residuo de metionina no afectaba la capacidad de unión al receptor [64], y por otro lado que esta capacidad disminuía [68, 69]. Fue por esto que en segundo lugar se realizó un ensayo preliminar de unión e internalización a células AR42J con esta impureza oxidada. El GMGox purificado utilizado en el único ensayo realizado tuvo una PRQ de 88% y una A_m estimada calculada al inicio de la incubación con las células de 11 MBq/nmol. Este estudio mostró niveles muy bajos de captación respecto a la actividad total empleada por pozo, aunque para la fracción unida a la membrana celular, la actividad obtenida en los pozos no bloqueados fue significativamente mayor a la actividad de los pozos bloqueados ($p < 0.05$). Con lo cual, la unión a membrana del radiotrazador dio una captación no específica de 0.3% y una captación específica de 0.2% (Figura 70, derecha). En tanto para la fracción internalizada, la actividad obtenida en los pozos no bloqueados fue estadísticamente similar a la actividad de los pozos bloqueados ($p > 0.05$). El valor de la captación no específica para la internalización de GMGox fue de 0.1%, arrojando un valor nulo para la captación específica, con lo cual no habría internalización específica de esta impureza. La comparación de estos valores con los obtenidos para GMG, mostró una reducción en la interacción de la impureza oxidada por CCK2R, pero para confirmarlo se necesitaría realizar un mayor número ensayos.

6.3.7.2. Ensayos *in vivo*

Los primeros ensayos biológicos *in vivo* en ratones Nude portadores de tumor xenográfico generado con células AR42J, se realizaron para determinar el tiempo óptimo de adquisición de imágenes PET/CT con el radiotrazador obtenido [^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11. El GMG purificado utilizado en los ensayos tuvo una PRQ de $(89 \pm 1)\%$ y una A_m estimada calculada a la hora de inyección de los ratones de 2-7 MBq/nmol. Se obtuvo captación del radiotrazador en el tumor desde la primera hora de adquisición (0-1 h p.i.), pero el mayor contraste se consiguió en las imágenes obtenidas en la segunda hora de adquisición (1-2 h p.i.), al disminuir más la actividad de fondo (Figura 71). Esto se evidenció al comparar la relación T/NT de los VOIs construidos, ya que en la primera hora el

valor obtenido fue de 2.0 ± 0.3 y en la segunda hora de 3.2 ± 0.5 ($n = 4$), siendo el segundo valor significativamente mayor al primero ($p < 0.05$).

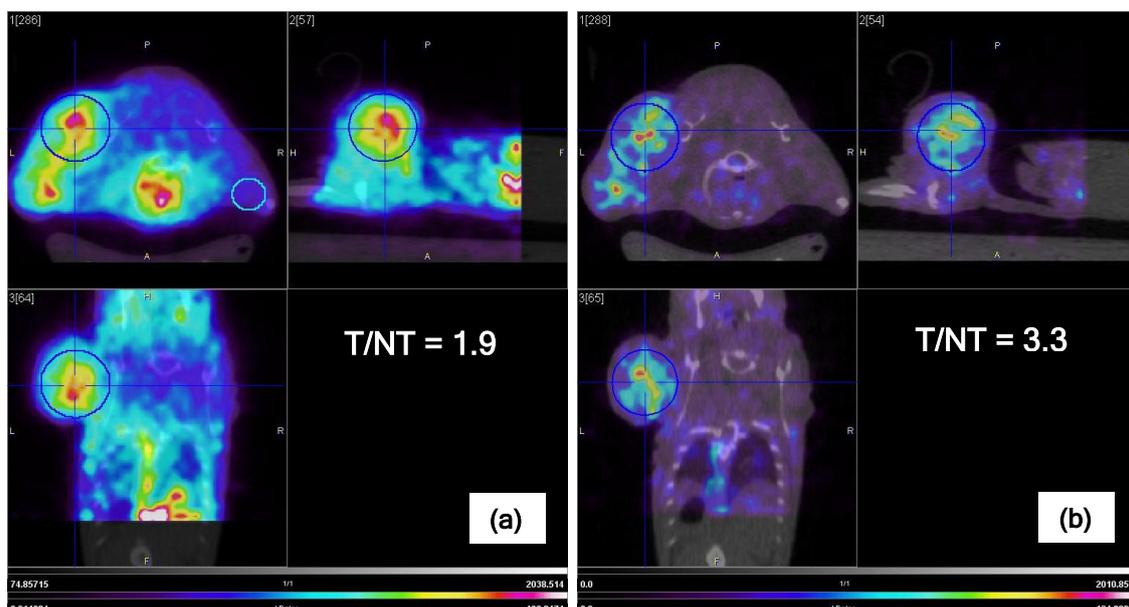


Figura 71. Imágenes PET/CT de ratón portador de tumor xenográfico a distintos tiempos de adquisición post-inyección de 11.5 MBq de GMG con PRQ = 90% y $A_m = 6.0$ MBq/nmol: **(a)** 0-1 h y **(b)** 1-2 h.

Estos resultados llevaron a planificar las siguientes imágenes con adquisición de 30 min en un único frame, en el tiempo de 1.5-2.0 h p.i., de manera de optimizar el tiempo bajo cámara y aun así poder conseguir una buena relación T/NT.

Como segundo ensayo biológico *in vivo* se realizaron estudios de biodistribución en ratones sanos (Swiss) y ratones portadores de tumor xenográfico (Nude), puesto que estos permiten determinar las principales vías metabólicas y de eliminación del radiotrazador, cuantificar la actividad captada por el tumor y establecer si existe captación por otros órganos o tejidos. Los resultados presentaron gran variabilidad debido a que fue bastante complicado reproducir las mismas condiciones de PRQ y A_m del radiotrazador, actividad inyectada y tamaño de tumor. Por lo cual, los datos presentados a continuación son los obtenidos luego de ser depurados. El radiotrazador GMG luego de purificado ($n = 5$) tuvo una PRQ de $(85 \pm 6)\%$, debido a la presencia de GMGox $(10 \pm 6)\%$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -coloide $(4 \pm 1)\%$ y otras impurezas peptídicas $(1 \pm 2)\%$. Por lo cual, la A_m estimada calculada a la hora de inyección de los ratones fue

de 4.6 ± 0.5 MBq/nmol ($n = 17$). Los niveles de actividad inyectados (Tabla 20) permitieron obtener un conteo adecuado de órganos y tejidos para cada tiempo.

Tabla 20. Actividad y A_m de GMG inyectadas para el ensayo de biodistribución a distintos tiempos para ratones sanos (Swiss) y con tumor (Nude).

Tiempo BD (h)	Ratones Swiss			Ratones Nude con tumor		
	Actividad (MBq)	A_m (MBq/nmol)	n	Actividad (MBq)	A_m (MBq/nmol)	n
0.5	1.7 ± 0.2	4.9 ± 0.5	3	2.0 ± 0.3	4.1 ± 0.3	3
1.0	2.3 ± 0.4	4.9 ± 0.8	3	3.2 ± 0.8	4.4 ± 0.2	4
2.5	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.5	2	5.5 ± 1.7	5.1 ± 0.5	2

Los ratones sanos (Swiss) fueron utilizados como grupo control de la biodistribución del radiotrazador GMG. En ellos se obtuvo una rápida eliminación sanguínea desde las 0.5 h (2.9 ± 0.6)% DI, y una muy baja captación en hígado y tracto intestinal, obteniendo (1.0 ± 0.1)% DI y (0.6 ± 0.2)% DI a las 0.5 h respectivamente, sin mucha variación hasta las 2.5 h (Figura 72(a)). Además, se observó una alta excreción urinaria desde las 0.5 h (79.9 ± 0.4)% DI alcanzando el (90.5 ± 1.2)% DI a las 2.5 h, lo que se ajusta al comportamiento que presentan los pequeños péptidos radiomarcados [28].

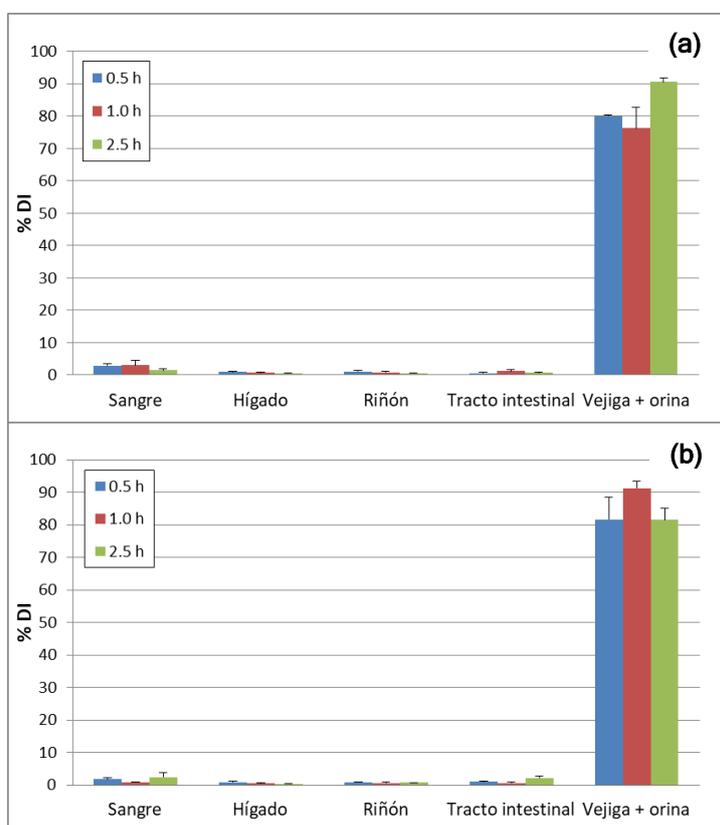


Figura 72. Perfil de eliminación de GMG (%DI) para distintos tiempos de BD en ratones: (a) sanos y (b) portadores de tumor xenográfico.

Un parámetro importante a considerar en los radiopéptidos análogos de minigastrina es la captación renal; favorablemente para GMG se obtuvo un valor bajo en todo momento, desde $(1.1 \pm 0.3)\%$ DI a las 0.5 h hasta $(0.6 \pm 0.1)\%$ DI a las 2.5 h, lo que concuerda con el comportamiento reportado para este mismo péptido marcado con ^{111}In [68]. A pesar de que los ratones portadores de tumor son inmunodeficientes, estos presentaron un perfil de eliminación muy similar a los animales sanos (Figura 72(b)), por lo que el modelo tumoral no modificaría la eliminación del radiotrazador. Todos los órganos y tejidos tuvieron una muy baja acumulación de actividad por gramo ($< 2.5\%$ DI/g), y además muy similar entre los ratones sanos y los portadores de tumor (Tabla 21 y Figura 73), por lo que el modelo tumoral tampoco modificaría la captación del radiotrazador. Esta baja captación en órganos y tejidos no blanco, permitiría generar una relación T/NT adecuada y así obtener una mejor calidad de imagen, además de reducir la irradiación de tejidos sanos.

Tabla 21. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) para distintos tiempos de BD en ratones sanos (Swiss) y portadores de tumor (Nude).

Órgano, tejido o fluido	Ratones Swiss			Ratones Nude con tumor		
	0.5 h (n = 3)	1.0 h (n = 3)	2.5 h (n = 2)	0.5 h (n = 3)	1.0 h (n = 4)	2.5 h (n = 2)
Sangre	1.31 ± 0.23	1.65 ± 0.94	0.79 ± 0.27	1.17 ± 0.35	0.50 ± 0.08	1.52 ± 0.86
Hígado	0.63 ± 0.07	0.55 ± 0.18	0.51 ± 0.11	0.67 ± 0.20	0.39 ± 0.02	0.34 ± 0.04
Corazón	0.60 ± 0.18	0.34 ± 0.05	0.27 ± 0.13	0.38 ± 0.05	0.21 ± 0.07	0.23 ± 0.04
Pulmón	0.97 ± 0.09	0.89 ± 0.41	0.50 ± 0.08	0.80 ± 0.12	0.48 ± 0.08	0.37 ± 0.06
Bazo	0.48 ± 0.03	0.47 ± 0.44	0.26 ± 0.12	0.28 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.08
Riñón	2.46 ± 0.70	2.13 ± 0.69	1.63 ± 0.45	2.40 ± 0.49	1.63 ± 0.79	1.59 ± 0.18
Tiroides	0.56 ± 0.08	0.32 ± 0.09	0.36 ± 0.11	0.46 ± 0.17	0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.16
Músculo	0.22 ± 0.04	0.33 ± 0.23	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0.05 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Hueso	0.36 ± 0.07	0.44 ± 0.28	0.29 ± 0.10	0.24 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.29 ± 0.05
Estómago	0.32 ± 0.14	0.36 ± 0.13	0.22 ± 0.00	0.31 ± 0.18	0.15 ± 0.11	0.44 ± 0.36
Ves. biliar	0.56 ± 0.48	0.85 ± 1.12	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.08	0.18 ± 0.15	0.20 ± 0.03
T.intestinal	0.31 ± 0.09	0.70 ± 0.30	0.49 ± 0.12	0.43 ± 0.16	0.28 ± 0.13	0.99 ± 0.32
Páncreas	0.36 ± 0.14	0.32 ± 0.13	0.30 ± 0.18	0.37 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.13 ± 0.07
Tumor	-	-	-	0.78 ± 0.16	0.50 ± 0.11	0.58 ± 0.08

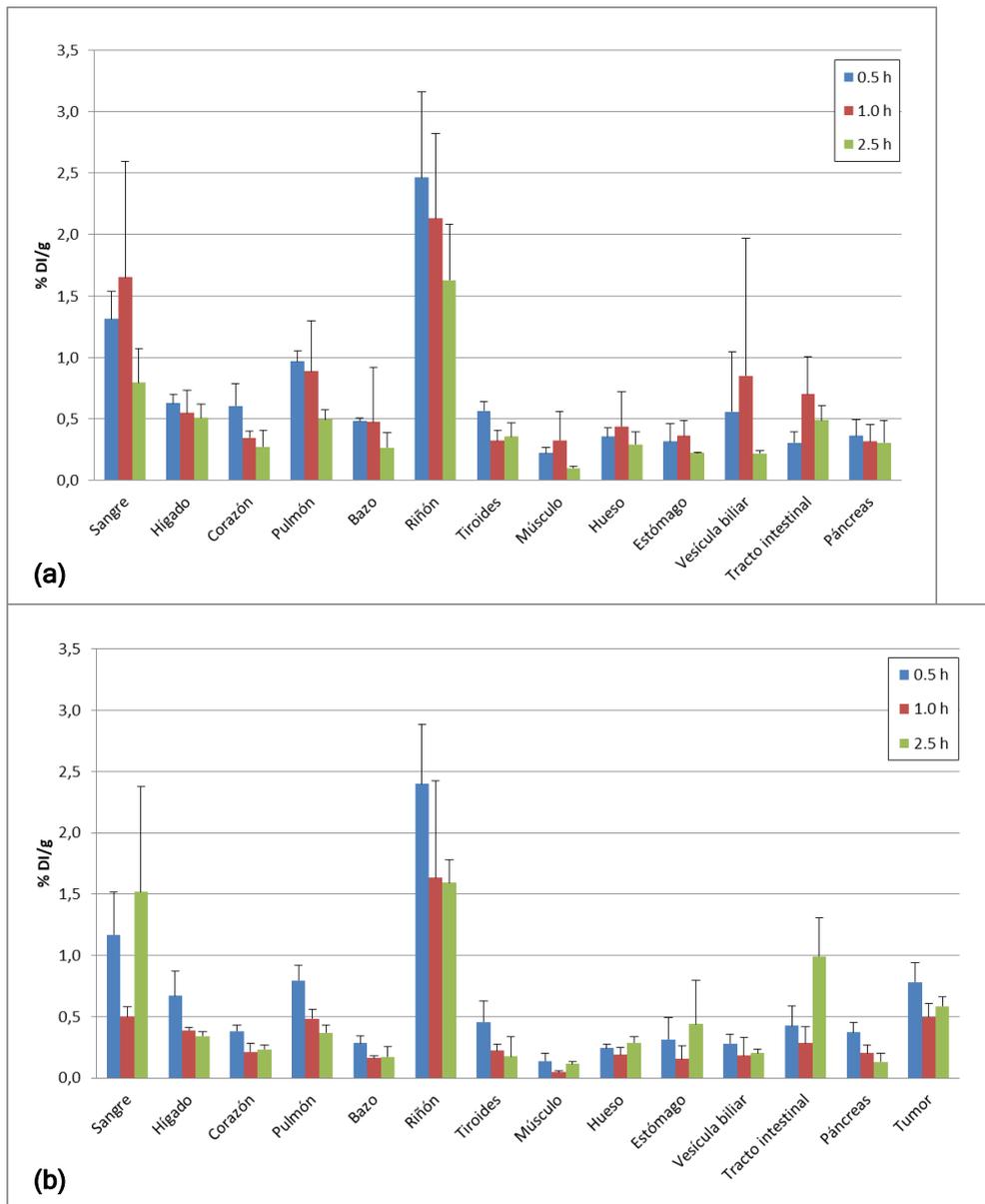


Figura 73. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) para distintos tiempos de BD de GMG en ratones: **(a)** sanos (Swiss) y **(b)** portadores de tumor (Nude).

El volumen tumoral medido el día del ensayo, a los 20-22 días post-inoculación de las células AR42J (2.5×10^6), fue de (1.9 ± 0.9) mL ($n = 9$). La actividad acumulada por gramo de tumor desde 0.5 h a 2.5 h fue de $(0.78 \pm 0.16)\%$ DI/g a $(0.58 \pm 0.08)\%$ DI/g respectivamente, lo que no parecería ser un valor muy auspicioso, pero si se compara con la actividad acumulada por gramo de músculo, tomado como órgano sano de referencia, se obtiene una actividad significativamente mayor en tumor que en músculo para los 3 tiempos de BD ($p < 0.05$). Con estos valores se calculó la relación T/NT (tumor/músculo), que resultó en 6.1 ± 1.8 (0.5 h), 11.6 ± 3.7 (1.0 h) y 5.2 ± 0.4 (2.5 h). Estos valores

de T/NT fueron muy favorables pero presentaron un desvío bastante alto, además llama la atención el valor tan alto al tiempo de 1.0 h p.i., por lo que sería necesario repetir el ensayo con un número mayor de animales para determinar esta relación con mayor certeza.

Las imágenes presentaron mucha variabilidad, incluso en los 2 ratones con similares características del radiotrazador (PRQ y A_m estimada a la hora de inyección) no se logró obtener similares tamaños tumorales ni actividades inyectadas (Figura 74). Esto se evidenció al calcular la relación T/NT (tumor/músculo) de los VOIs construidos para ambas imágenes, obteniendo un valor de 3.1 para el ratón con menor actividad de GMG inyectada y menor volumen tumoral (Figura 74(a)), y un valor de 5.7 para el ratón con mayor actividad de GMG inyectada y mayor volumen tumoral (Figura 74(b)). El valor promedio de 4.4 ± 1.9 ($n = 2$), presentó un esperable alto desvío, por lo que sería necesario repetir el ensayo con un número mayor de animales que presenten condiciones más similares y una PRQ de GMG > 90%.

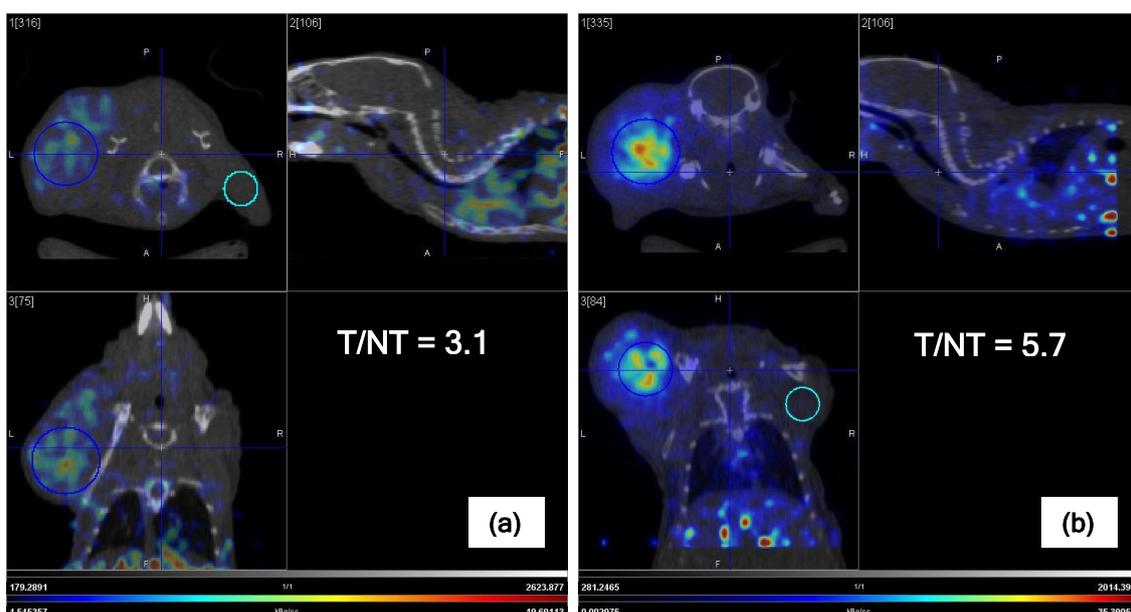


Figura 74. Imágenes PET/CT de ratones portadores de tumor xenogénico con tiempo de adquisición de 1.5-2.0 h post-inyección de GMG: **(a)** 4.3 MBq con PRQ = 89% y A_m = 4.8 MBq/nmol, volumen tumoral = 1.3 mL y **(b)** 6.7 MBq con PRQ = 88% y A_m = 5.5 MBq/nmol, volumen tumoral = 3.6 mL.

Por último, con el fin de comparar el comportamiento *in vivo* del radiotrazador de interés [^{68}Ga]Ga-DOTA-H2-MG11 con la principal impureza obtenida en la marcación (correspondiente a la oxidación del residuo de metionina), se

realizaron imágenes PET/CT de ambos, en cada uno de los 4 ratones Nude portadores de tumor xenográfico. El radiotrazador GMG luego de purificado tuvo una PRQ de $(93.4 \pm 0.1)\%$ debido a la presencia de GMGox $(0.9 \pm 0.1)\%$ y otras impurezas peptídicas $(5.8 \pm 0.2)\%$, por lo cual, la A_m estimada calculada a la hora de inyección de los ratones fue de (5.6 ± 1.6) MBq/nmol. El segundo radiotrazador GMGox luego de purificado tuvo una PRQ de $(87.2 \pm 1.2)\%$ debido a la presencia de ^{68}Ga libre $(0.2 \pm 0.0)\%$ y otras impurezas peptídicas $(12.7 \pm 1.2)\%$, calculando una A_m estimada a la hora de inyección de los ratones de (3.7 ± 1.1) MBq/nmol. Con respecto a la actividad inyectada a los 4 animales, se consiguió mejorar la actividad de GMG al lograr una dosis alta con poca variación, inyectando (11.6 ± 0.9) MBq. En tanto, la actividad inyectada de GMGox fue un poco menor (debido al menor rendimiento de su preparación) y además tuvo mayor variación, consiguiendo inyectar (7.8 ± 1.9) MBq.

Las imágenes evidenciaron la captación de GMG en el tumor, con un buen contraste respecto al nivel de fondo para los 4 animales, obteniendo una relación tumor/músculo (T/NT) de 4.6 ± 0.6 (Figura 75(a) y Tabla 22). En cambio, no se pudo apreciar una captación tan nítida de GMGox en el tumor, obteniendo una relación T/NT de 2.6 ± 0.6 (Figura 75(b) y Tabla 22), siendo este valor significativamente menor al del GMG ($p < 0.05$).

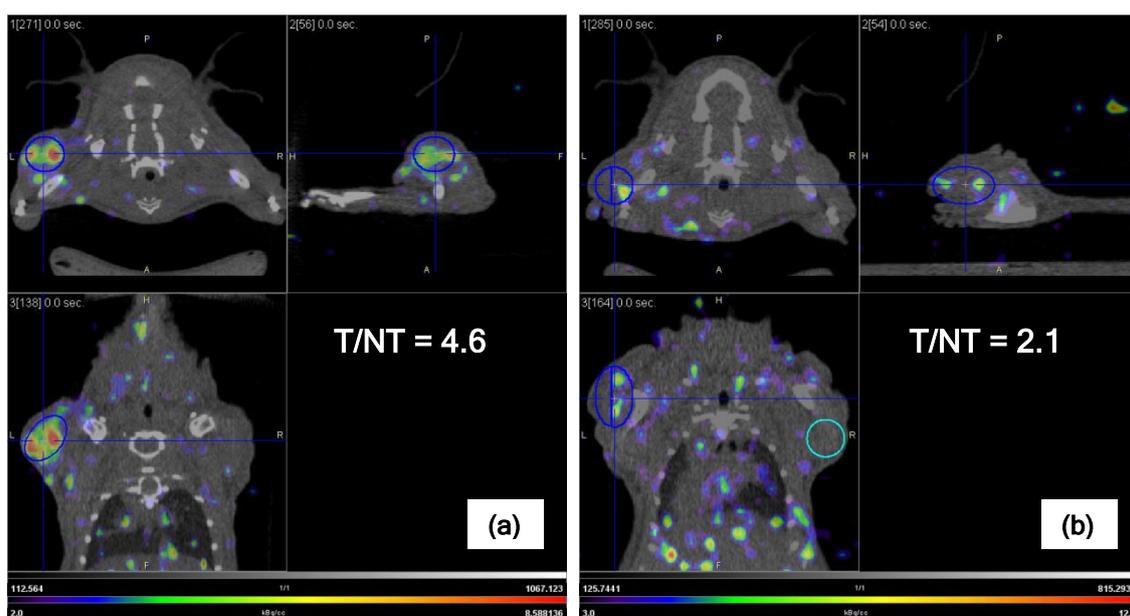


Figura 75. Imágenes PET/CT del ratón N° 3, portador de tumor xenográfico de volumen = 0.4 mL. El tiempo de adquisición fue de 1.5-2.0 h post-inyección de: (a) 12.3 MBq de GMG con PRQ = 93% y $A_m = 6.1$ MBq/nmol y (b) 9.6 MBq de GMGox con PRQ = 86% y $A_m = 5.1$ MBq/nmol.

Tabla 22. Relación tumor/músculo (T/NT) obtenida de las imágenes realizadas en ratones portadores de tumor con GMG y GMGox.

Radio-trazador	Ratón Nº	Actividad (MBq)	A _m (MBq/nmol)	Volumen tumoral (mL)	T/NT*
GMG	1	12.5	7.5	1.0	4.6
	2	11.0	4.5	0.5	3.8
	3	12.3	6.1	0.4	4.6
	4	10.7	4.1	0.5	5.3
GMGox	1	7.8	3.9	1.0	2.2
	2	5.2	2.5	0.5	3.5
	3	9.6	5.1	0.4	2.1
	4	8.6	3.2	0.5	2.7

*Obtenida de los VOIs construidos en las imágenes.

El último día del ensayo, al finalizar la adquisición de las imágenes, a las 2.5 h p.i., se realizó el ensayo de biodistribución de los 2 ratones inyectados con GMG y los otros 2 inyectados con GMGox. A pesar de que se obtuvo una alta variabilidad entre los 2 ratones inyectados con GMG (Nº 3 y Nº 4), los resultados se presentan como el promedio de cada grupo, por no poder determinar cuál se podría descartar, ya que ambas imágenes proporcionaron un buen contraste entre el tumor y el nivel de fondo, además de una relación T/NT similar. Los dos radiotrazadores presentaron un perfil de eliminación bastante similar, con una esperable alta excreción urinaria para los radiopéptidos, que alcanzó el $(87.4 \pm 14.9)\%$ DI para GMG y el $(96.2 \pm 0.5)\%$ DI para GMGox (Figura 76). En tanto, la captación renal fue baja, obteniendo $(3.3 \pm 4.2)\%$ DI y $(0.4 \pm 0.1)\%$ DI para GMG y GMGox respectivamente.

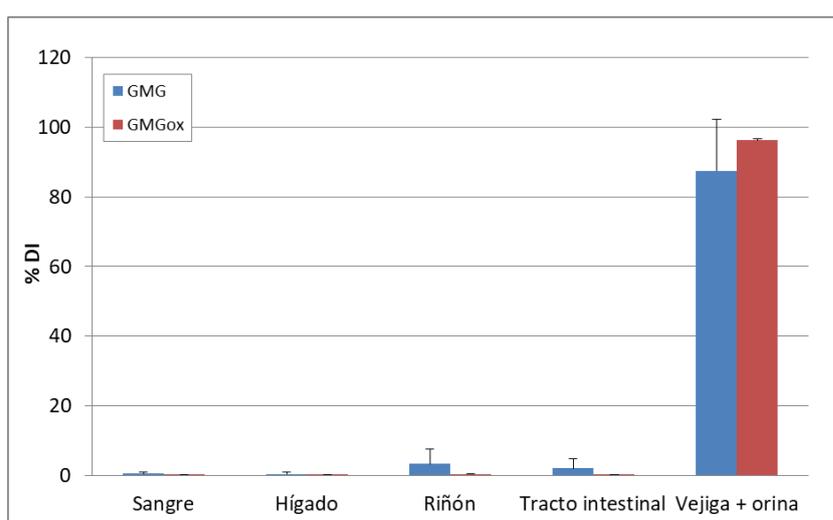


Figura 76. Perfil de eliminación de GMG y GMGox (%DI) en ratones portadores de tumor xenográfico a las 2.5 h p.i.

Todos los órganos y tejidos tuvieron en promedio una baja acumulación de actividad por gramo para GMG (< 7.0 % DI/g), y muy baja para GMGox (< 0.7 % DI/g) (Tabla 22 y Figura 77).

Tabla 22. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) a las 2.5 h de BD de GMG y GMGox en ratones portadores de tumor (Nude).

Órgano, tejido o fluido	GMG			GMGox		
	Ratón Nº 3	Ratón Nº 4	Prom ± DS (n = 2)	Ratón Nº 1	Ratón Nº 2	Prom ± DS (n = 2)
Sangre	0.46	0.03	0.24 ± 0.31	0.10	0.08	0.09 ± 0.01
Hígado	0.58	0.03	0.30 ± 0.39	0.04	0.03	0.03 ± 0.01
Corazón	0.27	0.01	0.14 ± 0.19	0.03	0.01	0.02 ± 0.01
Pulmón	0.48	0.05	0.27 ± 0.30	0.04	0.03	0.04 ± 0.00
Bazo	0.40	0.01	0.21 ± 0.27	0.03	0.03	0.03 ± 0.00
Riñón	13.36	0.52	6.94 ± 9.08	0.59	0.72	0.65 ± 0.09
Tiroides	0.21	0.01	0.11 ± 0.14	0.03	0.03	0.03 ± 0.00
Músculo	0.11	0.01	0.06 ± 0.07	0.02	0.01	0.02 ± 0.01
Hueso	0.16	0.01	0.08 ± 0.11	0.02	0.02	0.02 ± 0.00
Estómago	0.52	0.02	0.27 ± 0.35	0.02	0.04	0.03 ± 0.01
Ves. biliar	0.26	0.02	0.14 ± 0.17	0.06	0.10	0.08 ± 0.03
T.intestinal	1.65	0.03	0.84 ± 1.15	0.06	0.08	0.07 ± 0.01
Páncreas	0.35	0.02	0.18 ± 0.23	0.03	0.02	0.02 ± 0.00
Tumor	4.36	0.17	2.27 ± 2.96	0.06	0.08	0.07 ± 0.01

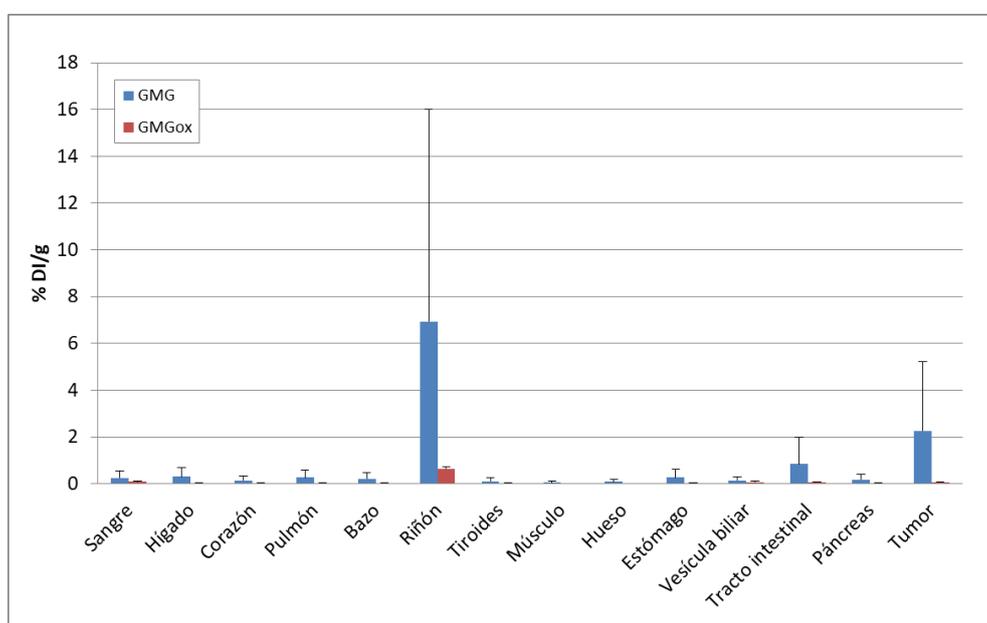


Figura 77. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) a las 2.5 h de BD de GMG y GMGox en ratones portadores de tumor (Nude).

La actividad acumulada por gramo de tumor para GMG fue de (2.27 ± 2.96)% DI/g y para GMGox de (0.07 ± 0.01)% DI/g, en tanto la relación T/NT

(tumor/músculo) resultó en 27.4 ± 19.5 y 4.5 ± 2.1 para GMG y GMGox respectivamente, lo que podría en principio indicar una mayor captación de GMG respecto a GMGox en los tumores inducidos con células que expresan el receptor CCK2. Pero la gran variabilidad obtenida en este ensayo de biodistribución, con un tamaño insuficiente de muestra ($n = 2$), hace necesario repetir el estudio con un número mayor de animales para determinar y comparar la relación T/NT de ambos radiotrazadores con precisión. Por lo tanto, en la primera parte de este último ensayo, con una muestra de 4 ratones para la obtención de imágenes, se pudo determinar una mayor captación en tumor para GMG que para GMGox. Mientras que en la segunda parte del mismo, con una muestra de sólo 2 ratones para la BD, no se pudo corroborar con certeza dicha diferencia. Además, falta determinar si la captación de cada radiotrazador en tumor es específica, lo que necesitaría de la co-inyección de un exceso de minigastrina no radiactiva para poder determinarlo *in vivo*.

6.4. Conclusiones

Se logró optimizar un método analítico que permitió cuantificar hasta 15 especies presentes en el marcado. Para lo cual, se combinó un sistema de HPLC (Gradiente 3) que logró separar 14 especies, con un sistema de TLC (TFA 6%) que logró separar el [^{68}Ga]Ga-coloide, y luego, a partir de cálculos matemáticos relacionando ambos métodos, se determinó el % real de cada especie.

En las marcaciones iniciales se obtuvo una pureza radioquímica de [^{68}Ga]Ga-DOTA-H2MG11 (GMG) que no superó el 85%, debido en parte a impurezas peptídicas y mayormente al péptido marcado con el residuo de metionina oxidado. La purificación por Sep-Pak C18 simplemente consiguió eliminar el ^{68}Ga libre, mejorando un poco la PRQ pero sin alcanzar el 90%. Esto hizo necesario optimizar distintos parámetros con el fin de mejorar la marcación de este péptido, y el estudio de estabilidad de cada marcado permitió evaluar de mejor manera los efectos producidos por cada parámetro.

El calentamiento por sí solo, necesario para la incorporación del ^{68}Ga al DOTA-H2-MG11, no consiguió oxidar al residuo de metionina del péptido ni producir otras impurezas peptídicas. Con lo cual estas impurezas serían producidas exclusivamente por los efectos de las radiaciones ionizantes generadas por el ^{68}Ga sobre el medio de reacción, donde la radiolisis del agua produciría los radicales libres que reaccionarían con el péptido marcado. Se obtuvo un aumento en la oxidación del residuo de metionina con el aumento de la actividad de ^{68}Ga , probablemente por la formación de más radicales libres oxidantes. En tanto, se observó un aumento de las otras impurezas peptídicas con el aumento de la temperatura de marcación. Aumentando quizás la velocidad de reacción de la radiolisis, que produce más radicales libres, y quizás también de las reacciones de estos con la molécula marcada, generando una gran variedad de productos secundarios. Por lo que estas reacciones se verían más afectadas por la temperatura que la propia oxidación del residuo de metionina.

El agregado inicial de ácido genticónico como antioxidante previo al marcado no dio buenos resultados, ya que se observó una competencia del genticato con el

precursor por la formación de complejos con el ^{68}Ga , debido a que este se encontraba en un gran exceso respecto al precursor. Por otro lado, el agregado de L-metionina como único antioxidante previo al marcado logró obtener una excelente incorporación del ^{68}Ga al DOTA-péptido, con bajos niveles de oxidación en el residuo de metionina pero no pudo evitar la formación de otras impurezas peptídicas. Finalmente, el ajuste de las cantidades de ambos antioxidantes permitió agregarlos juntos previo a la marcación y obtener buenos resultados, consiguiendo una buena incorporación del ^{68}Ga y logrando atenuar y estabilizar la formación de todas las impurezas peptídicas, aunque aún sin alcanzar una PRQ superior al 90%.

Al disminuir la masa de precursor se observó que el agregado de los dos antioxidantes en las cantidades optimizadas no cambió mucho respecto a la no utilización de antioxidantes (sólo NaOAc), ya que a partir de 2.4 nmol de precursor se consiguió una incorporación de $^{68}\text{Ga} \geq 96\%$ para la utilización de antioxidantes y de 1.2 nmol cuando estos no se agregaron. El cambio del agente estabilizante, HEPES en lugar de NaOAc, en las condiciones estudiadas no mejoró el rendimiento de marcación.

Se determinó que el tiempo óptimo para la marcación a 100°C con los dos antioxidantes fue de 10 min, ya que un tiempo mayor no logró aumentar la incorporación de ^{68}Ga (97%) pero disminuyó la PRQ, al aumentar las impurezas peptídicas (exceptuando la oxidación del residuo de metionina).

Se comprobó que el pH óptimo para la marcación con los dos antioxidantes estuvo en el rango de 4.0-4.5, donde se obtuvo una incorporación de ^{68}Ga de (98-97)%. Se observó una leve disminución en la incorporación a pH menores (3.0-3.5) y una muy notoria a pH mayores (5.0-6.0), llegando al 46% a pH 6.0, lo que podría deberse a la formación de la especie $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ que no permitiría la formación de complejos con el ^{68}Ga .

Las optimizaciones realizadas en la marcación de DOTA-H2-MG11 con ^{68}Ga permitieron aumentar la PRQ y mantenerla estable durante 2 h, pero no fueron suficientes para que esta pureza superara siempre el 90%, por lo que se hizo necesaria una purificación del crudo de reacción. Se consiguió obtener un método de purificación por extracción en fase sólida a través de un cartucho

Sep-Pak C8 light, en el cual se retuvo todo el producto y se eliminó el ^{68}Ga libre, luego se arrastró cierta cantidad de impurezas peptídicas con un lavado del cartucho con EtOH 7% y finalmente se eluyó el producto purificado con EtOH 30%. Esto consiguió aumentar la PRQ de 87% a 93% y recuperar un 77% (dc) de la actividad inicial.

También se consiguió obtener la principal impureza marcada con ^{68}Ga , conteniendo el residuo de metionina oxidado (GMGox), para poder estudiar su comportamiento biológico. Esto finalmente se logró en una única etapa de marcación-oxidación donde se agregó H_2O_2 en presencia de los dos antioxidantes en las cantidades previamente optimizadas en la marcación. Luego se realizó una purificación por Sep-Pak C8 light en el cual se retuvo todo el producto oxidado y se eliminó el ^{68}Ga libre, luego se arrastró cierta cantidad de impurezas peptídicas más hidrofílicas con un lavado del cartucho con EtOH 3.5% y finalmente se eluyó el producto purificado con EtOH 30%. Esto logró aumentar la PRQ del producto oxidado de 78% a 90% y recuperar un 68% (dc) de la actividad inicial.

Se realizó la evaluación biológica inicial de GMG y de su principal impureza oxidada (GMGox). En los ensayos *in vitro* con células AR42J se obtuvo para el GMG una unión específica a membrana de $(7.0 \pm 0.8)\%$ y una internalización específica de $(2.9 \pm 0.9)\%$, lo que indicaría una interacción específica de esta molécula marcada con los receptores CCK2 de las células. Sin embargo, para el GMGox la unión específica a membrana se redujo a 0.2% sin lograr una internalización específica (dato de un único ensayo), lo que reforzaría la importancia de disminuir esta impureza peptídica en el marcado. Dentro de los ensayos *in vivo*, en los estudios de biodistribución realizados en ratones sanos y en ratones Nude portadores de tumor xenográfico generado con células AR42J, se observó una rápida depuración del GMG con alta eliminación urinaria ya desde las 0.5 h p.i. Además se obtuvo una muy baja captación en órganos y tejidos no blanco. La acumulación por gramo de tumor fue elevada, presentando una relación T/NT (tumor/músculo) de 5.2 ± 0.4 a las 2.5 h p.i., a pesar de que la PRQ del radiotrazador inyectado fue de $(85 \pm 6)\%$. Aunque se obtuvo una alta variabilidad en los resultados, las imágenes PET/CT de estos mismos ratones portadores de tumor adquiridas a 1.5-2.0 h p.i. evidenciaron la

captación de GMG en el tumor. La relación T/NT (tumor/músculo) de los VOIs construidos para estas imágenes fue de 4.4 ± 1.9 lo que se correlaciona bastante bien con la relación obtenida en las biodistribuciones. En el último ensayo *in vivo*, se comparó el comportamiento de GMG (PRQ = $93.4 \pm 0.1\%$) y GMGox (PRQ = $87.2 \pm 1.2\%$) en cada ratón portador de tumor xenográfico. Las imágenes PET/CT evidenciaron una alta captación de GMG en el tumor, y una menor captación para GMGox. Esto se ratificó al calcular la relación T/NT de los VOIs construidos para las imágenes, obteniendo un valor de 4.6 ± 0.6 para GMG y un valor significativamente menor ($p < 0.05$) para GMGox de 2.6 ± 0.6 . Faltaría determinar la especificidad de la captación *in vivo* de ambos, además de repetir y aumentar los ensayos de biodistribución para poder confirmar esta diferencia entre la molécula de interés y su principal impureza.

7. CAPÍTULO II: Marcación con Lutecio-177

7.1. Introducción

El Lutecio (Lu) es un elemento metálico de las tierras raras de la serie lantánida de la tabla periódica. Posee 39 isótopos, pero sólo dos se encuentran en la naturaleza, el ^{175}Lu y el ^{176}Lu , con una abundancia de 97.4% y 2.6% respectivamente. El primero es el único isótopo estable y el segundo es un isótopo radiactivo con un $T_{1/2}$ de 3.76×10^{10} años que decae a ^{176}Hf (estable) por emisión β^- [97, 70]. El ^{177}Lu es un isótopo radiactivo que decae a ^{177}Hf (estable) por emisión β^- (100%) con un $T_{1/2}$ de 6.7 días. Los principales electrones emitidos (partículas β^-) poseen una energía máxima de 497 keV (78%), 384 keV (10%) y 176 keV (12%) (Figura 78). Además emite fotones γ de baja energía y baja abundancia, siendo los principales de 208 keV (11%) y 113 keV (6%) [98].

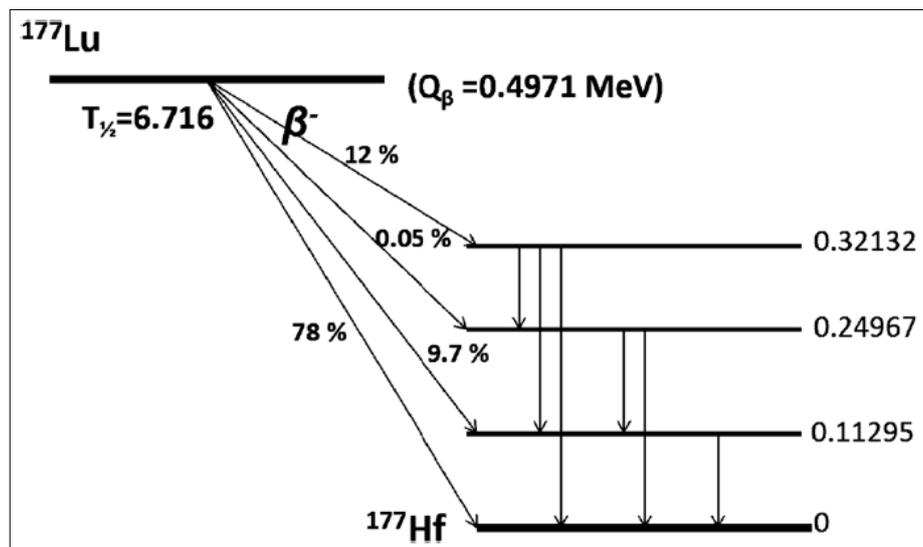


Figura 78. Esquema de decaimiento simplificado para ^{177}Lu . El ^{177}Lu decae por emisión β^- , principalmente al estado fundamental del ^{177}Hf pero también hacia estados excitados de este, los que al desexcitarse al estado fundamental originan la emisión de fotones γ de distinta energía [98].

La producción de ^{177}Lu a gran escala es realizada en reactor nuclear a través de dos métodos, el “directo” y el “indirecto”. El primero se basa en la irradiación de blancos enriquecidos en ^{176}Lu con neutrones, por medio de la reacción nuclear $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$. Mientras que en el método “indirecto” se realiza la

irradiación de blancos enriquecidos en Iterbio-176 (^{176}Yb) con neutrones, a través de la reacción nuclear $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}$, seguido del decaimiento por emisión β^- de ^{177}Yb para producir ^{177}Lu [98], según se sintetiza en la Figura 79.

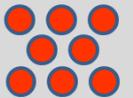
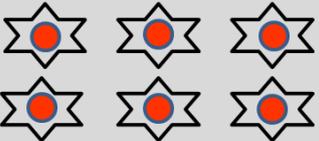
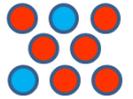
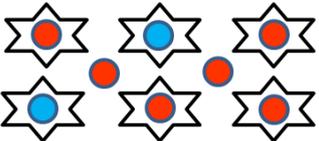
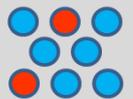
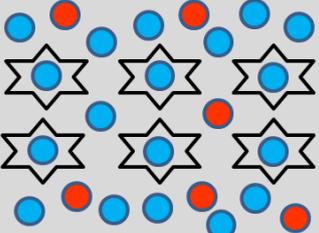
Lu 175 97.41	Lu 176 2.59 σ 2 + 2100	Lu 177 160.1 d β^- 0.2	
		6.71 d β^- 0.5	
Yb 174 31.8 σ 63	Yb 175 4.2 d β^- 0.5	Yb 176 12.76 σ 3.1	Yb 177 1.9 h β^- 1.4

Figura 79. Extracto de la tabla de nucleidos de Karlsruhe indicando los dos principales procesos de producción de ^{177}Lu por irradiación con neutrones en reactor nuclear. El método “directo” está señalado con una flecha naranja y el método “indirecto” con dos flechas rojas.

Ambos métodos tienen ventajas y desventajas. El método “directo” posee el más alto rendimiento, debido a que el ^{176}Lu tiene una sección eficaz de captura de neutrones térmicos muy alta para la formación de ^{177}Lu ($\sigma \sim 2000$ barn), lo que hace posible producirlo en reactores de investigación. Además, el procesamiento del blanco irradiado es bastante simple, lo que ocasiona finalmente que el método sea relativamente económico. Este proceso produce ^{177}Lu c.a. (“carrier added”: con agregado de portador), debido a que no es posible una separación química de su isótopo ^{176}Lu , por lo cual la actividad específica (A_s) obtenida del radionucleido ^{177}Lu es generalmente de 740-1110 GBq/mg, que dista bastante de la A_s máxima teórica de 4070 GBq/mg. Esto significa que sólo el 25% de los átomos son de ^{177}Lu , y el 75% consiste en una mezcla de átomos no radiactivos de ^{175}Lu y ^{176}Lu provenientes del blanco irradiado, lo que obliga a utilizar una mayor masa de la molécula a marcar, disminuyendo así también la A_m de la molécula marcada (Tabla 23). Por lo cual, el uso de ^{177}Lu c.a. podría estar restringido a la marcación de moléculas que no tengan limitados los sitios de unión en el organismo (blancos moleculares),

como las que se utilizan para la paliación del dolor óseo, sinovectomía o tratamiento de cáncer de hígado.

Tabla 23. Ilustración de la influencia de la A_s del ^{177}Lu en la marcación a través de quelante. A medida que disminuye la A_s del radionucleido se necesitará mayor cantidad de moléculas quelantes para conseguir incorporar el ^{177}Lu en ellas, disminuyendo así la A_m de la molécula marcada.

Producción	Denominación	A_s (GBq/mg)	Átomos Lu / átomos ^{177}Lu		6 átomos ^{177}Lu + 6 moléculas quelante
Teórico	Carrier free	4070	8 / 8		
Método indirecto	No carrier added	3000	8 / 6		
Método directo	Carrier added	1000	8 / 2		

Algo interesante, es que por este método se han alcanzado valores de A_s de ^{177}Lu de ~ 2600 GBq/mg, pero sólo en reactores de alto flujo que se encuentran disponibles en un número limitado de países. Otra desventaja del método “directo” es la coproducción de ^{177m}Lu , que con un $T_{1/2} = 160$ días, decae tanto por emisión β^- a ^{177}Hf (79%) como por transición isomérica a ^{177}Lu (21%), según se esquematiza en la Figura 80. Esta impureza se produce inevitablemente a través de la reacción nuclear $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177m}\text{Lu}$, y aunque sus niveles de actividad son bajos (0.01-0.02% al final de la irradiación), a causa de que la sección eficaz de captura de neutrones térmicos para esta reacción es baja ($\sigma \sim 3$ barn), ha surgido como un factor que puede restringir su uso en algunos países [98]. Si bien la dosis de radiación de ^{177m}Lu para pacientes tiene pocas consecuencias [98, 99], el problema surge por el límite de liberación permisible para los desechos de ^{177m}Lu (10 Bq/g) y las dosis administradas. Lo que obliga a tomar medidas tanto en el almacenamiento de los desechos del laboratorio

donde se realiza la marcación, como en la dilución de las excretas de los pacientes previa a la descarga en la línea de alcantarillado [98].

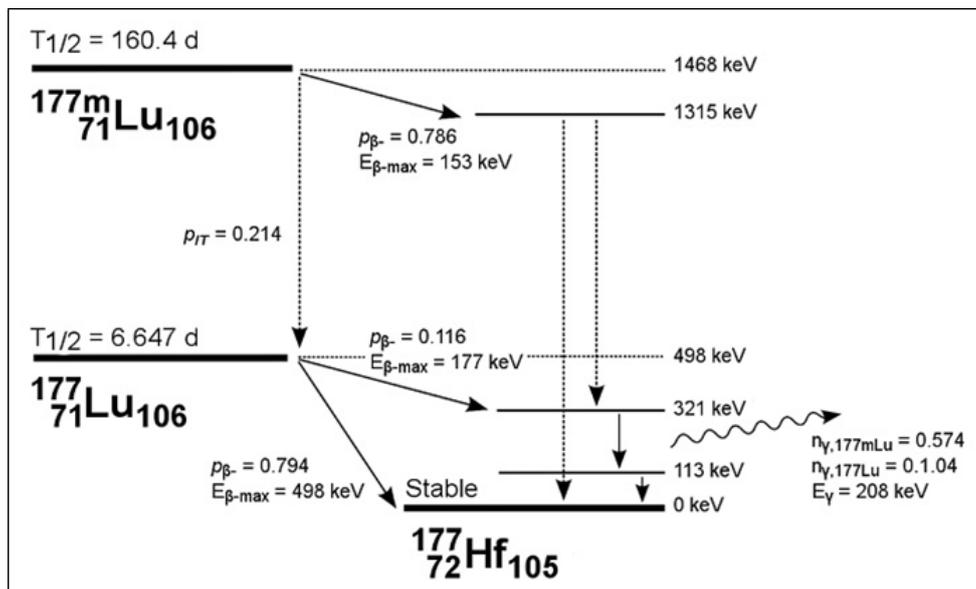


Figura 80. Esquema de decaimiento simplificado para ^{177m}Lu y ^{177}Lu . El ^{177m}Lu decae por transición isomérica a ^{177}Lu y por emisión β^- hacia un estado excitado de ^{177}Hf , que al desexcitarse al estado fundamental origina la emisión de fotones γ de distinta energía. Las flechas discontinuas simbolizan múltiples transiciones de nivel de energía [99].

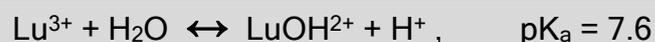
Por otro lado, la producción de ^{177}Lu por el método “indirecto” posee un bajo rendimiento, debido a la pobre sección eficaz de captura de neutrones térmicos que tiene el ^{176}Yb para la formación de ^{177}Yb ($\sigma \sim 3$ barn), por lo que se hace necesario utilizar blancos enriquecidos en un alto porcentaje de ^{176}Yb . El ^{177}Yb generado decae por emisión β^- a ^{177}Lu con un $T_{1/2}$ de 1.9 h, por lo que finalmente se produce un elemento distinto al inicialmente irradiado con neutrones, aunque con propiedades químicas muy similares. Tal es así, que el éxito inherente de esta ruta de producción reside en el desarrollo de una estrategia eficaz tanto para la separación eficiente del ^{177}Lu puro de las masas voluminosas del blanco de Yb irradiado, como para la recuperación exitosa del blanco de Yb para su reciclaje. Para ello, se han empleado distintos métodos, que van desde la cromatografía de intercambio iónico hasta estrategias de separación electroquímica. Esta separación es de suma importancia ya que el Yb posee una química de coordinación idéntica con los agentes quelantes utilizados para la preparación de radiofármacos de ^{177}Lu . Todo lo anterior hace que este método sea bastante complejo y costoso, pero también tiene sus

ventajas. Este proceso produce ^{177}Lu n.c.a. (“no carrier added”: sin agregado de portador), debido a que no se adicionan isótopos estables de Lu, con lo cual se obtiene la mayor A_s del radionucleido ^{177}Lu , consiguiendo valores mayores a 2960 GBq/mg, que se acercan bastante a la A_s máxima teórica (Tabla 23). Por ello, podría ser usado sin restricción incluso en la marcación de moléculas dirigidas a sitios de unión limitados, como las dirigidas a receptores. Además, este ^{177}Lu tiene una vida útil más larga (hasta 2 semanas) debido a que no hay una disminución apreciable de la A_s con el tiempo, porque la mayor parte de la masa es aportada por el ^{177}Lu , y al producirse el decaimiento disminuyen de forma similar tanto la actividad (numerador) como la masa (denominador). Otra ventaja del método “indirecto” es que no hay coproducción de ^{177m}Lu , este se encuentra por debajo del límite de detección ($< 10^{-5}\%$), evitando así los problemas de eliminación de los desechos que contienen esta impureza radiactiva de $T_{1/2}$ largo. Algo a tener en cuenta, es que la presencia de ^{174}Yb (estable, abundancia natural de 31.8%) en la irradiación del blanco enriquecido de ^{176}Yb (estable, abundancia natural de 12.8%), produce ^{175}Yb que decae por emisión β^- y $T_{1/2}$ de 4.2 días a ^{175}Lu (estable). Este ^{175}Lu al ser irradiado con neutrones produce ^{176}Lu (“estable”) que puede generar ^{177m}Lu . Por tanto, la contaminación del blanco de ^{176}Yb con ^{174}Yb genera isótopos estables de Lu (^{175}Lu y ^{176}Lu) que disminuye la actividad específica del ^{177}Lu , y además produce ^{177m}Lu , pero todo en cantidades menores por estar presente en baja proporción [98].

El Lutecio-177 está ganando cada vez más relevancia en la terapia radionucleídica dirigida, esto se atribuye a distintas razones que se discuten a continuación. El relativamente largo $T_{1/2}$ (6.7 días) minimiza la pérdida por decaimiento que ocurre durante el tiempo de transporte del radionucleido, proporcionándole una ventaja logística importante para una amplia distribución. Además ofrece tiempo suficiente para la ejecución de procedimientos más sofisticados de radiomarcado y purificación, así como para la realización del control de calidad y su administración. También este $T_{1/2}$ lo hace particularmente adecuado para la marcación de moléculas con cinética de direccionamiento lenta, como los anticuerpos. El rango de penetración medio de las partículas β^- emitidas por el ^{177}Lu en los tejidos blandos es de 670 μm , lo

que hace que este radionucleido sea ideal para suministrar energía en pequeños volúmenes. Esto lo hace eficaz para delimitar la radiación citotóxica en áreas relativamente pequeñas, haciéndolo competente para destruir tumores pequeños y lesiones metastásicas (por lo general, de menos de 3 mm de diámetro) con menos daño al tejido normal circundante. La emisión de fotones gamma de baja energía permite obtener imágenes de la cinética de biodistribución y excreción con la misma preparación radiomarcada utilizada para la terapia, y también permite realizar la dosimetría antes y durante el tratamiento. La emisión de partículas β^- de energía moderada, así como de fotones gamma de baja energía, da como resultado una dosis de radiación relativamente baja y, por lo tanto, ofrece el potencial para manejar niveles de actividad de ^{177}Lu relativamente altos durante la preparación y formulación de los radiofármacos, así como durante la administración al paciente [98].

El lutecio se encuentra más comúnmente como un catión trivalente (Lu^{3+}) y es el más pequeño de la serie de lantánidos. En solución acuosa, el ion Lu(III) libre hidratado es estable en un amplio rango de pH (0-8), debido a que su primera hidrólisis posee un pK_a elevado [26]:



Es así que, el ion Lu(III) se presenta en un sistema con equilibrios múltiples, por lo cual, en un diagrama de distribución de especies (Figura 81) se puede apreciar qué especies (y en qué proporción) están presentes a diferentes valores de pH [100]. Por lo cual, el ion Lu(III) libre hidratado está presente en mayor proporción a $\text{pH} < 8$, y a medida que se eleva el pH ocurre la hidrólisis originando LuOH^{2+} , Lu(OH)_2^+ y Lu(OH)_3 . Esta última especie es insoluble (habitualmente referida como coloide) y se origina a $\text{pH} > 8$. La re-disolución de Lu(OH)_3 , originando Lu(OH)_4^- , se daría a pH muy elevados (> 12).

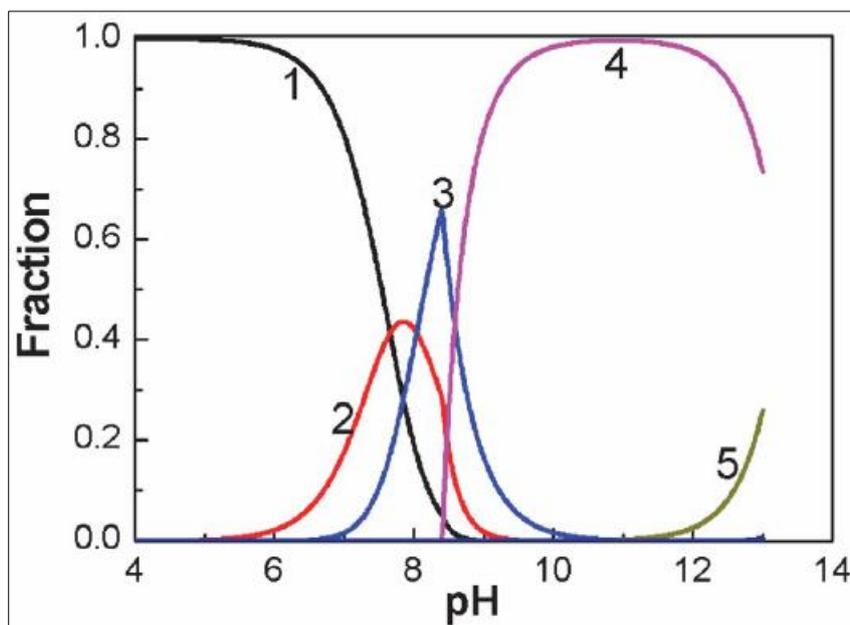


Figura 81. Distribución de las especies en función del pH para Lu(III) 1.43 μM . Las especies son: (1) Lu^{3+} , (2) LuOH^{2+} , (3) Lu(OH)_2^+ , (4) Lu(OH)_3 , (5) Lu(OH)_4^- [100].

La formación de coloide de Lutecio a un pH alto, hace que la hidrólisis del metal no sea problemática durante el radiomarcado [26], al proporcionar un mayor rango de pH para realizar la marcación con ^{177}Lu . Al igual que el ^{68}Ga , la mayor cantidad de marcaciones con ^{177}Lu se realiza a través del método del quelante bifuncional (sección 3.4.2.), pero el ^{177}Lu presentaría menos problemas que el ^{68}Ga en dicha marcación, puesto que hasta pH 8 el ^{177}Lu no formaría coloide, y el pH mínimo necesario para la desprotonación de los grupos ácido carboxílico y amino de los quelantes habitualmente utilizados es mucho menor ($\text{pH} > 3$).

El Lu(III) prefiere un número de coordinación entre 8 y 9, con una ligera tendencia a 8, como es común con los lantánidos tardíos. La formación de enlace iónico de Lu^{3+} ($I_A = 10.07$) es típica de los lantánidos, que prefieren los grupos donantes de oxígeno debido a su compatibilidad de donación iónica. Los quelantes más comúnmente usados para los radiotrazadores de ^{177}Lu son los análogos de DTPA y DOTA [26]. El macrociclo DOTA actúa como ligando octadentado para el Lu, a través de los cuatro átomos de oxígeno de los grupos carboxílicos y de los cuatro átomos de nitrógeno del macrociclo (Figura 82(a)). Una molécula de agua ocupa un noveno sitio de coordinación al cubrir el plano cuadrado coordinado de oxígenos (Figura 82(b)), por lo que se ha demostrado

que el $[\text{Lu}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ posee una geometría antiprismática cuadrada monocapitada (Figura 82(c)) [101].

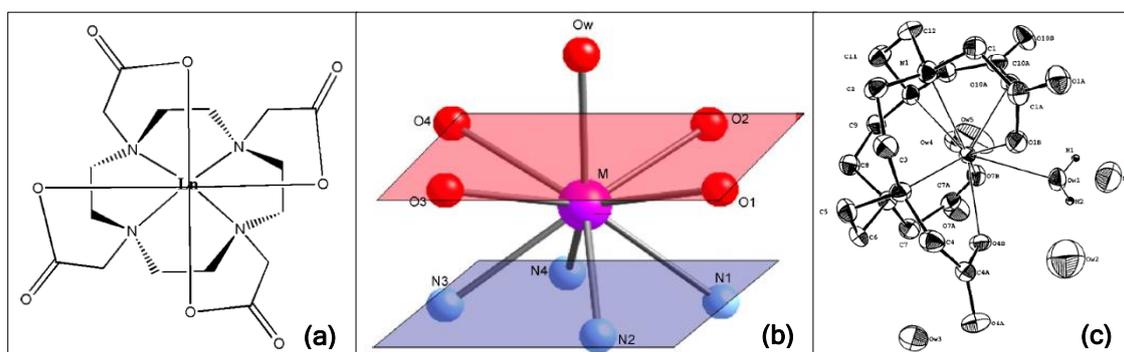


Figura 82. (a) Fórmula estructural de $[\text{Lu}(\text{DOTA})]^-$ [102]. (b) Representación de la geometría antiprismática cuadrada monocapitada para $[\text{Lu}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ [102]. (c) Diagrama ORTEP de $\text{Na}[\text{Lu}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]$ [101].

Al igual que con otros metales de tierras raras, la alta estabilidad e inercia del complejo $[\text{Lu}(\text{DOTA})]^-$ ($\log K_{\text{ML}} = 21.6 - 29.2$) lo ha llevado a un uso frecuente. Como se ha comentado, el Lutecio-177 tiene un $T_{1/2}$ que se adapta bien a la vida media biológica de la mayoría de los anticuerpos, pero, la marcación a través del anillo DOTA, con una cinética lenta que requiere de calentamiento, no es ideal para varias de estas aplicaciones. Sin embargo, cuando es apropiado, la preferencia por DOTA está respaldada no solo por la termodinámica sino también por una alta inercia cinética contra las proteínas séricas. Este grado de estabilidad a largo plazo es especialmente crucial debido al largo $T_{1/2}$ del ^{177}Lu , que daría lugar a una dosis prolongada y elevada en órganos no blanco si se liberara *in vivo* [26], ya que se ha reportado que los iones metálicos lantánidos libres pueden depositarse en el hueso y causar toxicidad en la médula ósea. La alta afinidad de los iones metálicos lantánidos por el anión fosfato presente en la circulación sanguínea, podría explicar su afinidad por el hueso [103].

Por último, es necesario disminuir la presencia de impurezas metálicas en la reacción de marcación con ^{177}Lu , ya que distintos cationes metálicos compiten por el quelante [104], por lo que es necesario tener consideraciones similares a las ya expuestas en la marcación con ^{68}Ga .

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Materiales

Se utilizó acetato de sodio (NaOAc), ácido acético glacial y ácido clorhídrico 30% de calidad Suprapur de Merck. El resto de los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica o superior. Se empleó ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), hidróxido de sodio, solución de amoníaco al 25% (NH₄OH) y etanol (EtOH) de Merck. La L-metionina se adquirió de Sigma-Aldrich y el ácido trifluoroacético (TFA) de J.T. Baker. En tanto el acetonitrilo (grado HPLC), el acetato de amonio (NH₄OAc) y el metanol (MeOH) fueron obtenidos de Carlo Erba. La solución de suero fisiológico (NaCl 0.9%) se obtuvo de Fármaco Uruguayo (FU). El precursor DOTA-H2-MG11 (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (Figura 27) se adquirió de piCHEM como su sal de TFA (DOTA APH070 Minigastrin). En tanto el DOTA.6H₂O se obtuvo de Macrocyclics. El ¹⁷⁷Lu empleado en las marcaciones fue obtenido en la forma de: [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ carrier added en HCl 0.05 M (de MURR Missouri University Research Reactor y de Perkin Elmer) y [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ no carrier added en HCl 0.04 M (de ITG Isotope Technologies Garching GmbH).

Las reacciones de marcación se realizaron en tubos de microcentrífuga (microtubos) de 2 mL, de polipropileno con tapa rosca y fondo cónico obtenidos de Simport (T332-7).

La purificación del radiotrazador de las reacciones de marcación se realizó por extracción en fase sólida a través de cartuchos Sep-Pak® C18 plus y Sep-Pak® C8 light de Waters.

El pH de las reacciones de marcación se determinó con cinta indicadora de pH de Macherey-Nagel (rango 0.5 - 5.5) o tiras indicadoras de pH de Merck (rango 5.0 - 10.0).

7.2.2. Equipos

Todas las soluciones conteniendo agua fueron preparadas con agua ultrapura de resistividad de 18.2 MΩ.cm (25°C), obtenida al momento de uso de un equipo Millipore Direct-Q™ 5 (agua Milli-Q).

El calentamiento de las reacciones de marcación se realizó en baño de agua (midiendo la temperatura con termómetro de mercurio) o incubadora de baño seco MRC DBD-001 (Dry Bath incubator), equipado con bloque de aluminio con orificios de tamaño adecuado para acomodar el tipo de tubos utilizados. Las temperaturas fijadas en 80°C, 100°C y 115°C en el baño seco, fueron medidas con termómetro de mercurio colocado en microtubo conteniendo agua Milli-Q, resultando en 75°C, 92°C y 100°C respectivamente.

Las medidas de actividad se realizaron en calibradores de dosis Capintec CRC-7 o Capintec CRC® -ULTRA, y contador de centelleo sólido con geometría plana, con detector de cristal de NaI(Tl) de 3 x 3 pulgadas, asociado a un analizador monocanal ORTEC® o espectrómetro de centelleo sólido con geometría de pozo, con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas, acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®.

El pH de soluciones no radiactivas se determinó con un pHmetro EquipLab PH220.

7.2.3. Métodos analíticos

7.2.3.1. Análisis por HPLC

El análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se realizó en tres equipos: 1) Varian - modelo No. 5000, 2) Raytest - GABI Star y 3) Shimadzu LCsolution. Todos provistos con un detector de arreglo de fotodiodos (UV-Visible) conectado en serie con un detector de NaI(Tl) (gamma). Como fase estacionaria, se utilizó una columna C18, 5 µm, tamaño de poro de 11 nm, 150 x 4.6 mm (Nucleodur 100-5 C18 ec, Macherey-Nagel). Como fase móvil se utilizó un sistema de dos solventes, una fase móvil A (0.1% de TFA en agua) y una fase móvil B (0.1% de TFA en acetonitrilo), en la que se ensayaron tres combinaciones para la elución en gradiente (Gradiente 0, Gradiente 1 y Gradiente 3 de Tabla 10 y Figura 28), todas a un flujo de 1 mL/min.

Al igual que para la marcación con Galio-68 (sección 6.2.3.1.), el porcentaje de actividad de cada pico se calculó como el porcentaje del área presente debajo de cada pico con respecto al área total integrada (todos los picos radiactivos sumados más todo segmento de línea de base elevada). Cabe destacar que el

[¹⁷⁷Lu]Lu-coloide tampoco es retenido en la columna, por lo cual la presencia de esta especie no fue determinada por este método analítico.

7.2.3.2. Análisis por TLC

La presencia de [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide se determinó por cromatografía en capa fina instantánea (iTLC), empleando como fase estacionaria papel cromatográfico de microfibra de vidrio, sin aglomerante, impregnado con gel de sílice (SG). Este papel de iTLC-SG (Agilent Technologies) se cortó en tiras de 9.5 x 1.0 cm (Figura 29) para su uso. La muestra se sembró a 1.5 cm del borde inferior, se secó con aire frío y se colocó en una cámara conteniendo aproximadamente 1 cm de alto de fase móvil. Se ensayaron dos fases móviles: a) NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) [83] y b) MeOH:NH₄OAc 0.15 M (1:1) [modificado de 105].

Se permitió el avance de la fase móvil en la tira hasta 0.5 cm del borde superior, luego se secó con aire caliente y se midió en un escáner EZ-SCAN con detección gamma (Carroll and Ramsey Associates), utilizando un software de integración de cromatografía PeakSimple 2000 (SRI Instruments). Se calculó el R_f de igual manera que en la marcación con Galio-68 (sección 6.2.3.2.). Antes de disponer del escáner, la tira desarrollada y seca se cortó en 8 segmentos con los siguientes largos: 2 cm (desde el borde inferior conteniendo la siembra), 1 cm (los siguientes 6 tramos) y 1.5 cm (hasta el borde superior conteniendo el frente). Cada segmento se midió en un contador de centelleo sólido con geometría plana, con detector de cristal de NaI(Tl) de 3 x 3 pulgadas, asociado a un analizador monocanal ORTEC®. Se determinó el R_f relacionando la posición del segmento en cuestión respecto al borde superior.

El porcentaje de [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide se determinó según la sección 7.3.1.3.

7.2.4. Marcación inicial de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

Las primeras marcaciones de DOTA-H2-MG11 con ¹⁷⁷Lu se realizaron en base al método reportado por von Guggenberg *et al.* para la marcación de DOTA-péptidos con ¹⁷⁷Lu [81].

La reacción de marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 156 μL de una solución de NaOAc 0.4 M - ácido gentísico 0.24 M, de pH 4.4 (Buffer ASAG (0.4-0.24)) con 40 μL de DOTA-H2-MG11 596 μM disuelto en agua Milli-Q (23.8 nmol). A este se le agregó (4.5-5.0) μL de [^{177}Lu]LuCl₃ c.a. ($A_s = (368-736)$ GBq/mg) en HCl 0.05 M, con una actividad de (111-248) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en el rango 3.5-4.5 e inmediatamente se incubó durante 20 min en baño de agua a 80°C. Al finalizar la marcación, cuando fue necesario, se procedió a la purificación del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C18 plus (previamente acondicionado con 5 mL de EtOH absoluto y 5 mL de NaOAc 0.5 M). Para ello, se aplicó la mezcla de reacción en el cartucho (~ 200 μL), así como el enjuague del microtubo de reacción con 100 μL de NaOAc 0.5 M. En primer lugar se realizó una elución del cartucho con 3 mL de NaOAc 0.5 M recogiendo el líquido emergente en un vial de 10 mL (^{177}Lu libre). Luego el producto retenido se eluyó del cartucho al pasar 3 mL de EtOH absoluto en 3 fracciones de 1 mL cada una, que fueron recolectadas por separado en viales de 10 mL. De inmediato se unieron las dos primeras fracciones (conteniendo la mayor proporción de actividad) para concentrar por evaporación con corriente de gas Nitrógeno. Al volumen concentrado en 0.2-0.3 mL se le adicionó 0.4-0.6 mL de suero fisiológico de manera de obtener el purificado en un vial de 10 mL con una concentración de etanol de $\sim 33\%$. Se determinó la pureza radioquímica (PRQ) del crudo de reacción y del purificado por HPLC con Gradiente 0.

7.2.5. Optimización de la marcación de [^{177}Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

Los siguientes ensayos se realizaron con el objetivo de optimizar distintos parámetros de la marcación de DOTA-H2-MG11 con ^{177}Lu .

7.2.5.1. Tiempo de marcación

El primer parámetro evaluado en la optimización de la marcación es el tiempo de incubación a la temperatura probada de 80°C. Para ello se realizaron 3 marcados en microtubos de 2 mL donde se mezcló 156 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) con 40 μL de DOTA-H2-MG11 (23.8 nmol). A cada uno se le agregó

10 μL de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ c.a. ($A_s = 690 \text{ GBq/mg}$) en HCl 0.05 M, con una actividad de (250-264) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante un tiempo distinto (10, 20 o 30) min en baño de agua a 80°C . Una vez finalizado cada tiempo, se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG.

7.2.5.2. Masa de DOTA-H2-MG11

El siguiente parámetro estudiado fue la variación de la masa del precursor, para evaluar cómo este afectaba la incorporación del ^{177}Lu . Para ello se llevaron a cabo dos ensayos utilizando $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ de calidades distintas.

En el primero se realizaron 3 marcados en microtubos de 2 mL conteniendo 156 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24). A cada uno se le agregó distintos volúmenes de DOTA-H2-MG11 (40, 30 y 20 μL) de manera de obtener 40, 30 y 20 μg (23.8, 17.9 y 11.9 nmol). Seguidamente se les agregó 24 μL de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ c.a. ($A_s = 514\text{-}563 \text{ GBq/mg}$) en HCl 0.05 M, con una actividad de (196-214) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron durante 20 min en bloque de calentamiento a 75°C .

En el segundo ensayo se efectuaron 7 marcados en microtubos de 2 mL conteniendo 156 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24). A cada uno se le agregó 40 μL de DOTA-H2-MG11 pero de distinta concentración (1 mg/mL a 1/40 mg/mL) de manera de obtener 40, 30, 20, 10, 5, 2.5 y 1 μg (23.8, 17.9, 11.9, 6.0, 3.0, 1.5 y 0.6 nmol). Seguidamente se les agregó 20 μL de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. ($A_s \sim 3000 \text{ GBq/mg}$) en HCl 0.04 M, con una actividad de (153-186) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0-4.5 e inmediatamente se incubaron durante 20 min en bloque de calentamiento a 75°C .

Luego de finalizar los marcados se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG.

7.2.5.3. Buffer ASAG y temperatura de marcación

Se evaluó aumentar la concentración de NaOAc (0.4 a 0.8 M) del Buffer ASAG manteniendo la concentración de ácido gentísico (0.24 M), y aumentar la temperatura de marcación con disminución del tiempo de incubación, según fue optimizado para $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ [106]. Para ello se realizaron 3 marcados, cada uno en microtubo de 2 mL. En el primero se mantuvieron las

condiciones probadas anteriormente, por lo que se mezcló 156 μL de Buffer ASAG (0.4-0.24) con 20 μL de DOTA-H2-MG11 (11.9 nmol) y 20 μL de ^{177}Lu]LuCl₃ n.c.a. ($A_s \sim 3000$ GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de 173 MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.0 e inmediatamente se incubó durante 20 min en bloque de calentamiento a 75°C. En los otros 2 marcados se mezcló 156 o 230 μL de Buffer ASAG (0.8-0.24) con 20 μL de DOTA-H2-MG11 (11.9 nmol) y 7 μL de ^{177}Lu]LuCl₃ n.c.a. ($A_s = 3111$ GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de (144-146) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 92°C.

Luego de finalizar los marcados se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG. Se realizó un estudio de estabilidad de los últimos dos marcados donde se analizaron las distintas especies presentes en el crudo de reacción a distintos tiempos post-marcado, manteniendo para ello el microtubo de reacción a T.A. luego de finalizada la incubación. Este análisis se realizó por HPLC e iTLC-SG a 1, 3 y 7 días post-marcado.

7.2.5.4. Agregado de L-metionina como antioxidante

Con el propósito de inhibir la oxidación del residuo de metionina del péptido en su marcación con ^{177}Lu , se evaluó el agregado del aminoácido L-metionina durante la incubación en presencia del ácido gentísico. Se decidió comenzar con el mismo agregado de L-metionina optimizado en la marcación con ^{68}Ga (sección 6.3.4.2.). Con lo cual, al utilizar 375 μL de L-metionina 2.0 mg/mL (13.4 mM), la concentración del aminoácido en estos primeros marcados resultó en 0.12% (m/v). Fue así que se realizaron tres marcados, cada uno en microtubo de 2 mL donde se mezcló 230 μL de Buffer ASAG (0.8-0.24) con 20 μL de DOTA-H2-MG11 (11.9 nmol). Al primero se le agregó 375 μL de L-metionina 2.0 mg/mL (13.4 mM), al segundo 375 μL de agua Milli-Q y el tercero no recibió agregados. A los tres microtubos se les adicionó 7 μL de ^{177}Lu]LuCl₃ n.c.a. ($A_s = 3111$ GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de (144-145) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 92°C. Se realizó un estudio de estabilidad de los tres marcados donde se analizaron las distintas especies presentes en el

crudo de reacción a distintos tiempos post-marcado, manteniendo para ello el microtubo de reacción a T.A. luego de finalizada la incubación. Este análisis se realizó por HPLC e iTLC-SG a $t = 0, 1, 3$ y 7 días post-marcado.

En segunda instancia se evaluó si el agregado anterior de L-metionina podría afectar la incorporación de ^{177}Lu a la molécula, por lo cual se disminuyó la masa del precursor. Para ello se realizaron dos marcados más en microtubos de 2 mL conteniendo $230\ \mu\text{L}$ de Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.24$) y $375\ \mu\text{L}$ de L-metionina 13.4 mM . A cada uno se le agregó distintos volúmenes de DOTA-H2-MG11 (15 y $10\ \mu\text{L}$) de manera de obtener 15 y $10\ \mu\text{g}$ (8.9 y 6.0 nmol). Seguidamente se les adicionó $8\ \mu\text{L}$ de $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. ($A_s = 3034\text{ GBq/mg}$) en $\text{HCl } 0.04\text{ M}$, con una actividad de ($150\text{-}153$) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en $4.5\text{-}5.0$ e inmediatamente se incubaron durante 15 min en bloque de calentamiento a 92°C .

Con la intención de seguir disminuyendo las impurezas se aumentaron las cantidades de los dos antioxidantes, en primer lugar se aumentaron los volúmenes del Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.24$) y de la L-metionina 13.4 mM y en segundo lugar la concentración de ácido genticico (Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.3$)) y L-metionina (134 mM). Con lo cual se realizaron otros dos marcados en microtubo de 2 mL . En el primero se mezcló $460\ \mu\text{L}$ de Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.24$) con $750\ \mu\text{L}$ de L-metionina 13.4 mM , mientras que en el segundo fueron mezclados $230\ \mu\text{L}$ de Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.3$) con $375\ \mu\text{L}$ de L-metionina 134 mM . A cada uno se le agregó $15\ \mu\text{L}$ de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y ($10\text{-}6$) μL de $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. ($A_s = 2867\text{-}2625\text{ GBq/mg}$) en $\text{HCl } 0.04\text{ M}$, con una actividad de ($152\text{-}122$) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en $4.5\text{-}5.0$ e inmediatamente se incubaron durante 15 min en bloque de calentamiento, el primero a 92°C y el segundo a 100°C .

Por tanto, las condiciones óptimas de marcado se obtuvieron con el agregado de $230\ \mu\text{L}$ de Buffer ASAG ($0.8\text{-}0.3$) ($\text{NaOAc } 0.8\text{ M}$ - ácido genticico 0.3 M , pH $4.5\text{-}5.0$), $375\ \mu\text{L}$ de L-metionina 134 mM , $15\ \mu\text{L}$ de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y hasta $80\ \mu\text{L}$ de $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. ($A_s = 3001\text{ GBq/mg}$) en $\text{HCl } 0.04\text{ M}$, con una actividad de 236 MBq , que luego de verificado un pH de $4.5\text{-}5.0$ fuera incubado durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C .

7.2.6. Marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA

Existe la posibilidad de que el anillo DOTA se desacople del péptido H2-MG11 por radiolisis, de manera que se efectuó la marcación de este quelante con ¹⁷⁷Lu para su identificación en el sistema cromatográfico.

Se realizaron dos marcados en distintos momentos de la tesis, de manera de utilizar las mismas condiciones ensayadas para la marcación de la molécula de interés en ese momento. La solución de DOTA 1 mg/mL utilizada en estos ensayos fue preparada en la sección 6.2.8.1.

La primera marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 230 µL de Buffer ASAG (0.8-0.24) con 5 µL de DOTA 1.95 mM (9.8 nmol) y 10 µL de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ n.c.a. (A_s = 2867 GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de 152 MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 92°C. Se realizó el análisis del crudo de reacción por HPLC (Gradiente 1) y por iTLC-SG (NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20)).

La segunda marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 230 µL de Buffer ASAG (0.8-0.3) con 5 µL de DOTA 1.95 mM (9.8 nmol) y 7 µL de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ n.c.a. (A_s = 3001 GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de 179 MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se realizó el análisis del crudo de reacción por HPLC (Gradiente 3) y por iTLC-SG (NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20)).

7.2.7. Efecto de los antioxidantes en la marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

El siguiente ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la importancia del agregado de ácido genticico y L-metionina en la marcación de DOTA-H2-MG11 con ¹⁷⁷Lu. Para ello se realizaron 4 marcados con distintas combinaciones de ambos, de manera de estudiarlos en conjunto, por separado o sin ellos. Las reacciones de marcación se realizaron en microtubos de 2 mL, agregándole a cada uno lo siguiente:

- M1 (conteniendo los 2 antioxidantes): 230 μ L de Buffer (NaOAc 0.8 M - ácido genticónico 0.3 M) y 375 μ L de L-metionina 134 mM
- M2 (conteniendo sólo L-metionina): 230 μ L de Buffer (NaOAc 0.8 M - ácido acético 0.9 M) y 375 μ L de L-metionina 134 mM
- M3 (conteniendo sólo ácido genticónico): 230 μ L de Buffer (NaOAc 0.8 M - ácido genticónico 0.3 M) y 375 μ L de agua Milli-Q
- M4 (sin antioxidantes): 230 μ L de Buffer (NaOAc 0.8 M - ácido acético 0.9 M) y 375 μ L de agua Milli-Q.

A cada uno se le agregó 15 μ L de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y 5 μ L de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ n.c.a. ($A_s = 3681$ GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de (137-140) MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubaron durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se estudió la estabilidad de los 4 marcados donde se analizaron las distintas especies presentes en el crudo de reacción a distintos tiempos post-marcado, manteniendo para ello el microtubo de reacción a T.A. luego de finalizada la incubación. Este análisis se realizó por HPLC e iTLC-SG a t = 0, 1, 4 y 7 días post-marcado. Vale aclarar que los marcados se realizaron cada 30 min, de manera de poder analizar cada uno al mismo tiempo post-marcado con el mismo equipo de HPLC.

Se realizó un blanco de reacción para el marcado conteniendo los dos antioxidantes (M1), y así poder asignar el tiempo de retención al ¹⁷⁷Lu libre en estas condiciones. La marcación se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 230 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.3) con 375 μ L de L-metionina 134 mM. A este se le agregó 15 μ L de agua Milli-Q (en sustitución del DOTA-H2-MG11) y 24 μ L de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ n.c.a. ($A_s = 3001$ GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de 64 MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C.

7.2.8. Efecto del pH de marcación en presencia de ácido gentísico

El inesperado comportamiento del ácido gentísico, que incrementó la oxidación selectiva del residuo de metionina de la molécula LMG con el tiempo, motivó una investigación más exhaustiva del comportamiento de este antioxidante en el marcado, por lo cual se estudió la variación del pH de marcación en presencia de este único agente estabilizante.

El valor de pH se ha fijado en los marcados anteriores en 4.5-5.0 al utilizar 230 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3) con hasta 80 μL de HCl 0.04 M ($[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$). Para ensayar valores de pH por debajo y por encima de ese rango, se decidió agregar al Buffer soluciones de HCl y NaOH respectivamente. En primer lugar, se determinó la cantidad de moles de HCl necesarios para disminuir el pH 4.9 de 200 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3). Para ello, a esta solución se le fue añadiendo paulatinamente porciones de HCl 0.1 M y determinando el pH (con pHmetro) luego de cada agregado. Con la curva obtenida se calcularon los moles de HCl a agregar para obtener valores de pH de 4.5, 4.0 y 3.5. Se estableció que para 200 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3) fueron necesarios 5.8 μL , 13.8 μL y 19.4 μL de HCl 5.0 M para asegurar los valores de pH deseados, lo cual se chequeó en la práctica con pHmetro. En segundo lugar se hizo lo mismo con NaOH 0.5 M. Con la curva obtenida se calcularon los moles de NaOH a agregar para obtener valores de pH de 5.0, 5.5 y 6.0. Se estableció que para 200 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3) fueron necesarios 5.0 μL , 20.0 μL y 25.0 μL de NaOH 2.0 M para asegurar los valores de pH deseados, lo cual también se chequeó en la práctica con pHmetro. Se prepararon las 6 soluciones de Buffer a distinto pH, para ello se mezcló 200 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3) con el volumen determinado de HCl 5.0 M o NaOH 2.0 M, completando con agua hasta 225 μL según correspondiera. La solución de Buffer sin modificar (pH 4.9), se preparó con 200 μL de Buffer ASAG (0.8-0.3) y 25 μL de agua.

Se realizaron los 7 marcados en microtubos de 2 mL conteniendo 115 μL del Buffer correspondiente (pH 3.5, 4.0, 4.5, 4.9, 5.0, 5.5 y 6.0). A cada uno se le agregó 7 μL de DOTA-H2-MG11 (4.2 nmol) y 2.5 μL de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. ($A_s =$

3643 GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de (58-61) MBq. Se verificó que el pH de cada uno fuera el correcto (con cinta o tira) e inmediatamente se incubaron durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C. Se estudió la estabilidad de los 7 marcados donde se analizaron las distintas especies presentes en el crudo de reacción a distintos tiempos post-marcado, manteniendo para ello el microtubo de reacción a T.A. luego de finalizada la incubación. Este análisis se realizó por HPLC e iTLC-SG a t = 0, 3 y 7 días post-marcado. Vale aclarar que los marcados se realizaron cada 30 min, de manera de poder analizar cada uno al mismo tiempo post-marcado con el mismo equipo de HPLC.

7.2.9. Purificación final de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

Con el propósito de aumentar la PRQ de la molécula de interés marcada con ¹⁷⁷Lu, se realizó la purificación del crudo de reacción según el método de purificación optimizado para la molécula marcada con ⁶⁸Ga.

La marcación de LMG se realizó en microtubo de 2 mL donde se mezcló 230 µL de Buffer ASAG (0.8-0.3) con 375 µL de L-metionina 134 mM. A este se le agregó 15 µL de DOTA-H2-MG11 (8.9 nmol) y 80 µL de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ n.c.a. (A_s = 3001 GBq/mg) en HCl 0.04 M, con una actividad de 236 MBq. Se verificó que el pH se encontrara en 4.5-5.0 e inmediatamente se incubó durante 15 min en bloque de calentamiento a 100°C.

Al finalizar la marcación se procedió a la purificación manual del crudo por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light, según se detalla en la sección 6.2.7. La mezcla de reacción se pasó por el cartucho, seguido del enjuague del microtubo de reacción con 1 mL de suero fisiológico y del lavado del cartucho con 1 mL de EtOH 7%. El producto retenido en el cartucho se eluyó con 1 mL de EtOH 30% que se recogió en un vial de 10 mL conteniendo 120 µL de L-metionina 134 mM y 1880 µL de agua Milli-Q. Se realizó el análisis por HPLC e iTLC-SG del crudo de reacción y del producto purificado.

7.2.10. Estudios biológicos primarios

Se realizó una evaluación biológica inicial del [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11 para tener conocimiento de su comportamiento *in vivo* en animales sanos de experimentación.

Para ello se llevaron a cabo estudios de distribución biológica del radiotrazador LMG en ratones C57BLACK6, hembras sanas provenientes del bioterio del CIN, que fueron mantenidos con comida y agua *ad libitum* hasta el inicio del ensayo. Estos estudios se realizaron a distintos tiempos post-inyección del radiotrazador: 0.5, 1.0, 2.0 y 24 h p.i., utilizando 3 animales para cada tiempo (n = 3), con una edad de 6-10 semanas y peso de 23 ± 4 g. Todos los animales fueron inyectados con el radiotrazador por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola, con un nivel de actividad adecuado para lograr una buena estadística de medida de actividad luego del sacrificio (3.3-11.4 MBq). Luego los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en el tiempo post-inyección correspondiente y de inmediato fueron pesados. Se extrajeron diferentes órganos (hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, tiroides, estómago, vesícula biliar, tracto intestinal, páncreas, vejiga + orina total), así como muestras de sangre, músculo y hueso. Cada órgano y tejido fue pesado y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. Lo mismo se realizó con la cola y la carcasa del animal (con los restos de órganos, tejidos y fluidos) para poder determinar la actividad total presente en el mismo. Las actividades obtenidas, se expresaron como porcentaje de la actividad total presente para cada órgano o tejido (% DI), o como porcentaje de la actividad total presente para cada gramo de órgano o tejido (% DI/g). Los resultados se expresaron como: promedio ± desviación estándar. El radiotrazador LMG se obtuvo según el método de marcación inicial con purificación por Sep-Pak C18 light (sección 7.2.4.).

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Métodos analíticos

7.3.1.1. Análisis por HPLC (determinación del % relativo de las especies no coloidales)

De manera muy similar a la marcación con Galio-68, en un marcado típico con Lutecio-177 se observaron por lo menos 3 picos en el HPLC (Figura 83). El primer pico se asignó al ^{177}Lu no incorporado a la molécula (^{177}Lu libre), ya que coincidió con el t_R del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$. El segundo, se asignó al producto secundario de la reacción correspondiente a la oxidación de la molécula de interés [81] denominado $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11ox}$ (LMGox). Mientras que el tercer pico, mayoritario, se asignó a la molécula de interés $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$ (LMG), por coincidir con el t_R de la molécula sin marcar (DOTA-H2-MG11) detectada al UV (Figura 39(a)).

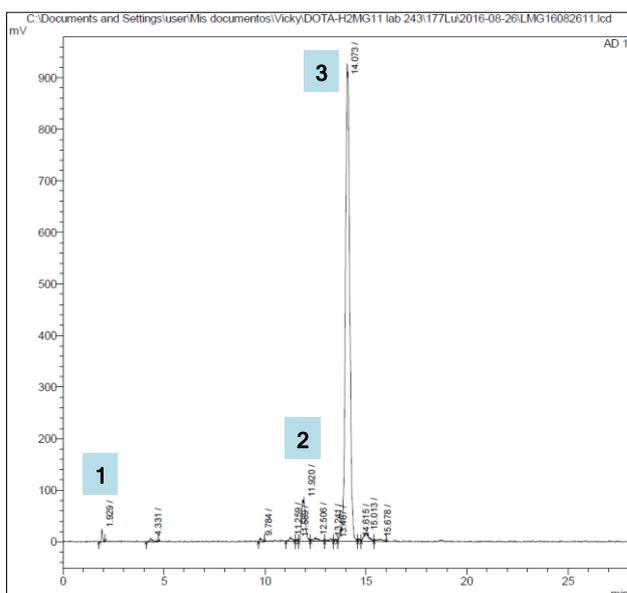


Figura 83. Cromatograma típico obtenido por HPLC (detección γ) utilizando el Gradiente 1.

Al igual que en la marcación con Galio-68, el análisis se inició con el sistema de elución “Gradiente 0” (según [81]), obteniendo una separación de 2 min entre los picos 2 y 3 con un tiempo de corrida de 33 min (Tabla 24 y Figura 28). En la primera modificación del sistema de elución “Gradiente 1”, se obtuvieron los mismos tiempos de retención para las distintas especies pero en un tiempo de corrida menor (28 min). Mientras que en la última modificación “Gradiente 3”,

conseguida en la marcación con ^{68}Ga (sección 6.3.1.1), se logró también optimizar el sistema para la marcación con ^{177}Lu , ya que se consiguió una mejor separación de las 22 especies detectadas, incluyendo una separación de 4 min entre los picos 2 y 3, en un tiempo de corrida de 25 min.

Tabla 24. Tiempos de retención obtenidos para las 3 especies principales en los distintos sistemas de elución ensayados por HPLC (equipo “Shimadzu LCsolution”).

Especie	t_R prom \pm DS (min) (n)		
	Gradiente 0	Gradiente 1	Gradiente 3
^{177}Lu libre	1.9 \pm 0.0 (2)	1.9 \pm 0.0 (136)	1.5 \pm 0.0 (43)
$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11ox}$	11.7 \pm 0.1 (4)	11.7 \pm 0.1 (145)	9.4 \pm 0.1 (40)
$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$	13.9 \pm 0.0 (4)	14.0 \pm 0.1 (144)	13.3 \pm 0.1 (38)

prom= promedio, DS= desvío estándar, n= N^o de determinaciones.

7.3.1.2. Análisis por TLC (determinación del % real de coloide)

La cromatografía en iTLC-SG se empleó para poder determinar la cantidad de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-coloide}$ presente en el marcado, ya que esta especie permanece en el origen del cromatograma (punto de siembra) con las distintas fases móviles ensayadas. El análisis se inició con la fase móvil $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:10:20) utilizada en [83] para $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$, donde tanto el $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-coloide}$ como el ^{177}Lu libre permanecen en el origen y el resto de las especies migran en conjunto con el frente (Figura 84 y Tabla 25).

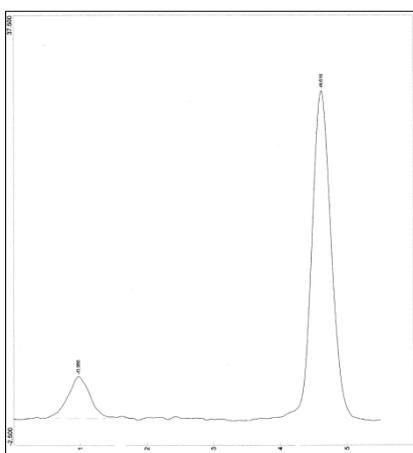


Figura 84. Cromatograma obtenido por iTLC-SG de un marcado típico de DOTA-H2-MG11 con ^{177}Lu utilizando la fase móvil $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:10:20), donde se observan especies en el origen con $t_R = 1.0$ ($R_f = 0.1$) y especies que migran con $t_R = 4.6$ ($R_f = 1.0$).

Tabla 25. R_f obtenidos para las 4 especies principales ensayadas en iTLC-SG con distintas fases móviles.

Especie	R _f prom ± DS (n)	
	NH ₄ OH:EtOH:H ₂ O (2:10:20)	MeOH:NH ₄ OAc 0.15 M (1:1)*
[¹⁷⁷ Lu]Lu-coloide	0.1 ± 0.0 (99)	0.0-0.1 (7)
¹⁷⁷ Lu libre	0.1 ± 0.0 (99)	0.0-0.3 (7)
[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-H2-MG11ox	1.0 ± 0.0 (183)	0.5-0.8 (6)
[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-H2-MG11	1.0 ± 0.0 (183)	0.5-0.8 (6)

prom= promedio, DS= desvío estándar, n= N^o de determinaciones.

*Tiras cortadas en segmentos.

También se ensayó la fase móvil MeOH:NH₄OAc 0.15 M (1:1) [modificado de 105] que había sido utilizada en el CUDIM para determinar la cantidad de [⁶⁸Ga]Ga-coloide presente en los primeros marcados de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE. Esta fase móvil había sido utilizada con éxito previo a ser sustituida por la fase móvil MeOH:NH₄OAc 1 M (1:1) de la Farmacopea Europea [82], obteniendo los mismos resultados para ambas. Sin embargo, en el marcado de DOTA-H2-MG11 con ¹⁷⁷Lu no se obtuvo una buena separación entre el ¹⁷⁷Lu libre y el péptido marcado (LMG) junto con su principal impureza (LMGox) (Tabla 25). Por lo cual, se continuó con la fase móvil NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) para determinar el [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide presente en el marcado.

7.3.1.3. Análisis global (determinación del % real de cada especie)

Debido a que no se dispone de un único método analítico que permita cuantificar todas las especies presentes en el marcado, se necesitó combinar los dos métodos analíticos utilizados, TLC y HPLC, para lograrlo. Fue así que se utilizaron los cálculos matemáticos planteados para Galio-68 (sección 6.3.1.3) a fin de determinar el % real de cada especie, teniendo en cuenta que en la iTLC-SG desarrollada en NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) tanto el [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide como el ¹⁷⁷Lu libre quedan retenidos en el origen, mientras que el resto de las especies migran a cierta distancia con la fase móvil. Por ello, se utilizó primero la ecuación (3) para estimar por cálculo el % de coloide C, y luego la ecuación (1) para estimar por cálculo el % real del resto de las especies.

7.3.2. Marcación inicial de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

Las primeras marcaciones conseguidas con cierto éxito tuvieron resultados un tanto variables, donde no se pudo determinar el motivo de la variación.

Uno de los parámetros estudiados fue la actividad específica (A_s) del ¹⁷⁷Lu, la cual es habitualmente informada en el CoA del vial de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ para la fecha de calibración. Como este es un parámetro que varía con el tiempo, se realizó el cálculo del mismo para la fecha de cada ensayo según se describe a continuación. Teniendo en cuenta la ecuación (4), se puede calcular la masa de Lu total presente en el vial en la fecha de calibración (cal):

$$(4) \quad A_s \text{ cal} = \frac{\text{Actividad cal}}{\text{masa Lu total cal}}$$

Luego se calcula la A_s del vial anterior a un tiempo (t) según la ecuación (5), en donde el numerador contiene la actividad presente calculada al tiempo (t) y el denominador contiene la masa de Lu total presente en el tiempo (t):

$$(5) \quad A_s t = \frac{\text{Actividad t}}{\text{masa Lu total cal} - \text{masa } ^{177}\text{Lu decaído t}}$$

Donde la masa del ¹⁷⁷Lu decaído al tiempo (t) se calcula según la ecuación (6), en la cual, a los moles de ¹⁷⁷Lu presentes en la calibración se le resta los moles de ¹⁷⁷Lu presentes a tiempo (t):

$$(6) \quad \text{masa } ^{177}\text{Lu decaído t} = (\text{moles } ^{177}\text{Lu cal} - \text{moles } ^{177}\text{Lu t}) * 177$$

La Tabla 26 resume algunos casos donde únicamente se varió la actividad de ¹⁷⁷Lu y su A_s (al utilizar distintas partidas del radionucleido o la misma en días distintos). En el primer caso se muestra una incorporación de ¹⁷⁷Lu exitosa del 95%, donde se obtuvo una PRQ de LMG de 93%, presentando una relación de moles de precursor a moles de ¹⁷⁷Lu de 155, óptima aún para esa A_s ya que el precursor sigue en exceso de moles (14) respecto al Lu total (¹⁷⁷Lu + Lu no radiactivo). En el segundo caso se utilizó el doble de la actividad anterior con una A_s un poco mayor, por lo que podía ser probable una incorporación de ¹⁷⁷Lu menor, que fue lo que se obtuvo (66%). Esto probablemente por tener menos exceso de precursor (69 respecto al ¹⁷⁷Lu y 8 respecto al Lu total). Sin

embargo, en el tercer caso se utilizó una actividad similar al primer caso pero con el doble de A_s , por lo que se esperaba una mayor incorporación de ^{177}Lu , por tener un exceso similar de precursor respecto al ^{177}Lu (121) y un mayor exceso respecto al Lu total (22), pero se obtuvo una incorporación de sólo 63%. Una posible explicación de esta última situación podría ser la contaminación de la solución con metales, por utilizar jeringa Hamilton con aguja biselada para la toma del $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ del vial original. Fue así que se tomó la precaución en los siguientes marcados de desprecintar el vial y utilizar micropipeta con tips plásticos para esta toma, de manera de evitar posibles competidores en la marcación.

Tabla 26. Porcentaje de las especies presentes en el crudo de reacción y en su purificado al utilizar distintas partidas de $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ c.a.

$^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$	Act (MBq)	111	248	142
	A_s (GBq/mg)	368	501	736
	Relación molar: precursor / ^{177}Lu	155	69	121
	Relación molar: precursor / Lu total	14	8	22
Crudo	^{177}Lu libre	4.8	33.7	37.0
	$^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11ox}$	1.6	1.6	1.7
	$^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$	92.8	64.7	61.3
Purificado	^{177}Lu libre	-	0.2	0.0
	$^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11ox}$	-	2.0	1.3
	$^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$	-	97.8	98.7

Aun así, los marcados con bajo rendimiento de marcación pudieron purificarse por extracción en fase sólida con Sep-Pak C18 plus, lográndose reducir o eliminar el ^{177}Lu libre, obteniendo así una PRQ > 97%. El rendimiento de purificación fue de 34% y 38% para el segundo y tercer caso respectivamente, tomando como actividad inicial (100%) la medida previa a la marcación sin corregir por decaimiento (ndc). La A_m que alcanzó el $^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-H2-MG11}$ en los purificados fue de 3.5 MBq/nmol y 2.2 MBq/nmol respectivamente, en tanto la A_m obtenida en el primer caso (sin purificación) fue de 4.3 MBq/nmol.

Los resultados obtenidos en este ensayo inicial hicieron necesario mejorar la marcación y eventualmente la purificación de esta molécula marcada, de manera de obtener finalmente un radiotrazador para terapia con una pureza radioquímica mínima de 95%, con el mayor rendimiento de marcación posible.

7.3.3. Optimización de la marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

7.3.3.1. Tiempo de marcación

En los tres tiempos de incubación a 80°C se obtuvo una incorporación de ¹⁷⁷Lu ≥ 95%, presentando una relación de moles de precursor respecto a moles de ¹⁷⁷Lu de (65-69) y respecto a moles de Lu total de (11-12), según la A_s del [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ c.a. La mayor incorporación de ¹⁷⁷Lu (98%) se obtuvo a partir de los 20 min de incubación a 80°C (Figura 85), obteniendo para ese tiempo una A_m del [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11 de 9.6 MBq/nmol (PRQ = 86%).

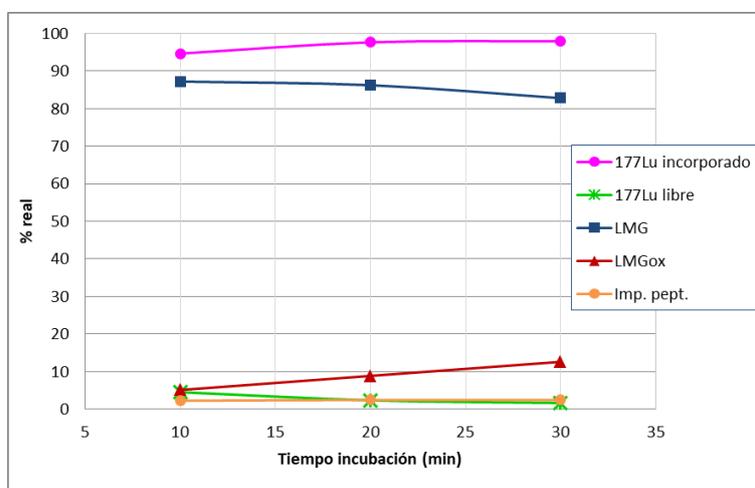


Figura 85. Incorporación del ¹⁷⁷Lu al DOTA-péptido (y especies presentes) a t = 0 según el tiempo de incubación a 80°C.

Un tiempo de 10 min consiguió una incorporación menor (95%) y un tiempo de 30 min no logró aumentar la incorporación, la mantuvo en 98%. No obstante, se observó un aumento de la impureza con el residuo de metionina oxidada LMGoX con el tiempo de incubación, pasando de 5% a 13%, con lo cual se decide continuar utilizando el tiempo de 20 min para el resto de las marcaciones a esta temperatura.

7.3.3.2. Masa de DOTA-H2MG11

En primer lugar se compararon los marcados con igual cantidad de precursor, similar actividad y distinta calidad de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃. Se observó que la incorporación de ¹⁷⁷Lu al DOTA-péptido para las 3 cantidades de precursor ensayadas, fue distinta según el tipo de [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ utilizado (Figura 86(a)). Se obtuvo un aumento en la incorporación de ¹⁷⁷Lu (94% a 100%) al aumentar la

cantidad de precursor (11.9 a 23.8 nmol) para el $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ c.a., lo que parece coherente ya que aumenta el exceso de moles de precursor respecto al Lu total (5 a 11) (Figura 86(b)). Mientras que la incorporación para el $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. se mantuvo en 100% para estas cantidades de precursor, ya que las bajas cantidades presentes de Lu total hacen que el precursor se encuentre en un exceso mayor (36 a 69), favoreciendo la incorporación total.

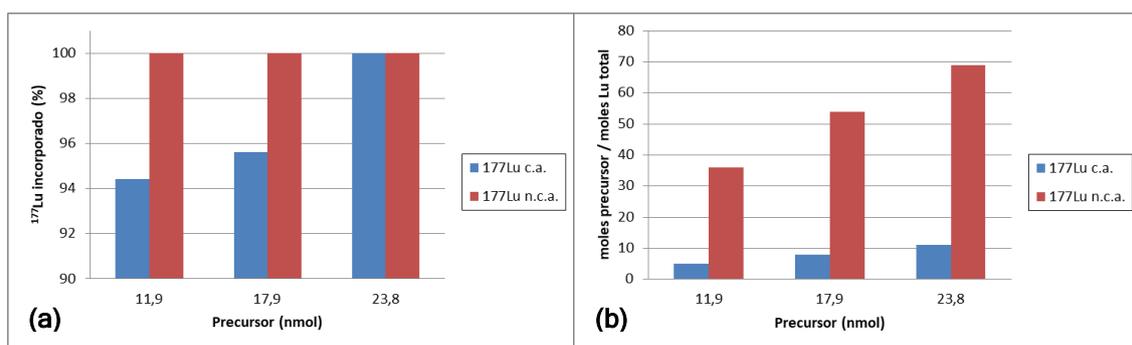


Figura 86. Influencia de la calidad del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ en función de la cantidad de precursor en: (a) la incorporación del ^{177}Lu al DOTA-péptido y (b) la relación molar entre el precursor y el Lu total (^{177}Lu + Lu no radiactivo).

En segundo lugar se estudió la variación de la masa del precursor al utilizar $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ n.c.a. en el marcado. Se obtuvo un aumento en la incorporación de ^{177}Lu (11% a 100%) al aumentar la cantidad de precursor (0.6 a 23.8 nmol) (Figura 87), lo que parece coherente ya que aumenta el exceso de moles de precursor respecto al Lu total (2 a 69) (Figura 88). La mayor parte del ^{177}Lu no incorporado permaneció como ^{177}Lu libre ya que el $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -coloide no superó el 1% en ninguno de los marcados.

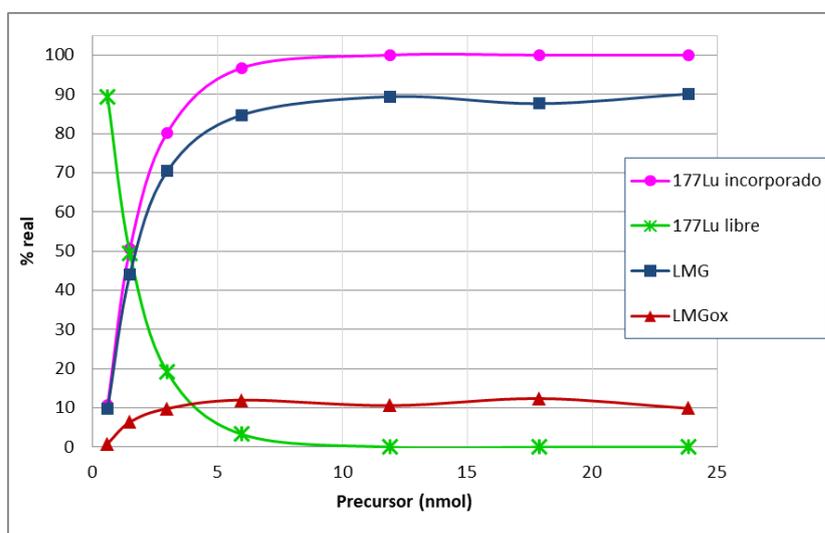


Figura 87. Incorporación del ^{177}Lu al DOTA-péptido (y especies presentes) a $t = 0$ para diferentes cantidades de precursor.

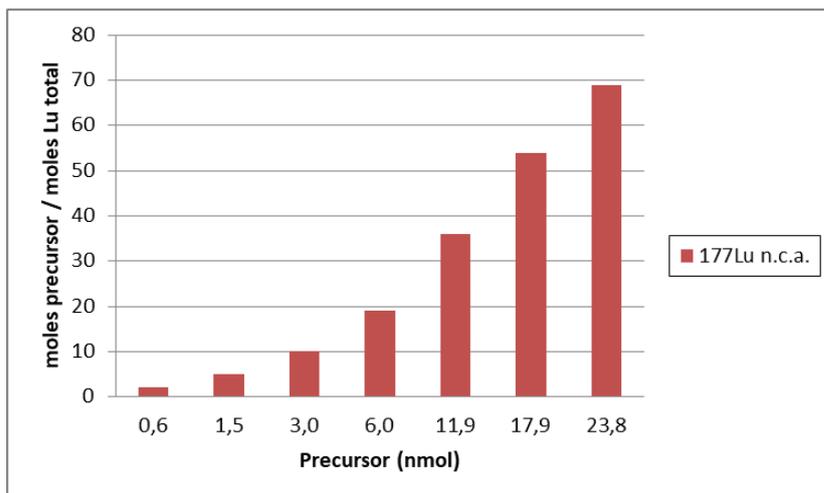


Figura 88. Relación molar entre el precursor y el Lu total (^{177}Lu + Lu no radiactivo) proveniente de $^{177}\text{Lu}]LuCl_3$ n.c.a. para distintas cantidades de precursor.

A partir de 6.0 nmol de precursor se obtuvo una incorporación de ^{177}Lu > 96%, teniendo un exceso de moles de precursor respecto al Lu total > 19. Fue así que la A_m del $^{177}\text{Lu}]Lu\text{-DOTA-H2-MG11}$ estuvo entre 24.0 MBq/nmol para 6.0 nmol (PRQ = 85%) y 7.0 MBq/nmol para 23.8 nmol (PRQ = 90%).

7.3.3.3. Buffer ASAG y temperatura de marcación

El cambio del Buffer ASAG (0.4-0.24) con pH 4.0-4.5 por el Buffer ASAG (0.8-0.24) con pH 4.5-5.0, junto con el aumento de temperatura de marcación (75°C a 92°C) y disminución del tiempo de incubación (20 min a 15 min), optimizado previamente para $^{177}\text{Lu}]Lu\text{-DOTA-TATE}$ [106], no modificó la incorporación de ^{177}Lu al DOTA-péptido, ya que en ambos marcados se obtuvo un 100%. Sin embargo la PRQ de LMG disminuyó de 89% a 80% debido principalmente a un aumento de las impurezas peptídicas (0% a 8%), no considerando al LMGox que apenas aumentó de 11% a 12% (Figura 89).

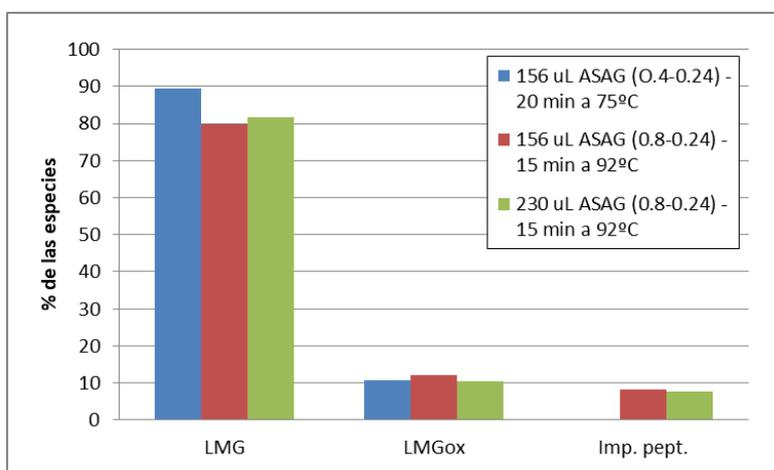


Figura 89. Influencia del Buffer ASAG (composición y volumen) junto con la temperatura y el tiempo de incubación, en el % de las especies encontradas a $t = 0$.

Este aumento de todas las impurezas peptídicas, exceptuando la oxidación del residuo de metionina (LMGox), podría ser debido al aumento de temperatura, de la misma forma que ocurrió en la marcación de la molécula con ^{68}Ga (sección 6.3.4.1). Lo que provocaría un aumento de los radicales libres (producidos por la radiolisis del agua) y la velocidad de reacción entre estos y la molécula de LMG, originando una variedad de productos secundarios.

El segundo cambio que se introdujo fue el incremento de volumen del nuevo Buffer ASAG (0.8-0.24), de manera de aumentar el volumen de reacción (en un 40%) y la cantidad del antioxidante ácido gentsísico (en un 47%), con el objetivo de disminuir los productos secundarios generados por los radicales libres. En consecuencia los moles de AG utilizados en el marcado aumentaron de 3.7×10^{-5} a 5.5×10^{-5} , con lo que la relación final de moles AG / precursor aumentó de ~ 3100 a 4600 (para 11.9×10^{-9} moles de precursor). A pesar de este mayor exceso de AG, la incorporación de ^{177}Lu al precursor apenas disminuyó de 100% a 99.8%, por lo que no habría competencia entre el AG y el DOTA-H₂-MG11 por el ^{177}Lu en estas condiciones. La PRQ de LMG aumentó muy poco, de 80% a 82% debido a una disminución de LMGox (12% a 11%) ya que el resto de las impurezas peptídicas permaneció en 8% (Figura 89). Por lo que ni la dilución ni el aumento del antioxidante lograron disminuir el total de impurezas peptídicas a tiempo inicial. Luego, al estudiar la estabilidad del último marcado se pudo apreciar una notoria disminución de LMG con el tiempo, desde 82% a tiempo inicial hasta casi desaparecer (0.4%) a los 7 días post-marcado (Figuras 90 y 91).

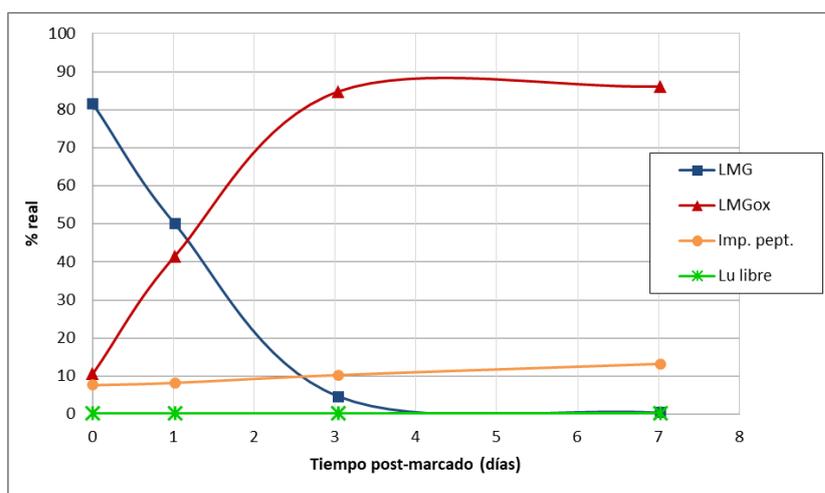


Figura 90. Evolución de las distintas especies con el tiempo para el marcado con 230 μL de Buffer ASAG (0.8-0.24) e incubación a 92°C durante 15 min.

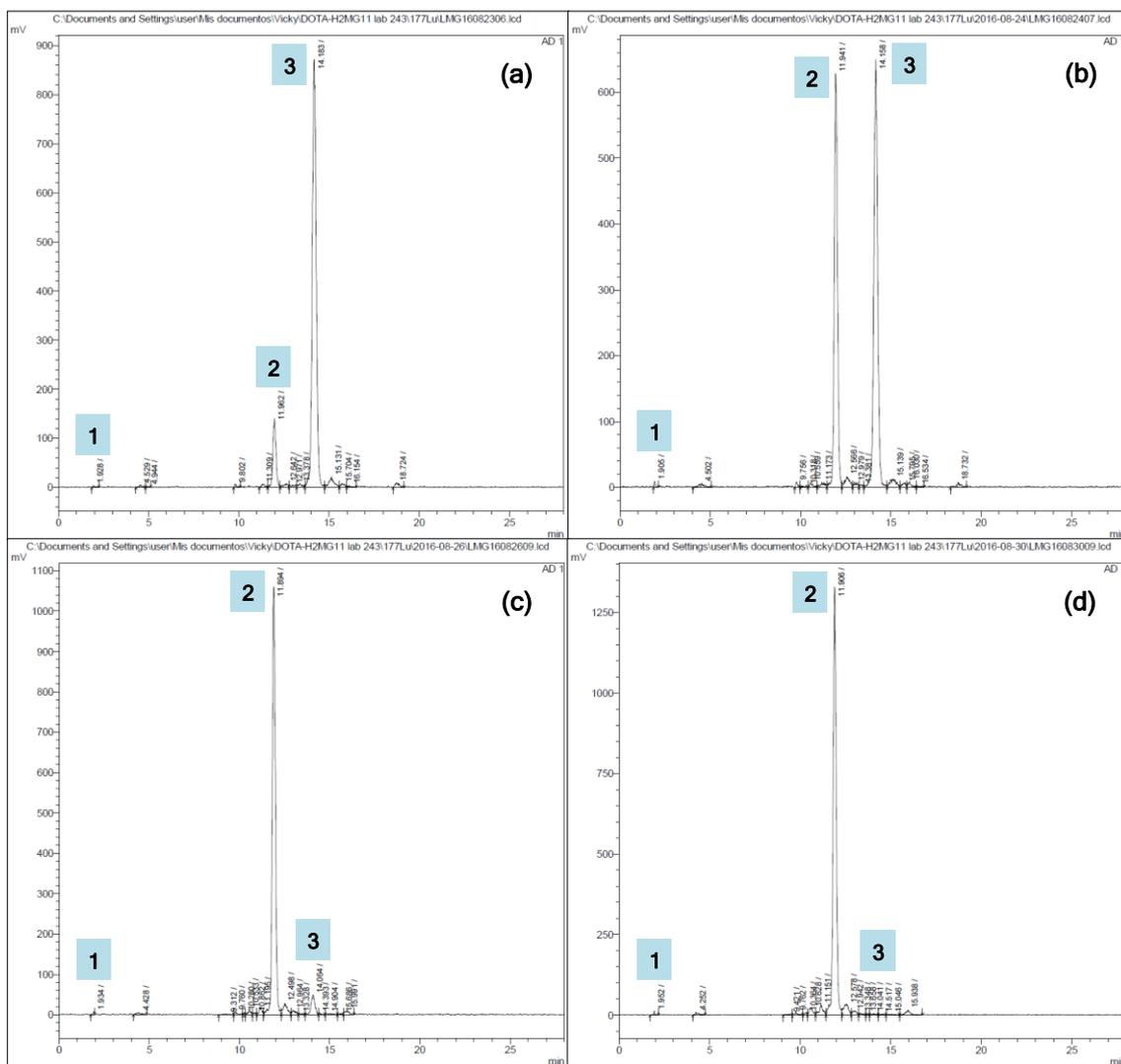


Figura 91. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado con 230 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.24) e incubación a 92°C durante 15 min a distintos tiempos post-marcado: (a) 5 min, (b) 1.0 d, (c) 3.0 d y (d) 7.0 d.

Esta disminución de la molécula de interés fue debida casi exclusivamente a la oxidación del residuo de metionina, ya que se obtuvo un aumento de LMGox de 11% a 86% en el período de tiempo estudiado ($\sim 1 T_{1/2}$). En tanto las otras impurezas peptídicas apenas aumentaron de 8% a 13% y el ^{177}Lu libre de 0.2% a 0.3%, sin llegar a detectar ^{177}Lu Lu-coloide en esos 7 días. El estudio de estabilidad para el marcado con menor volumen de Buffer ASAG (0.8-0.24) e iguales condiciones de incubación dio muy similar, pero para el primer marcado con Buffer ASAG (0.4-0.24) a 75°C por 20 min este estudio no se realizó, por lo que lamentablemente no se puede realizar la comparación.

Aunque los mejores resultados se obtuvieron a 75°C, se eligió continuar con la marcación que utiliza 230 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.24) e incubación a 92°C

durante 15 min, de manera de tener presentes todas las impurezas peptídicas desde $t = 0$, y así estudiar qué otros cambios aumentan o disminuyen las mismas, con el propósito de conocer mejor el sistema.

7.3.3.4. Agregado de L-metionina como antioxidante

El agregado de L-metionina 13.4 mM o del mismo volumen de agua previo al calentamiento, no modificó la incorporación de ^{177}Lu al DOTA-péptido, ya que se obtuvo 100% y 99.9% respectivamente, mientras que en el marcado sin agregados se alcanzó un 99.8%. Sin embargo la PRQ de LMG se vio positivamente afectada, ya que aumentó de 82% a 89% cuando se pasó de “sin dilución” a “con dilución” por el simple agregado de agua, y a 91% cuando se agregó L-metionina. Esto fue debido principalmente a la disminución de LMGox (11%, 4% y 2% respectivamente), ya que las impurezas peptídicas no disminuyeron tanto (8%, 7% y 6% respectivamente) (Figura 92).

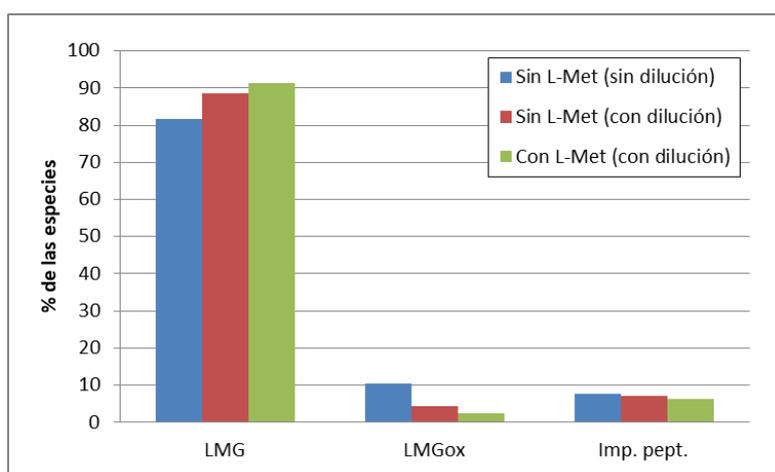


Figura 92. Influencia de la dilución y el agregado de L-Met 13.4 mM pre-marcado, en el % de las especies encontradas a tiempo inicial.

Por tanto, la dilución tuvo un efecto importante en la disminución de la oxidación del residuo de metionina del péptido, y el agregado del aminoácido L-metionina logró inhibir aún más esta reacción, por lo menos a tiempo inicial. Ahora, al estudiar la estabilidad de estos marcados se pudo apreciar que el efecto de la dilución tuvo buen resultado a tiempo inicial, pero al igual que el marcado “sin dilución”, el LMG presentó una notoria disminución con el tiempo, un poco más lenta pero con el mismo resultado final, comenzando con 89% a tiempo inicial hasta casi desaparecer (2%) a los 7 días post-marcado (Figura 93(a) y (b)). Esto fue debido casi exclusivamente a la oxidación del residuo de

metionina, ya que el LMGoX aumentó de 4% a 84% en ese tiempo. En tanto las otras impurezas peptídicas aumentaron poco, de 7% a 13%, y el ^{177}Lu libre de 0.1% a 0.5%, sin llegar a detectar ^{177}Lu Lu-coloide en los 7 días.

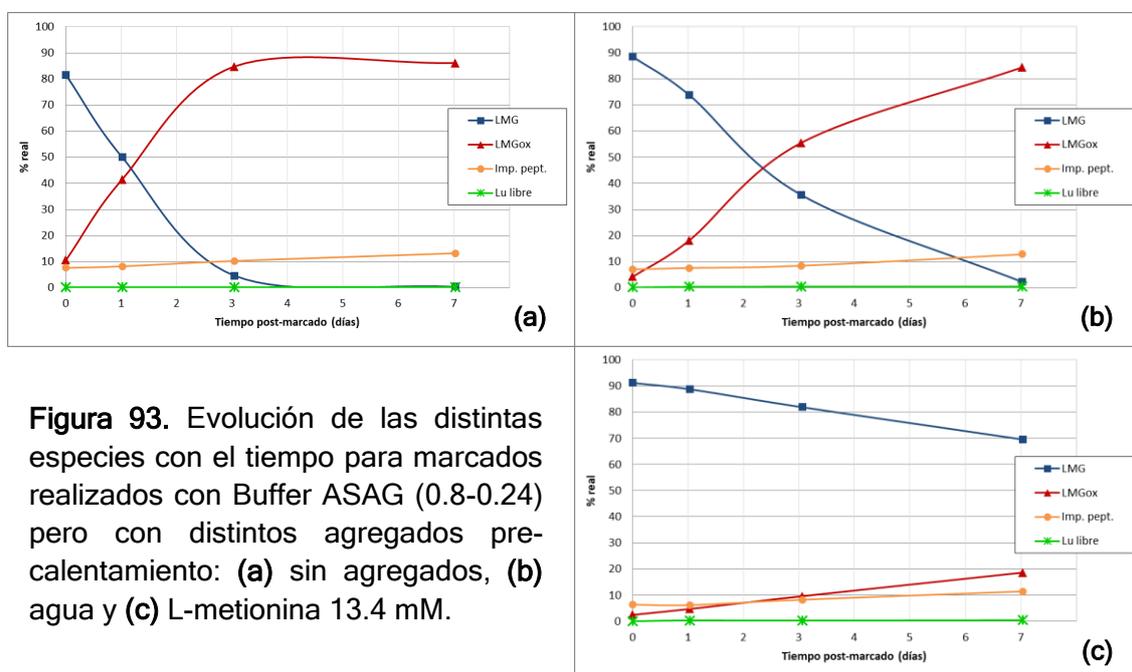


Figura 93. Evolución de las distintas especies con el tiempo para marcados realizados con Buffer ASAG (0.8-0.24) pero con distintos agregados pre-calentamiento: (a) sin agregados, (b) agua y (c) L-metionina 13.4 mM.

Por otro lado, el agregado de L-metionina previo al marcado tuvo un impacto positivo en la estabilidad del LMG, ya que este se redujo bastante menos respecto a los anteriores, de 91% a 70% en los 7 días de estudio (Figuras 93(c) y 94). Esta disminución también se debió principalmente a la oxidación del residuo de metionina, ya que el LMGoX aumentó de 2% a 19% en ese tiempo. Mientras que las otras impurezas peptídicas aumentaron poco, de 6% a 11%, y el ^{177}Lu libre de 0% a 0.4%, sin llegar a detectar ^{177}Lu Lu-coloide en ningún momento. Por lo tanto, el agregado de L-metionina pudo controlar bastante la oxidación del residuo de metionina del precursor, pero casi no tuvo efecto en la formación de otras impurezas peptídicas.

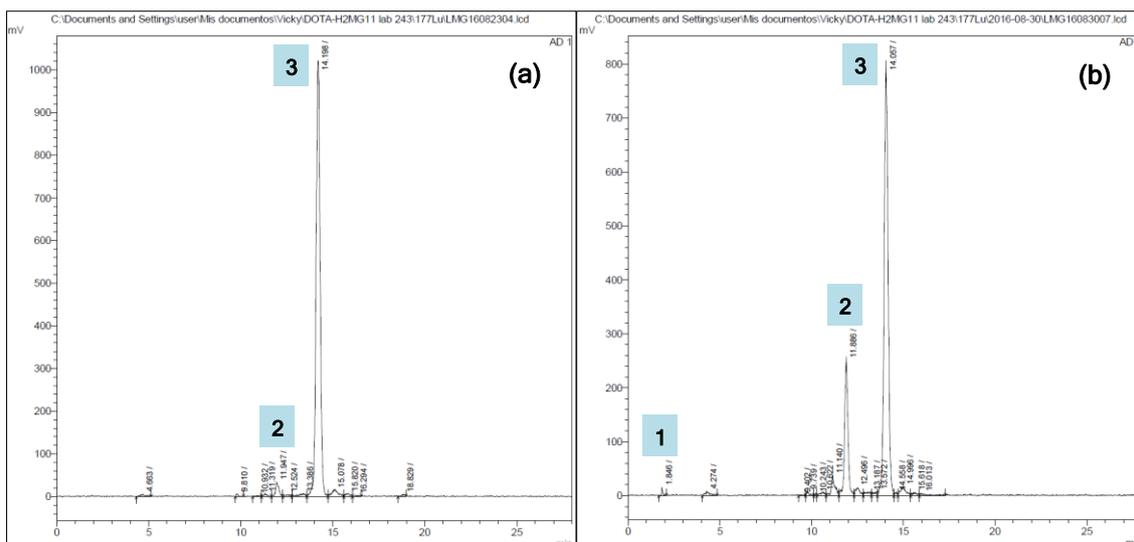


Figura 94. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1, detección γ) del marcado con L-metionina 13.4 mM a distintos tiempos post-marcado: (a) 5 min y (b) 7.0 d.

Al disminuir la masa de precursor desde 11.9 nmol hasta 6.0 nmol en presencia de L-metionina no se apreció ningún cambio, ya que la incorporación de ^{177}Lu al DOTA-péptido estuvo en (100-99)%, el LMG en (91-92)%, el LMGox en (2-3)% y las impurezas peptídicas en 6% (Figura 95), sin detección de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -coloide. Por lo cual la L-metionina agregada en esas condiciones no afectó la incorporación de ^{177}Lu a la molécula precursora, y además mejoró la PRQ de la molécula de interés respecto a la no utilización de este aminoácido, tal como puede verse si se compara con la Figura 87. De esta manera se consiguió una A_m del $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-H2-MG11 de 22.8 MBq/nmol para 6.0 nmol con una PRQ = 91%.

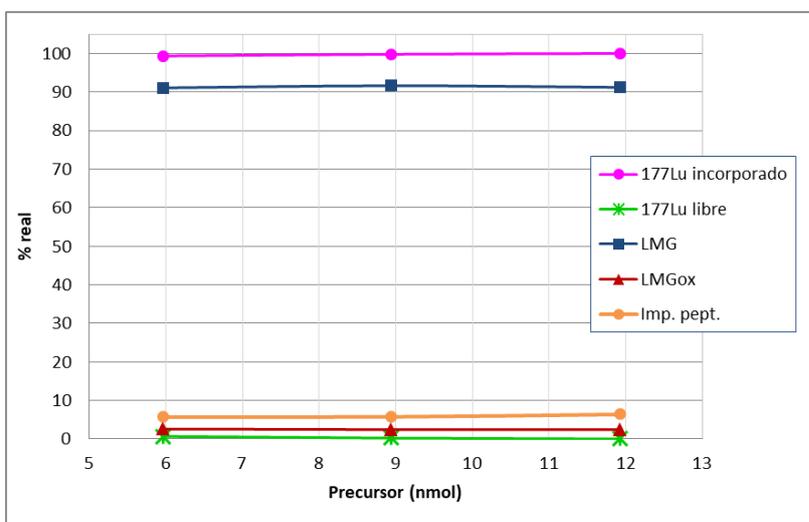


Figura 95. Incorporación del ^{177}Lu al DOTA-péptido (y especies presentes) a $t = 0$ para diferentes cantidades de precursor en presencia de L-metionina 13.4 mM.

Con la intención de disminuir aún más todas las impurezas generadas por el efecto de las radiaciones ionizantes, se estudió aumentar la cantidad de los antioxidantes en la marcación, por volumen o concentración. El aumento de los volúmenes del Buffer ASAG (0.8-0.24) y de la L-metionina 13.4 mM no consiguió disminuir mucho las impurezas, ya que el LMGoX se mantuvo en 2% y el resto de las impurezas peptídicas apenas disminuyó de 6% a 5% (Figura 96: azul vs. rojo). Sin embargo el LMG disminuyó de 92% a 90% debido a que disminuyó la incorporación del ^{177}Lu al DOTA-péptido (de 99.8% a 97.0%), exclusivamente por aumento de ^{177}Lu libre ya que tampoco se detectó ^{177}Lu -coloide. Esta disminución en la incorporación del ^{177}Lu podría explicarse por el aumento de volumen de marcación (casi el doble), lo que disminuiría la velocidad de marcación.

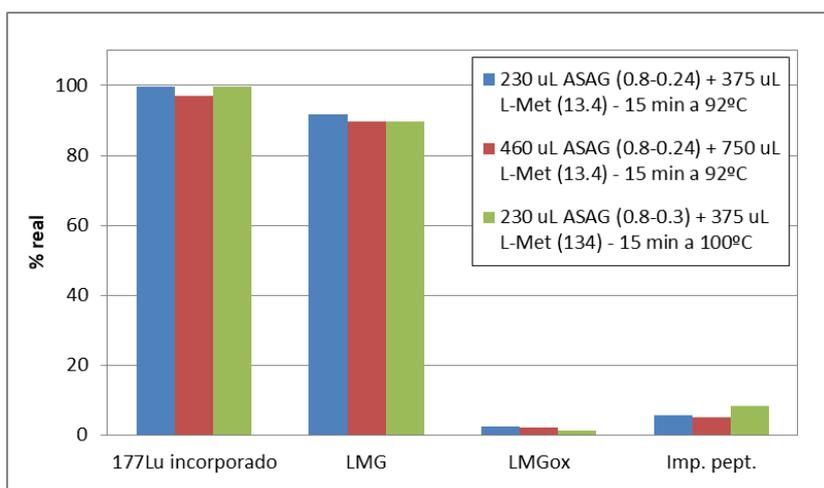


Figura 96. Influencia del aumento de los dos antioxidantes en la marcación (volumen o concentración), en el % de incorporación de ^{177}Lu y de las especies encontradas a tiempo inicial.

Para el aumento de la concentración de los antioxidantes se debió tener en cuenta que el ácido gntísico está contenido en la solución Buffer ASAG, por lo que si este ácido aumenta mucho, el pH del Buffer disminuye. Por ello se decidió aumentar la concentración del ácido gntísico de 0.24 M a 0.30 M, de manera de que junto con el NaOAc 0.8 M el pH del Buffer fuera de 4.5-5.0. Se descartó aumentar de forma proporcional la concentración de los dos componentes del Buffer ASAG, ya que ambos podrían competir con el DOTA-péptido por el ^{177}Lu . El aumento de la concentración de L-metionina de 13.4 mM a 134 mM no tuvo efecto en el pH final de la mezcla de reacción. El aumento de la concentración de los dos antioxidantes en la marcación no modificó la incorporación del ^{177}Lu (de 99.8% a 99.6%), y además disminuyó en

cierto grado la oxidación en el residuo de metionina, ya que el LMGox pasó de 2% a 1% (Figura 96: azul vs. verde). Sin embargo el LMG disminuyó de 92% a 90% debido a que aumentaron el resto de las impurezas peptídicas (de 6% a 8%). Este aumento de impurezas probablemente esté asociado con el aumento de la temperatura de incubación (92°C a 100°C) más que con el aumento de la concentración de antioxidantes, el hecho de no haber realizado este último marcado a 92°C lamentablemente no permitirá verificarlo.

7.3.4. Marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA

La primera marcación realizada produjo un único pico en el HPLC (Gradiente 1), con un $t_R = 4.8$ min (99.7%) que se diferencia ampliamente del ¹⁷⁷Lu libre (inyección de ¹⁷⁷LuCl₃) con un $t_R = 1.9$ min (0.3%), según se aprecia en la Figura 97(a). A su vez, la cromatografía en iTLC-SG con la fase móvil NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20) permitió corroborar el éxito del marcado del anillo DOTA, ya que se obtuvo un único pico que migró con el frente del solvente ($t_R = 4.6$, $R_f = 1.0$) (Figura 97(b)), diferenciándose bien del ¹⁷⁷Lu libre y del [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide que permanecen en el origen en este sistema ($R_f = 0.1$).

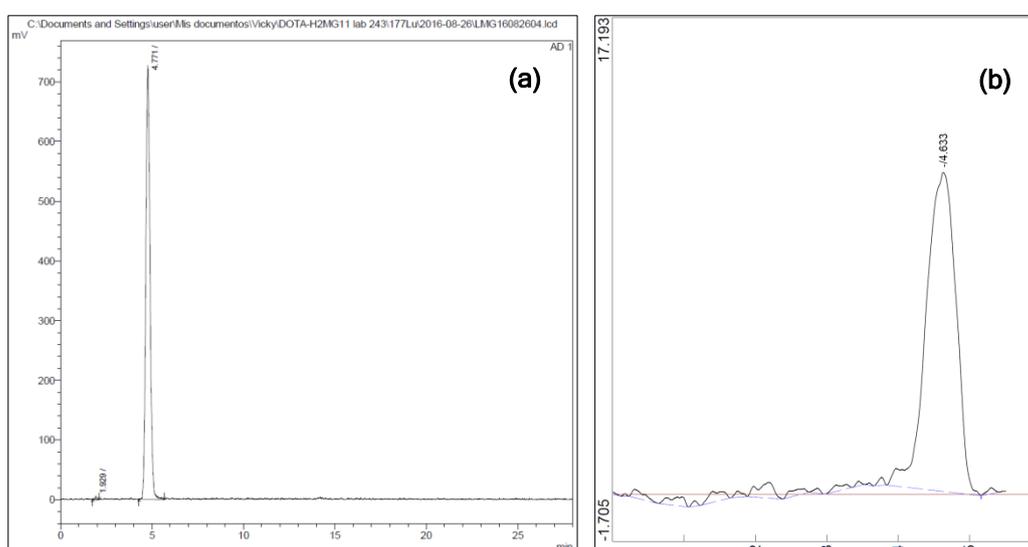


Figura 97. Cromatogramas obtenidos del marcado de DOTA con ¹⁷⁷Lu según (a) HPLC (Gradiente 1, detección γ) y (b) iTLC-SG utilizando la fase móvil NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20).

Por tanto, los pequeños picos con $t_R \sim 4.5$ min que aparecen en los cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 1), que se aprecian por ejemplo en las Figuras 83, 91 y 94, podrían deberse al [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA, por lo

que fueron asignados a este y considerados dentro del grupo de “otras impurezas peptídicas”. El $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}$ no se asignó al grupo de ^{177}Lu libre porque se vio que este último, además de poseer un pico mayoritario con $t_R = 1.9$ min, podía presentar pequeños picos con t_R hasta 2.3 min.

En tanto, en la segunda marcación realizada de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}$ se detectaron dos picos en el HPLC (Gradiente 3), con $t_R = 1.5$ min (72%) y $t_R = 2.1$ min (28%) (Figura 98(a)), siendo el primero coincidente con el t_R del ^{177}Lu libre (inyección de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$). Sin embargo, la cromatografía en iTLC-SG con la fase móvil $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:10:20) permitió comprobar que el quelante DOTA se había marcado con éxito, ya que se obtuvo un único pico que migró con el frente del solvente ($t_R = 4.6$, $R_f = 1.0$) (Figura 98(b)), diferenciándose bien del ^{177}Lu libre y del $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-coloide}$ que permanecen en el origen en este sistema ($R_f = 0.1$).

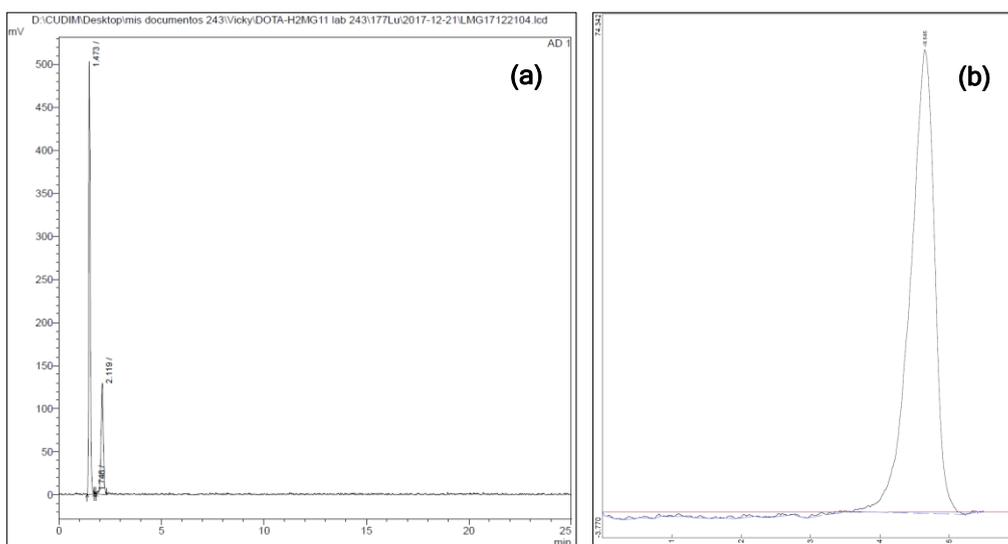


Figura 98. Cromatogramas obtenidos del marcado de DOTA con ^{177}Lu según (a) HPLC (Gradiente 3, detección γ) y (b) iTLC-SG utilizando la fase móvil $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:10:20).

Así pues, en el sistema de HPLC (Gradiente 3) no se pudo distinguir el $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}$ del ^{177}Lu libre, por lo que el primero fue considerado dentro del grupo del ^{177}Lu libre, aunque en realidad este no lo sea. Vale la pena aclarar que el grupo correspondiente a ^{177}Lu libre en este sistema de HPLC, fue asignado a los picos con t_R entre 1.5 min y 2.6 min, porque estas especies son las que están presentes en el blanco de reacción de marcación de DOTA-H2-MG11, tal como se detallará en la próxima sección.

7.3.5. Efecto de los antioxidantes en la marcación de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOA-H2-MG11

En primer lugar se analizaron por HPLC (Gradiente 3) el ¹⁷⁷LuCl₃ en HCl 0.04 M (Figura 99(a)) y el blanco de reacción para el marcado conteniendo los dos antioxidantes (M1) (Figura 99(b)). Aunque el pico mayoritario presentó un t_R similar (~ 1.5 min), se apreció un ensanchamiento del mismo en el blanco de reacción, probablemente por la presencia de los iones acetato y gentisato que puedan formar complejos débiles con el ¹⁷⁷Lu. Es por ello que los picos con t_R entre 1.5 min y 2.6 min se asignaron como ¹⁷⁷Lu libre. Además el blanco de reacción, al igual que el ¹⁷⁷LuCl₃, presentó un R_f ~ 0 en el sistema de TLC.

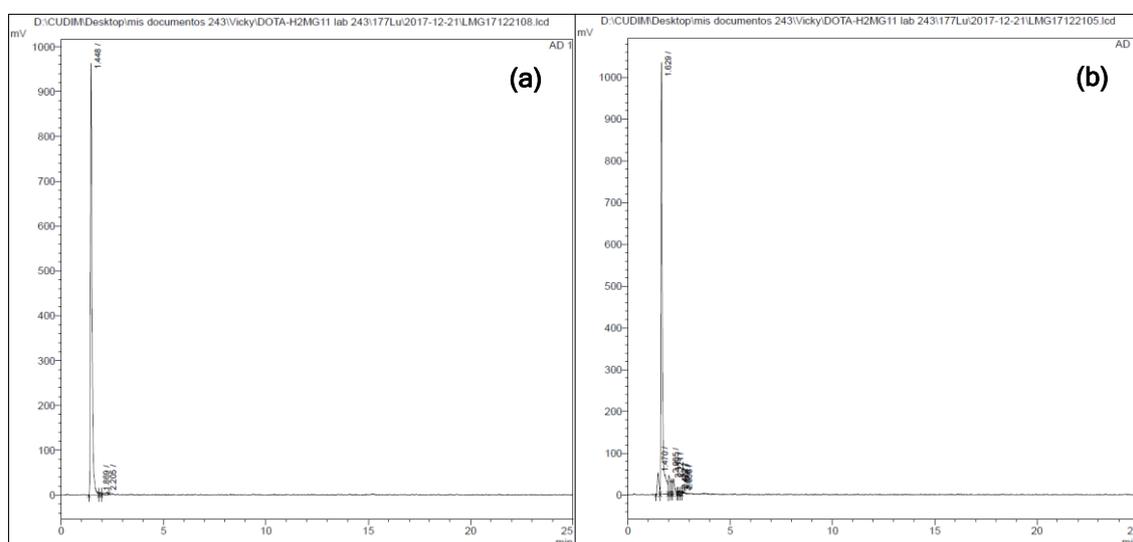


Figura 99. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) de: **(a)** ¹⁷⁷LuCl₃ en HCl 0.04 M y **(b)** blanco de reacción del marcado M1 con los dos antioxidantes.

Teniendo esto presente, se analizaron los 4 marcados con distinta combinación de antioxidantes a tiempo inicial. En todos se alcanzó una alta incorporación de ¹⁷⁷Lu (99%), sin llegar a detectar [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide. Esto a pesar de que las relaciones de moles de los antioxidantes respecto al precursor fueron muy altas (AG / precursor ~ 7700 y L-metionina / precursor ~ 5600), comparadas con la relación de moles ¹⁷⁷Lu / precursor (~ 1/47), por lo que habría poca competencia entre los antioxidantes con el quelante DOTA por el ¹⁷⁷Lu. Además, se obtuvieron resultados similares para los marcados M4 (sin antioxidantes) y M3 (conteniendo sólo ácido gentísico), resultando 80% de LMG, 9% de LMGox y 10% de impurezas peptídicas (Figura 100(a) y (c)).

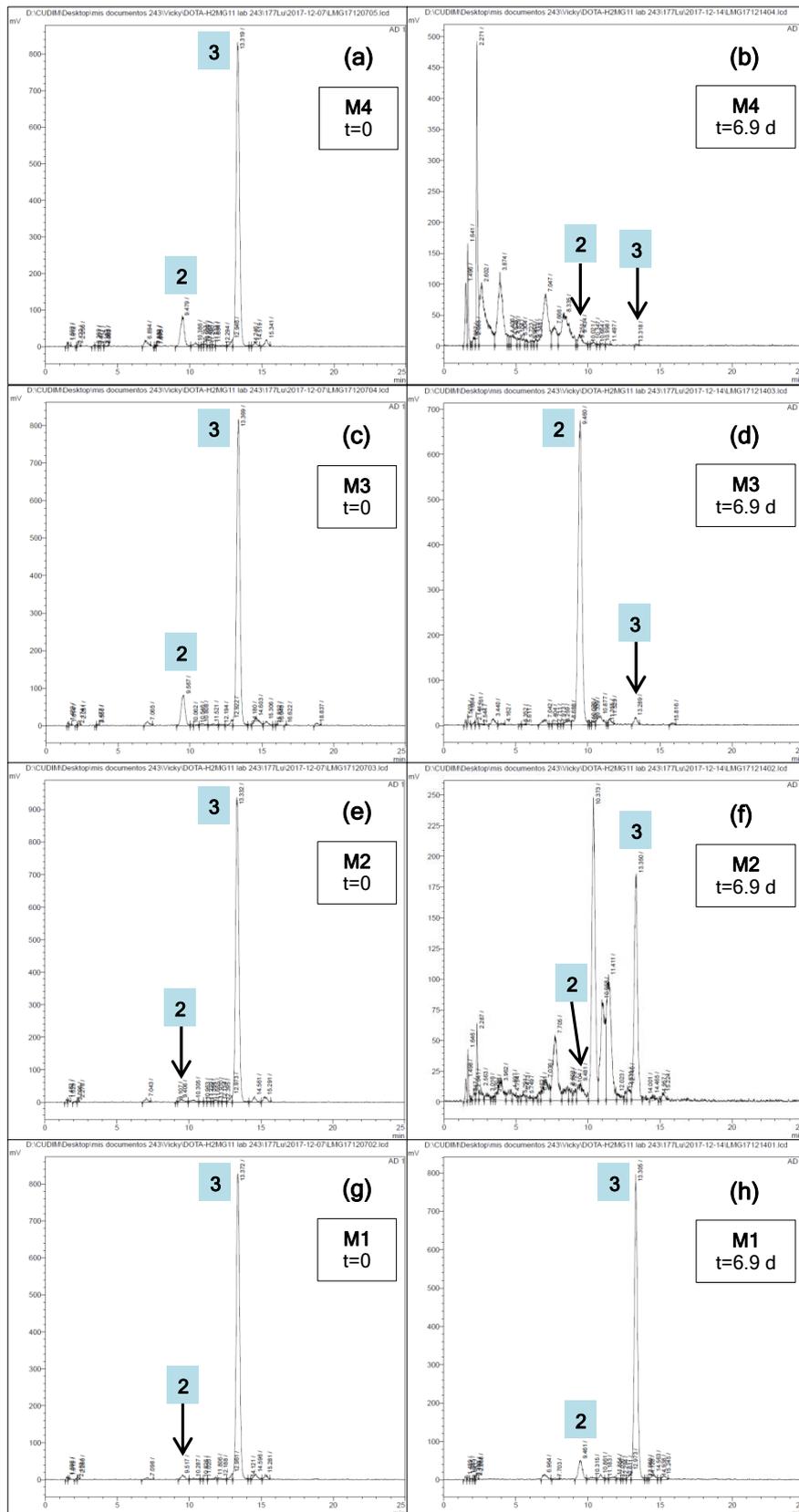


Figura 100. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) para $t = 0$ y $t = 6.9$ días de los distintos marcados: **(a, b)** sin antioxidantes, **(c, d)** con ácido gentsísico, **(e, f)** con L-metionina y **(g, h)** con ácido gentsísico y L-metionina.

Mientras que para los marcados M2 (conteniendo sólo L-metionina) y M1 (conteniendo ácido gntísico + L-metionina) se obtuvieron mejores resultados y también similares entre ellos, alcanzando 90% de LMG, 1-2% de LMGoX y 8-7% de impurezas peptídicas (Figura 100(e) y 100(g)). Por tanto, la presencia de L-metionina desde el inicio del calentamiento consiguió disminuir la principal impureza (LMGoX) debida a la oxidación del residuo de metionina del precursor, y en consecuencia, aumentar el porcentaje inicial de la molécula de interés. Asimismo permitió disminuir un poco la presencia de otras impurezas peptídicas probablemente debidas también a procesos de oxidación.

Al analizar en detalle los cromatogramas obtenidos por HPLC a lo largo del tiempo, se distinguieron 6 picos con t_R tempranos ($t_R = 1.5-2.6$ min) que se asumieron como ^{177}Lu libre, y a la suma de estos se le denominó ^{177}Lu libre total. Este presentó un valor de $\sim 1\%$ en los cuatro marcados a $t = 0$, que en 6.9 días se incrementó levemente a 2-3% en los dos marcados conteniendo ácido gntísico (Figura 100(d) y 100(h)), mientras que aumentó a 5% en el marcado conteniendo L-Metionina (Figura 100(f)). En tanto, ascendió a 43% en el marcado sin antioxidantes (Figura 100(b)) debido a la inestabilidad de las moléculas peptídicas marcadas que liberaron ^{177}Lu a lo largo del tiempo (Figura 101(a)-(d): verde). A pesar de eso, no se detectó $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -coloide en ninguno de los marcados en todo el período estudiado.

El primer pico con t_R de 1.5 min aumentó en cantidades apreciables sólo en M4, de 0.3% a 4% en 6.9 días. Se asignó en principio a la especie $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$, por coincidir con su t_R , pero al no detectarla por TLC (con $R_f \sim 0$) podría en principio descartarse su presencia en todos los marcados. Sin embargo, otra especie que presentó el mismo tiempo de retención en este sistema de HPLC pero con $R_f \sim 1$ en el sistema de TLC fue el $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA, por lo que podría estar presente en M4 como producto de radiolisis. La especie con t_R de 1.7 min aumentó levemente con el tiempo, observándose el mayor incremento en M4 de 0 a 6.9 días (0.3% a 4%). El hecho de que este fuera el pico mayoritario en el blanco de reacción, podría indicar que se deba a la especie $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -acetato, complejo débil que mantiene en solución al ^{177}Lu liberado por radiolisis del anillo DOTA. El pico con $t_R = 2.3$ min fue una de las principales especies dentro del grupo de ^{177}Lu libre, teniendo el mayor incremento con el tiempo en

ausencia de antioxidantes, alcanzando el 16% a los 6.9 días en M4. También la especie con $t_R = 2.6$ min fue predominante en M4, incrementándose con el tiempo hasta alcanzar el 18% a los 6.9 días. Estos dos componentes ($t_R = 2.3$ y 2.6 min) presentaron un $R_f \sim 1$ en el sistema de TLC y se lograron controlar con el agregado de antioxidantes, siendo más efectivo el ácido gáltico. Este hecho sugiere que dichas especies podrían ser producto de una importante degradación de la molécula marcada con ^{177}Lu causada por radiolisis.

En tanto, la molécula de interés fue disminuyendo con el tiempo para todos los marcados pero con una cinética diferente, alcanzando una mayor estabilidad en presencia de antioxidantes según el siguiente orden: $M1 > M2 > M3 > M4$, persistiendo a los 6.9 días los siguientes porcentajes de la misma: $81 > 18 > 2 > 0.1$ (Figura 101(a)-(d): azul).

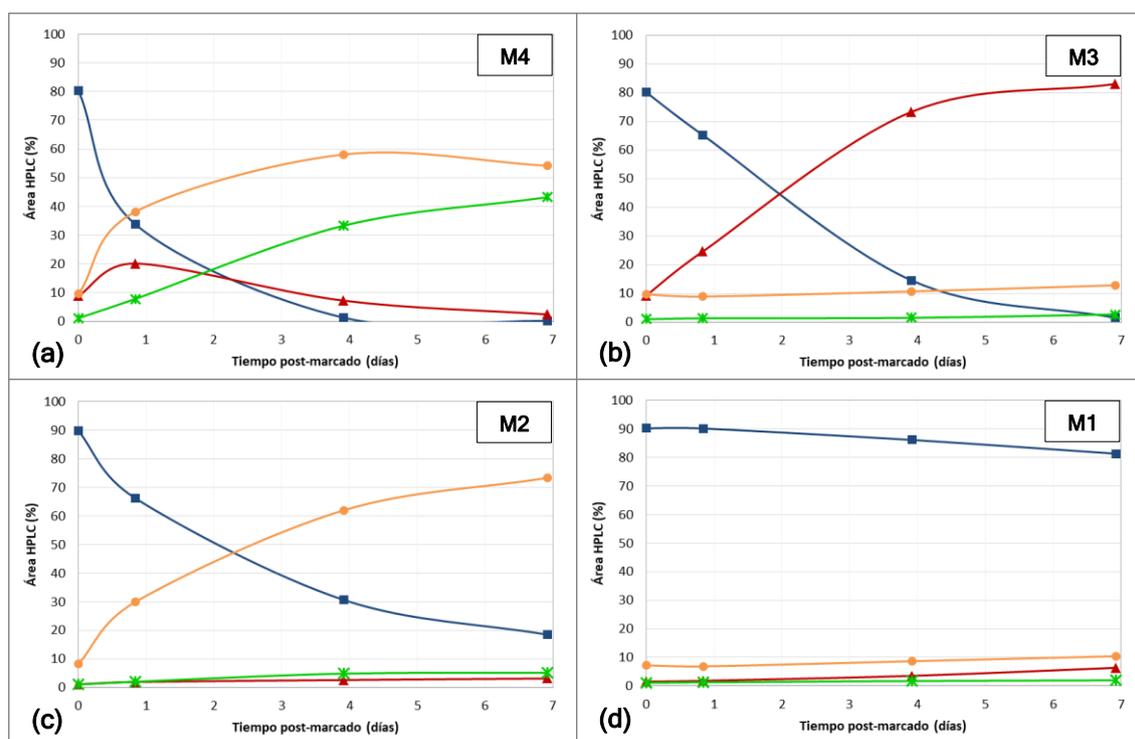


Figura 101. Evolución de LMG (■ azul), LMGox (▲ rojo), impurezas peptídicas (● naranja) y ^{177}Lu libre total (× verde) en las diferentes condiciones con el tiempo: (a) sin antioxidantes, (b) con ácido gáltico, (c) con L-metionina y (d) con ácido gáltico y L-metionina.

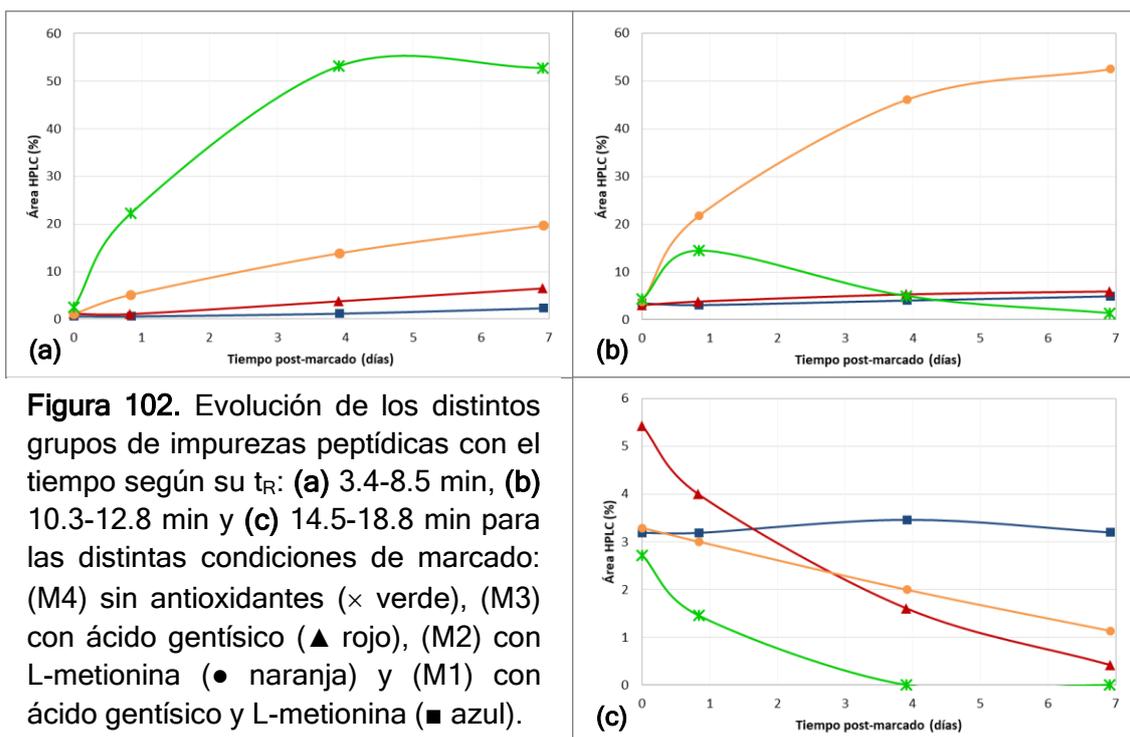
Según puede verse en la Figura 101(a)-(d): rojo, la impureza LMGox aumentó muy poco en M1 y M2, alcanzando los valores de 6% y 3% respectivamente, a los 6.9 días de estudio. Sin embargo, en M3 aumentó de tal manera que pasó a ser la molécula predominante, alcanzando el 83% a los 6.9 días, cercano a la

suma de LMG y LMGoX obtenida a $t = 0$ (89%). Mientras que en M4 presentó un máximo de 20% a los 0.8 días, disminuyendo luego al 2% a los 6.9 días, lo que indicaría la formación de esta impureza en las primeras horas con posterior destrucción en las siguientes.

Asimismo, la evolución de las impurezas peptídicas puede apreciarse en la Figura 101(a)-(d): naranja. Estas impurezas aumentaron muy poco a los 6.9 días en M1 y M3, alcanzando los valores de 10% y 13% respectivamente. No obstante, en M2 aumentaron de tal manera que pasaron a predominar a los 3.9 días, hasta llegar a un valor de 73% a los 6.9 días. Mientras que en M4 comenzaron a ser predominantes a los 0.8 días, presentando un máximo a los 3.9 días (58%) y permaneciendo casi constantes a los 6.9 días post-marcado. De esta manera parecería que las impurezas peptídicas se acentuaron con cierta similitud en M2 y M4 con el transcurso del tiempo, mientras que en M1 y M3 no presentaron mucho cambio. Sin embargo, al estudiarlas con más detalle se consiguió apreciar ciertas diferencias. Con este propósito, estas impurezas fueron clasificadas en 3 grupos, de acuerdo a sus tiempos de retención por HPLC:

- t_R 3.4-8.5 min (previos al pico de LMGoX),
- t_R 10.3-12.8 min (entre los picos de LMGoX y LMG) y
- t_R 14.5-18.8 min (posteriores al pico de LMG).

Las impurezas peptídicas con menor t_R (3.4-8.5 min) fueron las predominantes en M4 a lo largo del tiempo (Figura 100(b)), aumentando hasta alcanzar el 53% a los 6.9 días (Figura 102(a)), siendo casi el total de impurezas peptídicas presentes en este marcado sin antioxidantes a ese tiempo (54%). Al ser estas las más hidrofílicas, podrían originarse por un daño mayor de las moléculas principales obtenidas a tiempo inicial (LMG y LMGoX), probablemente causado por oxidación, peroxidación, hidroxilación y/o escisión, tanto de las cadenas laterales como del propio esqueleto peptídico. Estas reacciones destructivas podrían ocurrir tanto por la interacción con radicales libres (generados por diversas reacciones entre las radiaciones ionizantes y el medio acuoso de reacción), así como por la directa interacción de la radiación emitida por las propias moléculas radiomarcadas [31, 32, 107, 108].



El análisis pormenorizado de los cromatogramas obtenidos por HPLC de este primer grupo reveló 5 picos principales. Las especies con t_R de 3.9, 7.0 y 8.5 min se destacaron en M4, alcanzando 16%, 13% y 12% respectivamente a los 6.9 días, siendo el ácido gálico el más efectivo en controlar estas impurezas. Por último, la especie con $t_R = 7.7$ min fue la que más se acentuó dentro de este grupo en M2, alcanzando el 8% a los 6.9 días, aunque también pudo reducirse con la adición de ácido gálico en M1.

En tanto, el grupo de impurezas peptídicas con t_R intermedio (10.3-12.8 min) predominó en M2 a lo largo del tiempo (Figura 100(f)), aumentando hasta alcanzar el 53% a los 6.9 días (Figura 102(b)), un valor bastante alto si se considera el total de impurezas peptídicas a ese tiempo en este marcado con agregado de L-metionina (73%). Estas especies podrían ser moléculas con menor daño que las del grupo anterior, originadas por la oxidación, peroxidación y/o escisión de distintas cadenas laterales de la molécula peptídica LMG, sin considerar al residuo de metionina, preservado por el agregado de este mismo aminoácido durante el procedimiento de marcado. Si se tiene en cuenta que los aminoácidos con grupos aromáticos actúan como secuestrantes de radicales libres (“radical scavengers”), y por tanto son

susceptibles a la oxidación [32, 107, 109, 110], tanto la Tirosina (Tyr), el Triptófano (Trp), la Fenilalanina (Phe) y las dos Histidinas (His) presentes en la secuencia del H2-MG11, podrían sufrir diversas modificaciones que podrían explicar varias de las impurezas detectadas en este grupo.

En este segundo grupo de impurezas peptídicas se identificaron 5 picos principales. Las especies con t_R de 10.3, 10.8 y 11.5 min se comportaron entre sí de manera similar con el tiempo dentro de cada marcado. En M2 predominaron y aumentaron en mayor proporción, alcanzando el 25%, 12% y 14% respectivamente a los 6.9 días. Estas podrían ser moléculas con daños menores gracias a la protección proporcionada por la L-metionina, lo que probablemente implique la oxidación de otros aminoácidos. En tanto en M4 presentaron un máximo a los 0.8 días (5-4%), disminuyendo a menos del 1% a los 6.9 días. Esto indicaría la formación de estas 3 impurezas en las primeras horas y su posterior destrucción (Figura 102(b): verde), así como sucede con la cercana impureza LMGox en el mismo marcado (Figura 101(a): rojo). Esto reforzaría la hipótesis de que estas especies podrían ser producto de daños menores de LMG. En cambio, estas tres impurezas aumentaron levemente con el tiempo en M3 y M1, confirmando la eficacia del ácido géntísico para controlarlas.

Por último, las impurezas peptídicas con mayor t_R (14.5-18.8 min) se vieron levemente acentuadas a tiempo inicial en M3 (conteniendo sólo ácido géntísico), alcanzando un 5% (Figura 100(c)). A pesar de su menor cuantía, estas presentaron un comportamiento similar en el tiempo respecto a LMG (Figuras 102(c) y 101(a)-(d): azul). Por lo cual podrían ser moléculas poco dañadas que mantienen cierta similitud con LMG, y su mayor lipofilia podría adjudicarse a modificaciones por agregación a través de enlaces cruzados covalentes o por interacciones hidrofóbicas de las moléculas peptídicas [32, 107].

Este tercer grupo de impurezas peptídicas está compuesto básicamente por 4 picos. El primero y más significativo con un t_R de 14.5 min, ya estaba presente en el precursor en un 1.2% (Figura 39(a)), por lo cual a $t = 0$ se presentó en

todos los marcados, aunque un poco más acentuado en presencia de ácido gentísico (3% en M3).

Por tanto, el agregado de ácido gentísico impidió en gran medida la formación de la mayor parte de las impurezas peptídicas a lo largo del tiempo. Una excepción a esto fue la principal impureza LMGox, que se vio inesperadamente incrementada debido a una oxidación selectiva del residuo de metionina de la molécula marcada, la cual fue efectivamente disminuida por el agregado de L-metionina. Es así que la conjunción de los dos antioxidantes fue lo más efectivo para mejorar tanto el rendimiento de marcado, como la estabilidad de la molécula marcada, la cual resultó muy sensible a la radiación.

7.3.6. Efecto del pH de marcación en presencia de ácido gentísico

En primer lugar se trazaron las curvas de la cantidad de moles agregados de HCl y NaOH que disminuyeron y aumentaron el pH respectivamente, de 200 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.3) (Figura 103). A partir de estas, se determinaron los moles necesarios de HCl para obtener valores de pH de 4.5, 4.0 y 3.5, y los necesarios de NaOH para obtener valores de pH de 5.0, 5.5 y 6.0. Luego, con los moles calculados, se decidió utilizar HCl 5.0 M y NaOH 2.0 M para ajustar el pH de 200 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.3), con lo cual, el mayor volumen necesario para el ajuste fue de sólo 25.0 μ L.

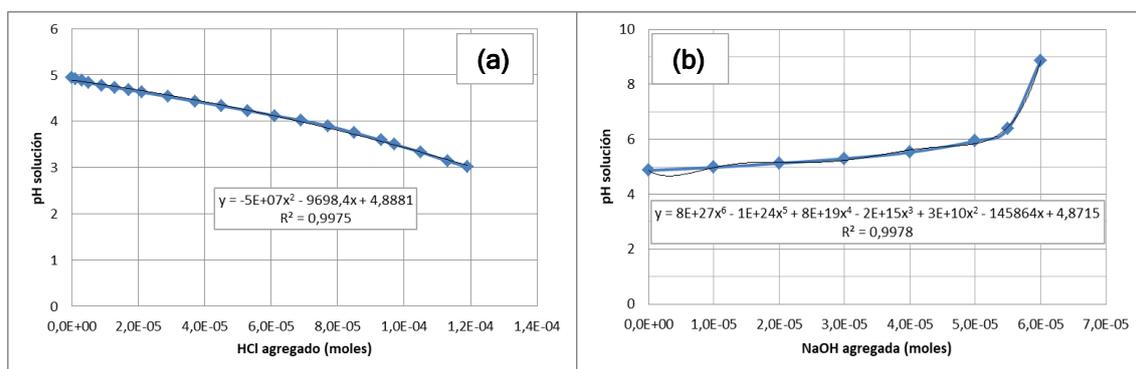


Figura 103. pH de la solución en función del agregado de: (a) HCl 0.1 M o (b) NaOH 0.5 M, a 200 μ L de Buffer ASAG (0.8-0.3).

Se obtuvo una alta incorporación de ^{177}Lu al DOTA-peptido (> 97%) a tiempo inicial en los 7 marcados a distinto pH (3.5-6.0), y no se detectó [^{177}Lu]Lu-

coloide, al utilizar relaciones molares AG / precursor (~ 7350) y ^{177}Lu / precursor ($\sim 1/51$) similares a las del ensayo anterior (sección 7.3.5.). Al mismo tiempo, se apreció un aumento notorio de la impureza LMGox al incrementar el pH de 3.5 a 6.0 (9% a 35%), a la vez que disminuyó la molécula de interés LMG (78% a 55%) (Figura 104(a) y Tabla 27). Debido a esto, los mejores resultados se obtuvieron con valores de pH de 3.5-4.0, cuando el LMG alcanzó un máximo de 78-79%, asumiendo en principio un mayor poder antioxidante del ácido géntísico a $\text{pH} \leq 4.0$. Sin embargo, el total de las impurezas peptídicas (t_R 3.4-18.8 min), sin contar el LMGox, alcanzó un máximo a pH 3.5 (11%), disminuyendo con el aumento de pH, obteniendo un mínimo de 7% a pH 5.5. Por lo cual, al incrementarse el pH se acrecentó la principal impureza (con el residuo de metionina oxidado) pero disminuyeron el resto de las impurezas peptídicas, hechos que se contraponen.

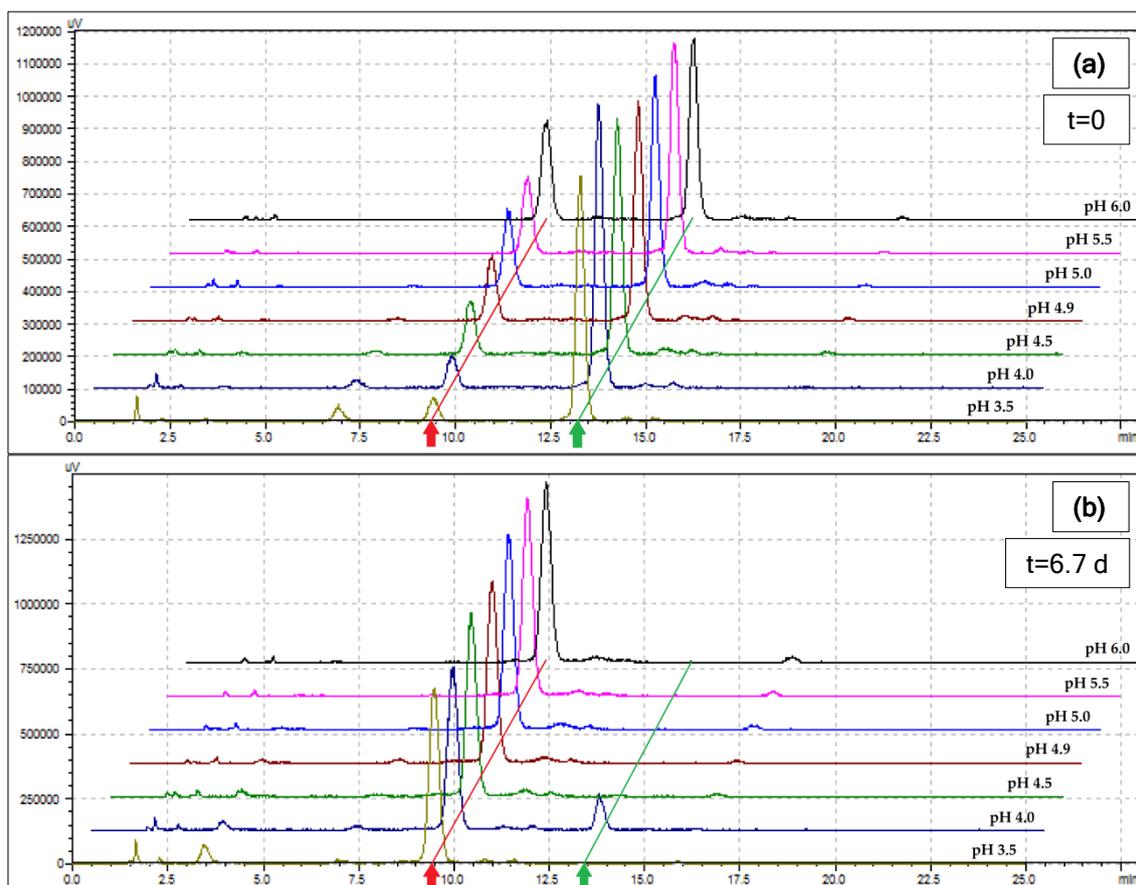


Figura 104. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3, detección γ) de los marcados realizados a distinto pH para: (a) $t = 0$ y (b) $t = 6.7$ días. Flecha roja indica LMGox y flecha verde indica LMG.

En tanto, la mayor proporción de ^{177}Lu libre total (t_R 1.5-2.6 min) se obtuvo a pH 3.5 (3%), lo que es consistente con el hecho de que a menor pH se promueve la protonación de los grupos ácido carboxílico y amino del macrociclo DOTA, disminuyendo la cinética de incorporación del radiometal al ligando poliaminocarboxílico [102, 111-113].

Tabla 27. Porcentaje de las especies presentes en los marcados realizados a distinto pH a tiempo inicial, 2.9 y 6.7 días post-marcado.

Tiempo (días)	Especie	pH						
		3.5	4.0	4.5	4.9	5.0	5.5	6.0
0	LMG	78	79	71	66	62	65	55
	LMGox	9	10	19	23	27	27	35
	Imp. peptídicas	11	9	9	9	9	7	8
	^{177}Lu libre	3	2	1	1	2	1	2
2.9	LMG	17	43	5	3	1	0.3	0.2
	LMGox	66	45	83	86	87	89	88
	Imp. peptídicas	13	10	11	9	10	9	11
	^{177}Lu libre	4	2	2	1	2	1	1
6.7	LMG	0.3	13	1	0	0	0.2	0.3
	LMGox	79	73	84	84	85	84	82
	Imp. peptídicas	17	12	13	14	13	13	16
	^{177}Lu libre	4	2	2	2	2	2	2

Se observó una alta inestabilidad de LMG con el tiempo, consistente con los resultados obtenidos en M3 del ensayo anterior (sección 7.3.5.). Como se puede apreciar en la Tabla 27 y la Figura 104(b), se observó una gran disminución de esta molécula a los 6.7 días en todo el rango de pH evaluado, permaneciendo solo entre 0% y 13%, con el valor máximo obtenido a pH 4.0. A la vez, se produjo principalmente LMGox (73-85%) y en menor medida el resto de las impurezas peptídicas (12-17%). Además, se mantuvo una baja liberación de ^{177}Lu de las diferentes especies moleculares a lo largo del tiempo (< 5%) y no se detectó [^{177}Lu]Lu-coloide en ninguna de las muestras examinadas.

Aunque el ^{177}Lu libre total estaba presente en una cantidad baja a $t = 0$, aumentó ligeramente con el tiempo para todos los valores de pH. Los mayores porcentajes se obtuvieron a pH 3.5, alcanzando el máximo a los 6.7 días (4%) y disminuyendo a medida que aumentaba el pH (Figura 105). El componente principal dentro del ^{177}Lu libre fue el pico con $t_R = 1.7$ min, previamente

asignado a [^{177}Lu]Lu-acetato (también detectado por TLC con $R_f = 0$), con los valores más altos para pH 3.5 (3%) y pH 4.0 (1%) a los 6.7 días, que se mantuvo casi sin cambios desde $t = 0$. Este comportamiento refuerza la presunción de que esta especie podría ser [^{177}Lu]Lu-acetato, un complejo débil generado rápidamente que estabiliza al Lutecio en solución acuosa, mientras tiene lugar la reacción de incorporación más lenta y dependiente de pH de este metal al anillo DOTA. Por tanto, desde el punto de vista de la incorporación del ^{177}Lu en la molécula peptídica, sería más conveniente realizar la reacción de marcación a $\text{pH} \geq 4.5$.

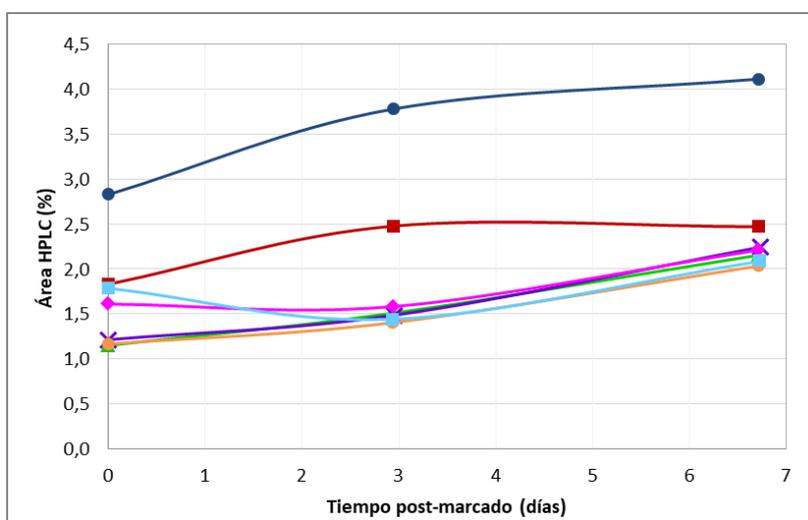


Figura 105. Evolución en el tiempo del ^{177}Lu libre total en los distintos marcados. pH 3.5 (● azul), pH 4.0 (■ rojo), pH 4.5 (▲ verde), pH 4.9 (× violeta), pH 5.0 (◆ fucsia), pH 5.5 (● naranja) y pH 6.0 (■ celeste).

La molécula de LMG disminuyó considerablemente con el tiempo para todo el rango de pH estudiado, pero esto se hizo más pronunciado a $\text{pH} \geq 4.5$, donde casi desapareció a los 2.9 días (Figura 106(a)). Sin embargo, a valores de pH de 3.5-4.0, lo hizo de forma más gradual hasta los 6.7 días. Esta inestabilidad se produjo en simultáneo con el aumento (casi simétrico) de su principal impureza LMGox, que aumentó considerablemente con el tiempo para todos los valores de pH pero en mayor proporción a $\text{pH} \geq 4.5$ (Figura 106(b)). Por tanto, a pH 3.5-4.0, esta impureza aumentó progresivamente alcanzando un 79-73% a los 6.7 días, mientras que a $\text{pH} \geq 4.5$ aumentó aún más, alcanzando el 83-89% a los 2.9 días, manteniendo estos valores a los 6.7 días. Teniendo en cuenta que esta oxidación se produjo de forma concomitante con el aumento de pH, se podría presumir que el poder antioxidante del ácido genticico es mayor a valores de pH más bajos.

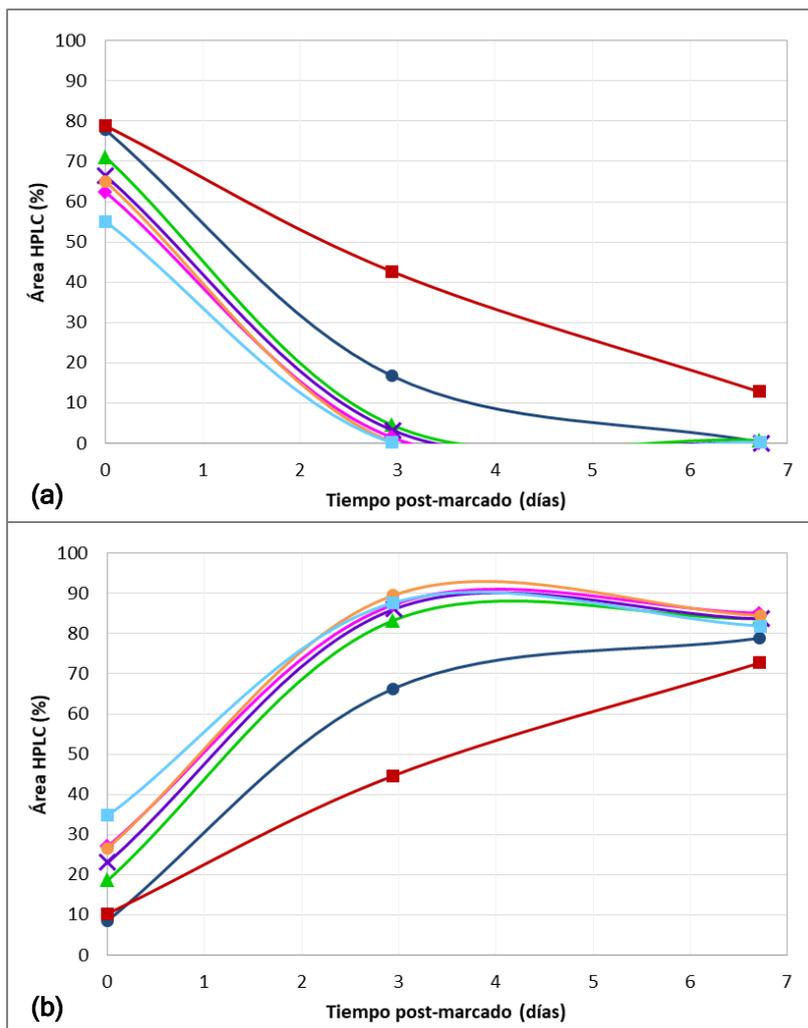
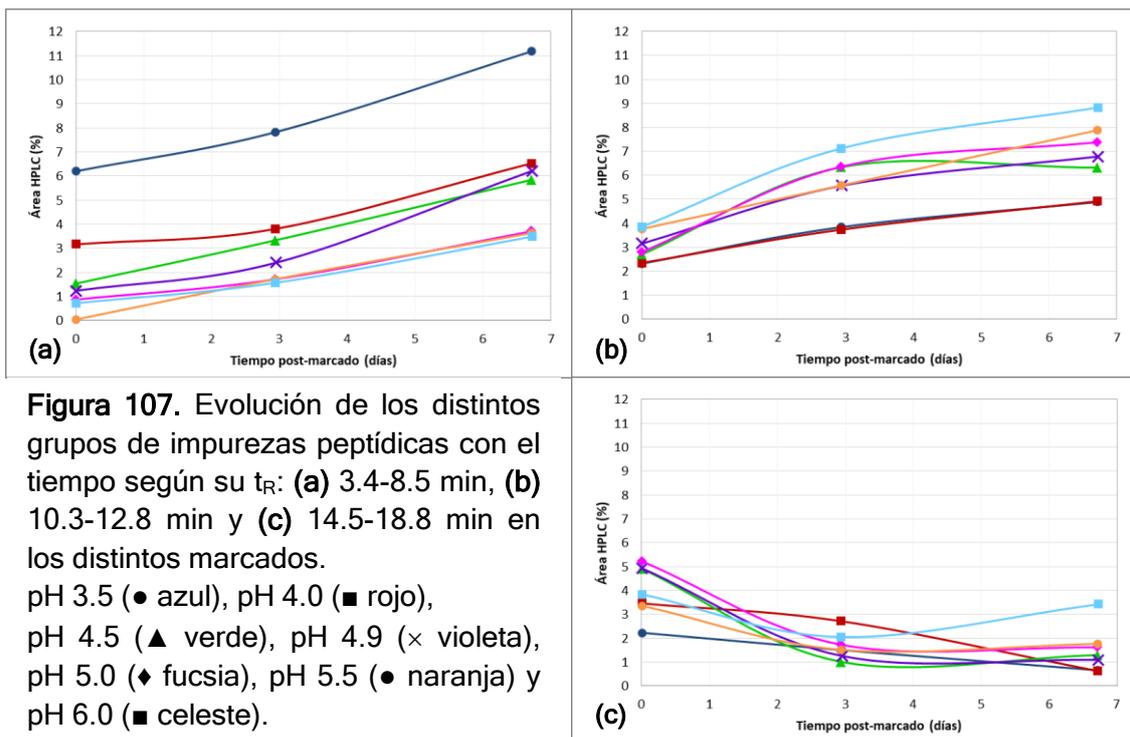


Figura 106. Evolución en el tiempo de: (a) LMG y (b) LMGox en los distintos marcados. pH 3.5 (● azul), pH 4.0 (■ rojo), pH 4.5 (▲ verde), pH 4.9 (× violeta), pH 5.0 (◆ fucsia), pH 5.5 (● naranja) y pH 6.0 (■ celeste).

Las impurezas peptídicas totales (t_R 3.4-18.8 min) mostraron una leve disminución con el aumento de pH a $t = 0$, pero no mostraron una tendencia clara a los 6.7 días (Tabla 27), por lo que se dividieron según los tres grupos del ensayo anterior (sección 7.3.5.) para un análisis más meticuloso.

El primer grupo de impurezas peptídicas con t_R 3.4-8.5 min aumentó con el tiempo para todos los valores de pH. Su presencia se vio acentuada con la disminución del pH, siendo predominante a pH 3.5 donde pasó de 6% a 11% en 6.7 días (Figura 107(a)). De acuerdo con la sección 7.3.5., estas impurezas peptídicas más hidrofílicas podrían ser el resultado de un daño mayor a las principales especies LMG y LMGox. Esto fue más evidente en el experimento donde no se agregaron agentes antioxidantes (Figura 102(a): verde)), lo que sugiere en este punto que el ácido gentísico (un ácido fenólico) no tendría un efecto protector contra los radicales libres a $\text{pH} \leq 4.0$. Esta propuesta, aunque



contradice lo discutido anteriormente para la Figura 106, estaría de acuerdo con Choe *et al.* [114] y Amorati *et al.* [115]. En estos trabajos se plantea que la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos depende del pH, ya que no son eficientes como secuestrantes de radicales libres a pH ácido, pero sí son muy buenos por encima de pH 7-8. Esto se debe a que a pH básico los ácidos fenólicos se ionizan a la forma fenolato, debido a sus pK_a de 8-9. El antioxidante en la forma fenolato tiene una mayor capacidad de donación de electrones que la especie parental, ya que activa al grupo fenólico para dar una mayor actividad secuestrante de radicales libres [115]. En este caso, el ácido genticónico tiene $pK_{a1} = 2.77$ (ácido carboxílico), $pK_{a2} = 10.01$ (grupo fenólico 1) y $pK_{a3} = 10.80$ (grupo fenólico 2) [116]. Probablemente, a pH 4.5-6.0, este alto valor de pK_{a2} (~ 10) produce un porcentaje muy bajo del ion fenolato como para dar una mayor actividad secuestrante de radicales libres. Sin embargo, el comportamiento electroquímico del ácido genticónico fue estudiado por Sazou *et al.* [117]. En el rango de pH 2-5, este no reportó ninguna onda de oxidación en el electrodo de mercurio, pero a pH 5-6 apareció una onda de oxidación-reducción pobremente definida, mientras que a pH 6 se obtuvo una onda bien definida. Por lo tanto, quizás a partir de un pH tan bajo como 5, se podría apreciar un aumento en el poder antioxidante del ácido genticónico (Figura 108).

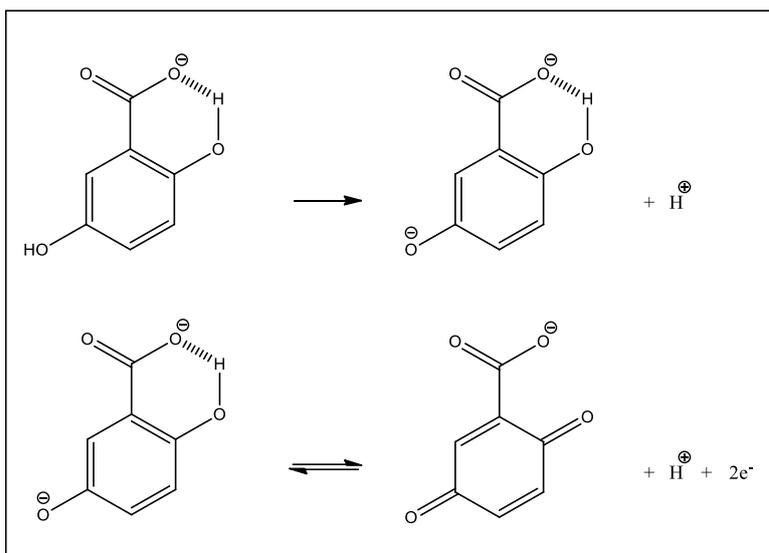


Figura 108. Reacción de oxidación del ácido gentísico a pH 5.0-9.5, donde se transfieren 2 protones H⁺ y 2 electrones e⁻, originando una quinona sustituida (modificado de [117]).

Además, todas las soluciones de diferente pH experimentaron un cambio de color con el tiempo, comenzando con soluciones incoloras a $t = 0$ y terminando a los 6.7 días con soluciones de color marrón amarillento para pH 3.5-4.5 y color marrón oscuro para pH 5.0-6.0. Según Taylor *et al.* [118] y Robards *et al.* [119], las quinonas formadas por la oxidación de los fenoles tienden a dimerizarse y polimerizarse produciendo pigmentos color marrón (pardeamiento de la solución) debido a un cambio en el espectro visible. Considerando esto, el mayor pardeamiento de las soluciones observado con el incremento de pH podría estar relacionado con una mayor oxidación del ácido gentísico, lo que estaría de acuerdo con un mayor poder antioxidante de este fenol a mayor pH. En este primer grupo de impurezas peptídicas se destacaron los picos con t_R de 3.4 min y 7.0 min. El primero, más cercano a los tiempos de retención del ¹⁷⁷Lu libre, se incrementó con el tiempo para todo pH pero fue más notorio con el descenso de este, destacándose a pH 3.5 donde aumentó de 1% a 7% en 6.7 días. Esta impureza no fue de gran importancia en el ensayo de la sección 7.3.5., por tanto parece tener relación con la presencia del ácido gentísico a pH bajo (< 4.5). Entre tanto, la impureza con t_R de 7.0 min también se presentó en mayor proporción a menor pH pero disminuyendo a lo largo del tiempo, transformándose probablemente en productos más hidrofílicos. Destacándose a pH 3.5 donde decreció de 5% a 2% en 6.7 días. En el ensayo de la sección 7.3.5., esta impureza se había logrado controlar con ácido gentísico a pH 4.5, por lo cual ambas impurezas estarían relacionadas con una menor protección

del antioxidante a $\text{pH} < 4.5$, reforzando la posibilidad de un menor efecto protector contra los radicales libres al descender el pH .

El segundo grupo de impurezas peptídicas, con t_R 10.3-12.8 min, también aumentó con el tiempo para todos los valores de pH . Sin embargo, su formación se vio favorecida con el aumento de pH , destacándose a pH 6.0 con un incremento de 4% a 9% en 6.7 días (Figura 107(b)). De acuerdo con la sección 7.3.5., estas impurezas peptídicas con t_R intermedio podrían ser producto de daños menores del radiotrazador LMG, probablemente debido a la modificación de ciertos aminoácidos. Por tanto, el aumento de este grupo de impurezas menos dañadas a $\text{pH} \geq 4.5$ estaría de acuerdo con una menor destrucción de la molécula principal debido a una acción más eficaz del ácido gentísico contra los radicales libres cuando se eleva el pH . Dentro de este segundo grupo, el componente con t_R de 10.8 min presentó el cambio más notable. Este se incrementó con el tiempo para todos los valores de pH , en mayor proporción a $\text{pH} \geq 4.5$ y destacándose a pH 6.0, pasando del 1% al 5% en 6.7 días. Suponiendo que esta impureza fuera ocasionada sólo por la modificación de uno o más aminoácidos, sería razonable que se incrementara con el pH gracias a una mayor acción del ácido gentísico en lugar de producirse otras moléculas más dañadas. Este comportamiento es bastante similar, aunque de menor cuantía, al de la impureza cercana LMGox (Figura 106(b)) que también presenta un daño menor.

En este punto, se hace necesario explicar el gran aumento de LMGox a $\text{pH} \geq 4.5$, cuando el ácido gentísico aumenta su poder antioxidante. Si existiera la posibilidad de producir *in situ*, algún agente oxidante que oxidara al residuo de metionina de la molécula de interés de forma casi selectiva, se explicaría esta peculiaridad. Está reportado que el ácido L-ascórbico, ampliamente utilizado como antioxidante, tiene una gran capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno [120, 121]. Precisamente, en estos procesos oxidativos resultantes de la transferencia de dos electrones, donde intervienen y se originan diferentes radicales moleculares, finalmente se produce ácido ascórbico oxidado (ácido L-dehidroascórbico) y H_2O_2 . Además, el ascorbato también puede actuar como pro-oxidante, y este comportamiento se observó en presencia de hierro, produciendo una oxidación eficaz de metionina a metionina

sulfóxido en péptidos pequeños [122]. Esta oxidación del ascorbato catalizada por metales produce electrones que reaccionan con el oxígeno contenido en el solvente para formar radicales superóxido, radicales hidroxilo y H₂O₂. Siendo este último, el principal responsable de la oxidación de metionina a metionina sulfóxido contenido en el péptido, sin la formación de otros productos de degradación a pH ≤ 7 [123]. Se ha reportado que el ácido gentísico reacciona de manera eficiente con el radical $\cdot\text{OH}$, uno de los radicales libres más perjudiciales, con una constante de velocidad de reacción alta, de $k = 1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (medida a pH 7). En la reacción, se produce un aducto de radical hidroxilo de ácido gentísico (I) y un radical fenoxilo de ácido gentísico (II):



En ese trabajo también hallaron que el aducto del radical hidroxilo (I) era un radical reductor pero el radical fenoxilo (II) era un radical oxidante. Además, descubrieron que el radical reductor (I) se transforma en el radical oxidante (II) [124]. Por lo tanto, en las reacciones de marcado de esta tesis, este radical oxidante podría producirse *in situ*, y por lo tanto, oxidar el residuo de metionina de la molécula LMG, al tiempo que disminuye la aparición de daños importantes en el resto de la molécula peptídica. Además, el aumento de pH potenciaría la actividad antioxidante del ácido gentísico, produciendo así más radical oxidante (II) que oxidaría más residuos de metionina, lo que podría explicar el gran aumento de la principal impureza LMGoX con el pH.

Por otro lado, la propia radiolisis del agua produce H₂O₂ *in situ* [125-127] que podría oxidar selectivamente el residuo de metionina del LMG, como se consiguió mediante la incubación del péptido no marcado con H₂O₂ en la sección 6.3.2. Esto podría explicar la formación inicial de LMGoX en la sección anterior sin la adición de agentes antioxidantes (Figura 101(a): rojo), con la posterior transformación en moléculas más dañadas debido a los destructivos radicales libres no estabilizados. Mientras que en presencia de ácido gentísico, la LMGoX podría producirse continuamente y a su vez conservarse debido a la actividad de supresión de radicales libres. Quizás, la oxidación selectiva del residuo de metionina por el H₂O₂ también pudiera aumentar con el pH en las

condiciones ensayadas en esta sección, haciendo este sistema aún más complejo.

Finalmente, las impurezas peptídicas del tercer grupo con t_R 14.5-18.8 min, posteriores al pico correspondiente a LMG, disminuyeron con el tiempo para todos los valores de pH pero sin una clara tendencia con respecto a este parámetro (Figura 107(c)). El valor máximo a $t = 0$ se presentó para pH 5.0 (5%) mientras que a $t = 6.7$ días fue para pH 6.0 (3%). Por lo que no se pudo concluir sobre el efecto del pH en estas impurezas, que según el comportamiento observado en la sección anterior, podrían ser moléculas marcadas similares a la de interés, probablemente modificadas por agregación a través de enlaces cruzados covalentes o por interacciones hidrofóbicas.

Debido a la alta sensibilidad a la radiación que presentó esta molécula peptídica, donde 6 de un total de 10 aminoácidos son susceptibles de oxidación, incluido el residuo de metionina, fue posible observar los efectos antioxidantes y oxidantes del ácido gentísico. Además, probablemente se requiera la adición de un tercer antioxidante al marcado, como el ácido ascórbico, ya que tiene un efecto sinérgico con ciertos fenoles. Con lo cual, las quinonas formadas por oxidación pueden reaccionar con el ácido ascórbico, reduciéndolos a sus fenoles originales, regenerándolos y contribuyendo así a un mayor efecto antioxidante [114, 119, 124].

En definitiva, la oxidación selectiva del residuo de metionina podría ser inducida por las especies oxidantes producidas en la reacción entre el ácido gentísico y los radicales libres del agua, durante la protección del péptido radiomarcado del ataque de estas especies nocivas. La capacidad antioxidante del ácido gentísico resultó ser dependiente del pH, siendo un mejor secuestrante de radicales libres a $\text{pH} > 4.5$. Por tanto, a $\text{pH} 5.0-5.5$ no sólo se logró una mayor incorporación de ^{177}Lu en la molécula, sino que también se produjo una menor cantidad de impurezas peptídicas (sin considerar LMGox) debido al mayor efecto protector del ácido gentísico. Por tanto, el pH no solo sería un factor importante para la incorporación del radiometal en la molécula, sino también para la eficacia del antioxidante necesario para su protección.

7.3.7. Purificación final de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11

Los estudios realizados con el fin de optimizar la marcación del DOTA-H2-MG11 con ¹⁷⁷Lu permitieron aumentar la PRQ obtenida en las marcaciones iniciales y además mantenerla relativamente estable durante 7 días post-marcado. Sin embargo esta nunca pudo alcanzar el 95%, por lo que se hizo necesario purificar el crudo de reacción.

La marcación tuvo una incorporación de ¹⁷⁷Lu de 99%, teniendo un exceso de moles de precursor respecto al Lu total de 20. La purificación del marcado por extracción en fase sólida a través de cartucho Sep-Pak C8 light, utilizando en primer lugar EtOH 7% para eliminar las impurezas peptídicas más hidrofílicas y luego EtOH 30% para la elución del producto, repitió los buenos resultados que se obtuvieron en la purificación del marcado con ⁶⁸Ga. La PRQ del LMG aumentó de 91% a 95% con una actividad recuperada del 87% (dc). Este aumento fue debido a que en la purificación se eliminó el ¹⁷⁷Lu libre (1% a 0%), se disminuyeron las impurezas peptídicas totales (6% a 4%) y se mantuvo el LMGox (1%) (Figura 109(a) y 109(b)), así como también el [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide (0%). En tanto, la A_m estimada del [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11 en el crudo de reacción fue de 24.1 MBq/nmol (PRQ = 91%), mientras que en el purificado esta se estimó en 21.1 MBq/nmol (PRQ = 95%), considerando que no hubieran pérdidas de precursor en todo el proceso.

Por tanto, la marcación con posterior purificación en dos pasos dio muy buenos resultados, ya que finalmente se obtuvo una PRQ de LMG de 95.4% comenzando con un precursor con una pureza química de 97.6% (Figura 109(c)). A pesar de que se consiguió controlar el péptido con el residuo de metionina oxidado ya presente en el precursor ($t_R = 9.3$ min con un área de 0.8%), al obtener un 0.7% de LMGox, no se pudo disminuir la impureza peptídica más lipofílica presente en el precursor ($t_R = 14.3$ min con un área de 1.2%), al obtener un 1.8% de esta impureza marcada con ¹⁷⁷Lu.

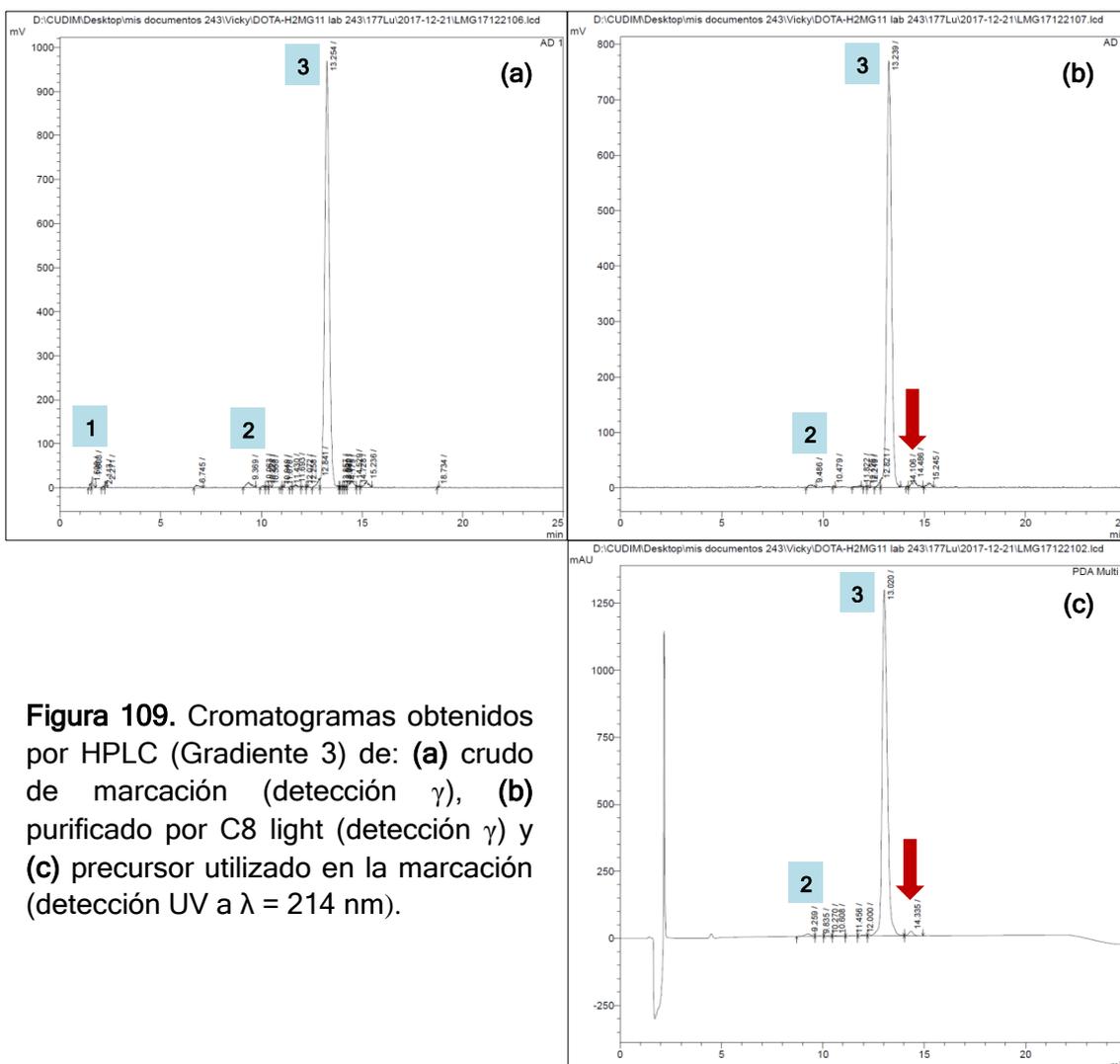


Figura 109. Cromatogramas obtenidos por HPLC (Gradiente 3) de: **(a)** crudo de marcación (detección γ), **(b)** purificado por C8 light (detección γ) y **(c)** precursor utilizado en la marcación (detección UV a $\lambda = 214$ nm).

7.3.8. Estudios biológicos primarios

Los estudios de distribución biológica del radiotrazador LMG se realizaron en ratones sanos, para así determinar las principales vías metabólicas y de eliminación del radiotrazador, y establecer si existe captación en órganos o tejidos normales. El LMG obtenido en la sección 7.3.2. ($n = 3$) tuvo una PRQ de $(96 \pm 3)\%$ y una A_m estimada de 3.3 ± 1.1 MBq/nmol. Los niveles de actividad inyectados (Tabla 28) permitieron obtener un conteo adecuado de órganos y tejidos para cada tiempo.

Tabla 28. Actividad y A_m de LMG inyectadas para el ensayo de biodistribución a distintos tiempos.

Tiempo BD (h)	Actividad (MBq)	A_m (MBq/nmol)	n
0.5	4.2 ± 0.8	4.3	3
1.0	4.9 ± 1.2	2.2	3
2.0	7.8 ± 2.3	3.5	3
24	8.0 ± 3.1		3

A pesar de la variabilidad observada en las biodistribuciones, se pudo apreciar desde las 0.5 h una rápida eliminación sanguínea (4.5 ± 3.6)% DI y una muy baja captación en hígado (2.1 ± 1.2)% DI (Figura 110). El tracto intestinal tuvo una moderada captación presentando el máximo a las 1.0 h (8.6 ± 10.1)% DI que fue disminuyendo luego hasta las 24 h (6.0 ± 6.4)% DI. Asimismo, se observó una alta excreción urinaria desde las 0.5 h (66.8 ± 12.3)% DI, alcanzando el (92.3 ± 6.2)% DI a las 24 h, y una baja captación renal en todo momento, desde (1.9 ± 0.6)% DI a las 0.5 h hasta (0.4 ± 0.2)% DI a las 24 h. Este perfil de eliminación resultó muy favorable para el péptido marcado con ^{177}Lu , que además fue muy similar al observado previamente para el mismo péptido marcado con ^{68}Ga (sección 6.3.7.2.).

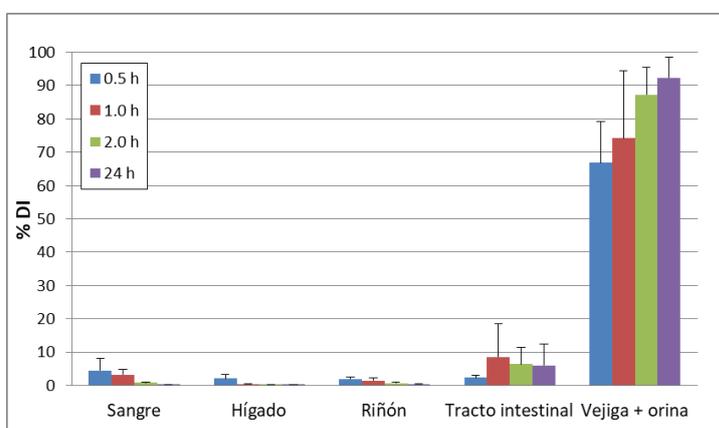


Figura 110. Perfil de eliminación de LMG (%DI) para distintos tiempos de BD en ratones sanos.

Además, todos los órganos y tejidos estudiados tuvieron una muy baja acumulación de actividad por gramo (< 4.5 % DI/g) según Tabla 29 y Figura 111, por lo que esta baja captación en órganos y tejidos no blanco sería muy favorable para reducir el daño a los tejidos sanos.

Tabla 29. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) para distintos tiempos de BD.

Órgano, tejido o fluido	0.5 h (n = 3)	1.0 h (n = 3)	2.0 h (n = 3)	24 h (n = 3)
Sangre	2.32 ± 1.83	1.84 ± 0.96	0.56 ± 0.21	0.06 ± 0.04
Hígado	1.41 ± 0.68	0.44 ± 0.14	0.20 ± 0.09	0.22 ± 0.12
Corazón	0.78 ± 0.33	0.43 ± 0.22	0.49 ± 0.60	0.03 ± 0.05
Pulmón	2.56 ± 1.36	0.65 ± 0.40	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.05
Bazo	0.61 ± 0.14	0.58 ± 0.52	0.02 ± 0.04	0.14 ± 0.12
Riñón	3.76 ± 1.23	3.71 ± 1.97	2.11 ± 1.24	1.39 ± 0.63
Tiroides	2.28 ± 0.16	0.46 ± 0.23	0.20 ± 0.16	0.12 ± 0.11
Músculo	0.38 ± 0.10	0.21 ± 0.11	0.13 ± 0.20	0.02 ± 0.04
Hueso	1.40 ± 0.89	0.47 ± 0.42	0.27 ± 0.04	0.20 ± 0.13
Estómago	1.01 ± 0.20	1.16 ± 1.24	0.25 ± 0.12	1.20 ± 0.58
Vesícula biliar	ND	0.37 ± 0.64	0.32 ± 0.32	0.37 ± 0.29
Tracto intestinal	0.79 ± 0.17	3.63 ± 4.01	2.95 ± 2.42	4.39 ± 4.78
Páncreas	ND	0.97 ± 1.03	0.26 ± 0.20	0.21 ± 0.27

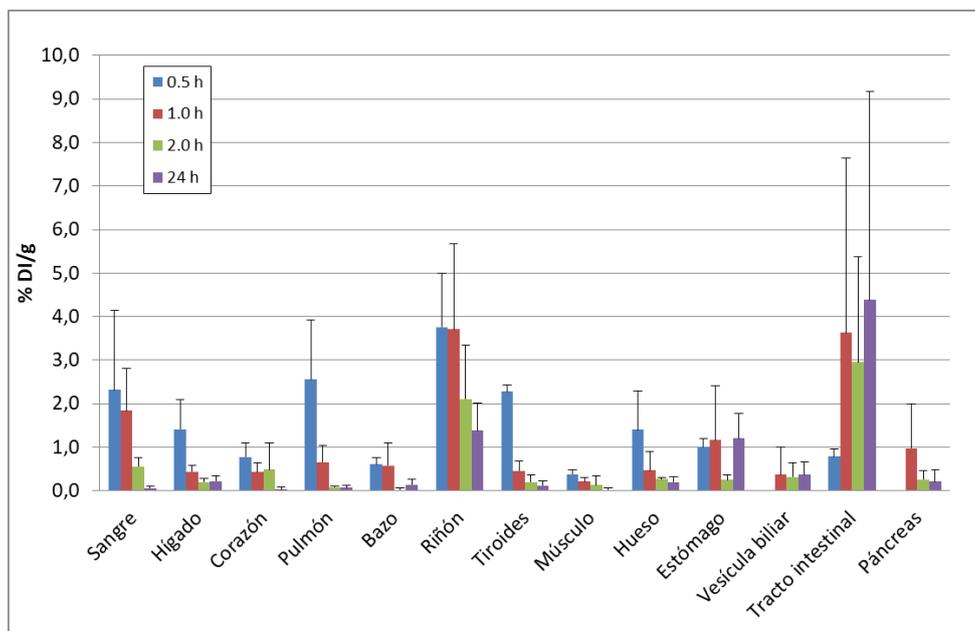


Figura 111. Actividad acumulada por gramo de órgano, tejido o fluido (% DI/g) para distintos tiempos de BD de LMG en ratones sanos.

7.4. Conclusiones

El método analítico utilizado permitió cuantificar hasta 23 especies presentes en el marcado. Para lo cual, se combinó el sistema de HPLC (Gradiente 3) optimizado previamente en la marcación con Galio-68, que logró separar 22 especies en el marcado con Lutecio-177, con un sistema de TLC (NH₄OH:EtOH:H₂O (2:10:20)) que aunque no logró separar el [¹⁷⁷Lu]Lu-coloide del ¹⁷⁷Lu libre, a partir de cálculos matemáticos relacionando ambos métodos se consiguió determinar el % real de cada especie.

Si bien desde las marcaciones iniciales se utilizó ácido gntísico como antioxidante, los resultados obtenidos presentaron variabilidad. En algunas se logró una pureza radioquímica de [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2-MG11 (LMG) superior al 90% y en otras no superó el 65%, debido a variaciones del ¹⁷⁷Lu libre presente. A pesar de que la purificación por Sep-Pak C18 plus consiguió eliminar el ¹⁷⁷Lu libre y obtener PRQ superiores al 95% en las marcaciones menos exitosas, el rendimiento de marcado más bajo e impredecible hizo necesario estudiar y optimizar distintos parámetros con el fin de mejorar la reproducibilidad de la marcación.

El aumento del tiempo de calentamiento en la marcación, en presencia de ácido gntísico, favoreció la incorporación del ¹⁷⁷Lu en la molécula peptídica pero también aumentó la oxidación del residuo de metionina del péptido marcado.

La incorporación de ¹⁷⁷Lu al DOTA-péptido dependió de la calidad del [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ empleado, obteniendo una mayor incorporación para el ¹⁷⁷Lu n.c.a. A partir de 6.0 nmol de precursor se obtuvo una incorporación de ¹⁷⁷Lu n.c.a. > 96%, implicando un exceso de moles de precursor respecto al Lu total > 19.

El aumento de la temperatura de marcación provocó el aumento de todas las impurezas peptídicas, exceptuando la oxidación del residuo de metionina, aumentando quizás la velocidad de reacción de la radiolisis, que produce más radicales libres, y quizás también de las reacciones de estos con la molécula marcada, generando una gran variedad de productos secundarios. Por lo que estas reacciones se verían más afectadas por la temperatura que la propia oxidación del residuo de metionina. Aunque luego en el estudio de estabilidad

se observó que la desaparición de la molécula de interés fue debida casi exclusivamente por la oxidación del residuo de metionina.

Por otro lado, el incremento del ácido gentísico en el buffer de marcación no disminuyó la incorporación del ^{177}Lu en la molécula, por lo que no habría competencia entre el gentisato y el precursor por la formación de complejos con el ^{177}Lu en las condiciones ensayadas.

El agregado de L-metionina previo al marcado como segundo antioxidante consiguió mantener una excelente incorporación del ^{177}Lu al DOTA-péptido y disminuir notoriamente la oxidación del residuo de metionina, aunque no pudo evitar la formación de otras impurezas peptídicas. Con lo cual, la PRQ de LMG pudo superar el 90% a tiempo inicial y también mejorar su estabilidad, ya que en lugar de desaparecer a los 7 días post-marcado esta se encontró presente con una PRQ de 70%.

Los dos antioxidantes utilizados tuvieron distinto efecto protector en los marcados con ^{177}Lu . Por un lado el ácido gentísico evitó en gran medida la formación de la mayor parte de las impurezas peptídicas a lo largo del tiempo, pero por otro lado incrementó selectivamente la principal impureza conteniendo el residuo de metionina oxidado. En tanto la L-metionina fue muy efectiva para reprimir la oxidación del residuo de metionina del péptido H2-MG11 pero no pudo evitar la formación del resto de las impurezas peptídicas a lo largo del tiempo. Es así que la conjunción de los dos antioxidantes fue lo más efectivo para mejorar tanto el rendimiento de marcación, como la estabilidad de la molécula marcada.

El inesperado comportamiento del ácido gentísico, que incrementó la oxidación selectiva del residuo de metionina de la molécula LMG con el tiempo, motivó una investigación más exhaustiva del comportamiento de este antioxidante en el marcado. Fue así que, al estudiar el efecto del pH de marcación en presencia de este único agente estabilizante, se consiguió obtener una posible explicación. La oxidación selectiva del residuo de metionina podría ser inducida por las especies oxidantes producidas en la reacción entre el ácido gentísico y los radicales libres del agua, durante la protección del péptido radiomarcado del ataque de estas especies nocivas. Además, la capacidad antioxidante del ácido

gentísico resultó ser dependiente del pH, siendo un mejor secuestrante de radicales libres a $\text{pH} > 4.5$. Por tanto, el pH no solo sería un factor importante para la incorporación del radiometal en la molécula, sino también para la eficacia del antioxidante necesario para su protección, un aspecto que generalmente no es considerado.

Las optimizaciones realizadas en la marcación de DOTA-H2-MG11 con ^{177}Lu permitieron aumentar la PRQ y mantenerla relativamente estable, pero no fueron suficientes para que esta pureza alcanzara el 95%, por lo que se hizo necesaria una purificación del crudo de reacción. Se utilizó el método de purificación por extracción en fase sólida optimizado en las marcaciones con ^{68}Ga que resultó igual de efectivo. Esto consiguió aumentar la PRQ de 91% a 95% y recuperar un 87% (dc) de la actividad inicial.

Se realizó una evaluación biológica inicial de LMG con estudios de biodistribución en ratones sanos. En esta se observó una rápida depuración sanguínea del radiotrazador con alta eliminación urinaria ya desde las 0.5 h p.i. Además se obtuvo una muy baja captación en órganos y tejidos no blanco, destacando una baja captación a nivel renal en todo el período estudiado (0.5 - 24 h p.i.), lo que evitaría los problemas de nefrotoxicidad exhibidos por algunos radiopéptidos utilizados para terapia radionucleídica de receptor peptídico.

8. CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo de tesis se ha estudiado la química de marcación de un mismo péptido (conjugado al quelante DOTA) con dos radionucleidos metálicos diferentes, en los que se han encontrado similitudes y diferencias.

En primer lugar el número de ácidos carboxílicos del quelante DOTA que estaría involucrado en la coordinación de ambos metales es distinto, ya que para el ^{68}Ga serían 2 y para el ^{177}Lu serían 3, según fue demostrado para otro péptido análogo de minigastrina [128]. Por lo cual, esta diferencia estructural podría causar diferencias fisicoquímicas y/o biológicas entre ambos complejos.

La coordinación de metales con el quelante DOTA requiere un $\text{pH} > 3$ para desprotonar sus grupos ácido carboxílico y amino, y mejorar así la cinética de incorporación del radionucleido metálico al quelante. Además el radionucleido requiere estar en su forma libre o estabilizado formando complejos débiles con otros ligandos. En este sentido el ^{68}Ga tiene mayores limitaciones que el ^{177}Lu para su incorporación al DOTA, ya que el ion Ga(III) libre hidratado es estable solamente en condiciones ácidas ($\text{pH} < 3$) (Figura 25), mientras que el ion Lu(III) libre hidratado es estable en un rango mayor de pH ($\text{pH} < 8$) (Figura 81), debido a que presentan distintas constantes de hidrólisis. Eso se vio reflejado en los resultados obtenidos al comparar la incorporación de ambos radionucleidos en el DOTA-péptido a distinto pH y en presencia de acetato como ligando estabilizador (Figura 112).

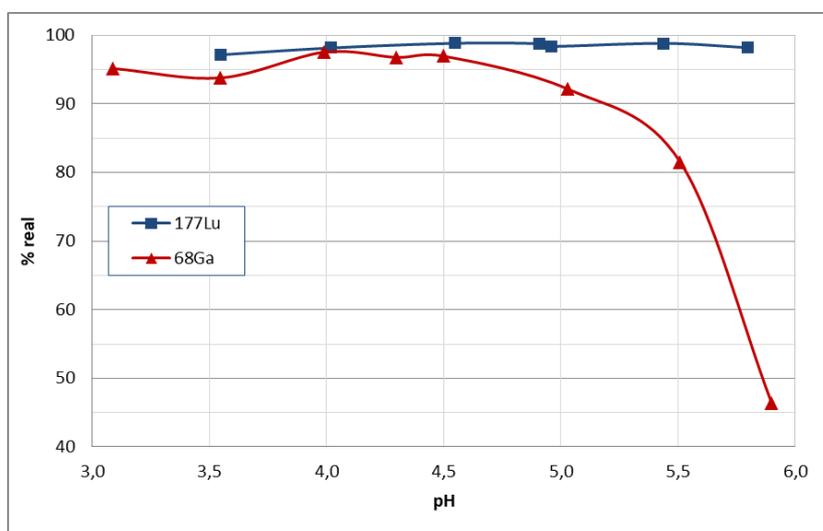


Figura 112. Incorporación de ^{68}Ga y ^{177}Lu al DOTA-péptido a $t = 0$ según el pH de la reacción.

La mayor incorporación de ^{68}Ga (98-97%) se obtuvo en el rango de pH 4.0-4.5, teniendo una leve disminución (95-94%) para pH menores (3.0-3.5) y otra muy notoria (92-46%) para pH mayores (5.0-6.0). La disminución en la incorporación fue únicamente debida al aumento de ^{68}Ga libre, que a pH > 4.5, este podría estar formando la especie $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$, sin la posibilidad de formar complejo con el DOTA. En cambio la mayor incorporación de ^{177}Lu (98-99%) se obtuvo a partir de pH 4.0 y hasta 6.0 (máximo estudiado), lo que confirma que este radionucleido posee un mayor rango de pH para realizar la marcación. Por lo cual, se evidencia que el pH de marcación resulta mucho más crítico para el ^{68}Ga que para el ^{177}Lu .

El ácido genticónico utilizado como antioxidante durante la marcación interfirió en la incorporación del ^{68}Ga en el precursor, posiblemente por competencia del genticato para la formación de complejos con ^{68}Ga . Esta interferencia se vio enmendada al disminuir la cantidad de AG, obteniendo una incorporación de ^{68}Ga mayor a 95% con una relación máxima de moles AG / precursor de ~ 3000 (Figura 55(a)). Sin embargo, a pesar de que esta interferencia del antioxidante no fue verificada durante la marcación con ^{177}Lu , se obtuvo una incorporación de ^{177}Lu mayor a 99% con una relación máxima de moles AG / precursor de ~ 9300 en las condiciones estudiadas (Figura 95). La menor interferencia del ácido genticónico en la incorporación del ^{177}Lu , podría deberse a las diferentes constantes de estabilidad que el Ga(III) y el Lu(III) presentan con el quelante DOTA (Tabla 5), donde el ion Lu(III) es el más estable de los dos, por lo que resulta razonable que haya una menor competencia por otro ligando.

Otra diferencia importante entre ambos radionucleidos es el $T_{1/2}$, y es este el que establece la A_m máxima de la molécula marcada (considerando que todas las moléculas posean un radionucleido). Según los cálculos realizados, la A_m máxima de la molécula marcada con ^{68}Ga es de ~ 102300 MBq/nmol y de la marcada con ^{177}Lu es de ~ 720 MBq/nmol. En tanto, las A_m alcanzadas en esta tesis estuvieron bastante alejadas de las teóricas, obteniendo 29 MBq/nmol para ^{68}Ga -DOTA-H2-MG11 (considerando una PRQ de 84% para los 2.4 nmol de precursor, Figura 55(a)) y 23 MBq/nmol para ^{177}Lu -DOTA-H2-MG11 (considerando una PRQ de 91% para los 6.0 nmol de precursor, Figura 95). La mayor diferencia entre la A_m alcanzada y la teórica se observó para la

molécula marcada con ^{68}Ga , lo que denota una menor eficiencia en la marcación con este radionucleido. Esto en parte podría deberse a que la constante de estabilidad termodinámica del complejo Ga(III)-DOTA no es muy favorable, debido a la distorsión de la geometría octaédrica que presenta el complejo, por causa del gran tamaño del anillo DOTA respecto al pequeño tamaño del ion Ga(III) [26].

En ausencia de antioxidantes y con el transcurso del tiempo, se observó un mayor daño de la molécula marcada con ^{177}Lu respecto a la marcada con ^{68}Ga . Al comparar marcados realizados a 100°C , con igual cantidad de precursor (8.9 nmol), similar actividad del radionucleido (123 MBq de ^{68}Ga y 140 MBq de ^{177}Lu) y volúmenes de marcación del mismo orden (540 μL para ^{68}Ga y 625 μL para ^{177}Lu), se obtuvieron perfiles de estabilidad muy distintos (Figuras 43(b) y 101(a) resumidas en Figura 113). Si se compara la disminución de la PRQ de la molécula de interés en el tiempo correspondiente a 1 $T_{1/2}$ del radionucleido, se obtiene una caída de 70% a 37% para ^{68}Ga y de 80% a 0.1% para ^{177}Lu , apreciándose para este último una mayor destrucción al obtenerse un mayor número y una mayor proporción de impurezas peptídicas (distintas a la principal impureza con el residuo de metionina oxidado) y liberación de ^{177}Lu de la molécula.

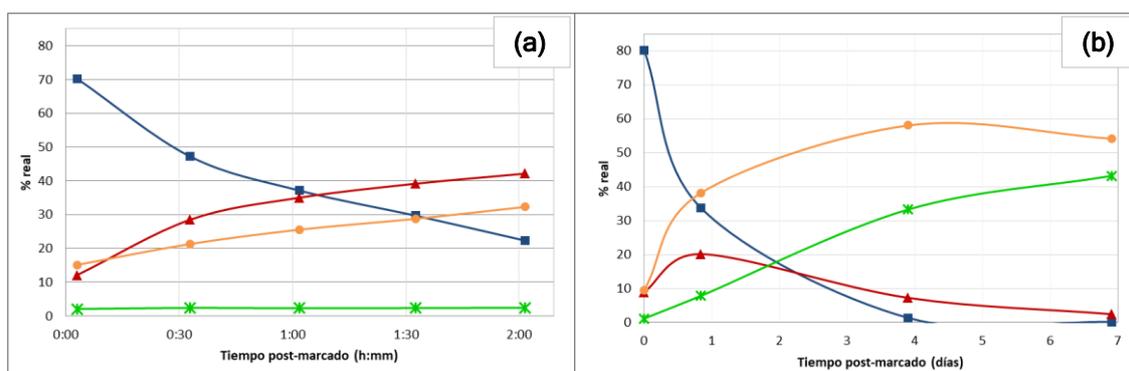


Figura 113. Evolución de las distintas especies con el tiempo para el marcado de DOTA-H2-MG11 sin antioxidantes con (a) ^{68}Ga y (b) ^{177}Lu . GMG o LMG (■ azul), GMGox o LMGox (▲ rojo), impurezas peptídicas (● naranja) y ^{68}Ga o ^{177}Lu libre total (× verde).

Parte de este mayor daño podría ser debido al mayor tiempo de calentamiento que tuvo el marcado con ^{177}Lu (15 min en lugar de 10 min), que pudo haber producido más impurezas peptídicas. Sin embargo, algo importante a tener en cuenta es que para una misma actividad se tienen 142 veces más átomos de

^{177}Lu que de ^{68}Ga (debido a sus $T_{1/2}$), por lo que habría mayor cantidad de átomos radiactivos presentes en el marcado con ^{177}Lu , y si a esto se le suma que la emisión beta de baja energía del ^{177}Lu tendría un mayor efecto ionizante respecto a la emisión de positrón del ^{68}Ga , se podría explicar la mayor radiolisis obtenida en el marcado con el radionucleido utilizado para terapia.

La alta sensibilidad a las radiaciones ionizantes que presentó el péptido derivado de minigastrina H2-MG11 conjugado a DOTA, fue probablemente debido a que 6 de sus 10 aminoácidos son susceptibles a la oxidación (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Esto se vio en la marcación con los dos radionucleidos, pudiendo identificar hasta 9 impurezas peptídicas totales en el marcado con ^{68}Ga y hasta 15 en el marcado con ^{177}Lu . En ambos marcados el aumento de temperatura y tiempo de marcación provocaron un aumento de estas impurezas, probablemente por aumento de la velocidad de reacción de la radiolisis del agua, produciendo más radicales libres, y quizás también por aumento de la velocidad de las reacciones de estos con las moléculas marcadas. Es por ello que se plantea como trabajo a futuro, realizar las marcaciones a menor temperatura, y así buscar el menor tiempo de incubación necesario para disminuir las impurezas, pero sin disminuir la incorporación de los radionucleidos al DOTA-péptido. En este sentido, algo interesante a probar, sería realizar el calentamiento a través de microondas, lo que podría acortar los tiempos de marcado al realizar un calentamiento más eficiente y uniforme de la solución, evitando el sobrecalentamiento de las zonas cercanas a la superficie de las paredes del tubo de reacción (Figura 114) [129], y disminuyendo la formación de impurezas peptídicas marcadas [89, 128].

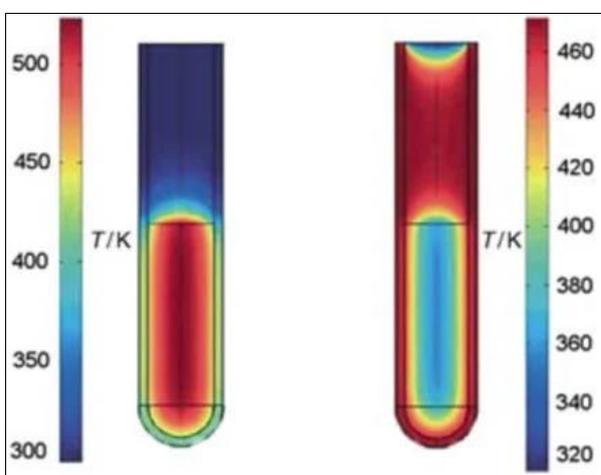


Figura 114. Gradientes de temperatura que reflejan el calentamiento por microondas (izquierda) frente al calentamiento por baño de aceite (derecha). El microondas calienta todo el volumen de líquido de la muestra inmediatamente, mientras que en el baño de aceite se calienta la muestra líquida por contacto directo con el vial [129].

Si se tiene en cuenta que el quelante DOTA no es el que proporciona los complejos más estables con el ^{68}Ga , se podría plantear el cambio del quelante bifuncional de la molécula H2-MG11 para la marcación con este radionucleido. Según la Tabla 5, el quelante bifuncional NOTA sería más adecuado que el DOTA. La constante de estabilidad extraordinariamente alta del complejo ^{68}Ga]Ga-NOTA se atribuye a la compatibilidad del tamaño iónico del $^{68}\text{Ga}^{3+}$ con la dimensión de la cavidad del triazamacrociclo de nueve miembros del NOTA, lo que resulta en mayores rendimientos de complejación, incluso a temperatura ambiente y en tiempos de reacción más cortos. Existen quelantes bifuncionales derivados de NOTA, como NODAGA o p -SCN-Bn-NOTA que han sido utilizados con éxito en la marcación con ^{68}Ga a temperatura ambiente [130, 131], por lo que si se optara por acoplar alguno de estos a la molécula peptídica de esta tesis, se podría evitar la formación de impurezas peptídicas al evadir el calentamiento. También se ha reportado que el quelante p -SCN-Bn-NOTA ha mostrado una muy alta selectividad hacia el ^{68}Ga , incluso en presencia de hasta 10 ppm de los iones metálicos Fe^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ti^{4+} y Sn^{2+} , que son los más comúnmente encontrados como impurezas en los eluidos de los generadores comerciales de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ [131]. Esta menor interferencia de las impurezas metálicas permitiría mejorar los rendimientos de marcado, y así obtener moléculas marcadas con ^{68}Ga de mayor actividad molar.

Un último aspecto a considerar sería evaluar la modificación de la secuencia peptídica del análogo de minigastrina seleccionada en esta tesis. En un estudio realizado por Ocak *et al.*, se estudió la estabilidad biológica de 11 péptidos análogos de gastrina marcados con ^{177}Lu , en donde se encontraba incluido el péptido H2-MG11, y concluyó que todos los radiopéptidos fueron rápidamente metabolizados *in vivo*, ya que ninguno se encontró intacto en la orina recogida luego de 10 minutos de inyectarse en ratones. Esta rápida degradación *in vivo* podría ser el resultado de la acción de enzimas degradativas presentes en la sangre, hígado y riñones. Una enzima que podría ser responsable de esto sería la endopeptidasa 24.11, ya que esta ha demostrado ser capaz de escindir la gastrina y la CCK en varios sitios que explicarían los metabolitos encontrados [132]. Un antecedente significativo se ha publicado sobre esta enzima, su comportamiento respecto a la gastrina-17 (G17) depende de que este péptido

posea el residuo de tirosina sulfatado o no (Figura 15). La G17 sulfatada se degrada 3 veces más lento que la G17 no sulfatada, por lo que la presencia del grupo sulfato en el residuo de tirosina causa una marcada reducción en la velocidad de degradación de la G17 por la endopeptidasa 24.11 [133]. Este dato da lugar a cuestionar el por qué ninguno de los péptidos análogos de gastrina ensayados hasta la fecha presenta el residuo de tirosina sulfatado, esto incluye los estudios más recientes donde ciertas modificaciones específicas en la secuencia peptídica han proporcionado resultados bastante auspiciosos [134, 135]. Probablemente porque en los comienzos de la marcación de la gastrina-I humana, se utilizó el residuo de tirosina no sulfatado para permitir su marcación con ¹³¹I por los métodos oxidativos convencionales [62]. Por tanto, algo interesante a probar sería la sustitución de la tirosina por la tirosina sulfatada en los análogos de minigastrina, lo que podría mejorar la estabilidad metabólica de estos péptidos. Además, según [95], la tirosina sulfatada tiene menos probabilidad de oxidarse, por lo que podrían obtenerse menos impurezas peptídicas a partir de la marcación del péptido. Asimismo, la gastrina-17 sulfatada exhibe una afinidad mayor por el CCK2R que la gastrina-17 no sulfatada (de 3 a 10 veces) [47], por lo que este cambio podría mejorar la captación en tumor.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se consiguió optimizar la incorporación de dos radionucleidos metálicos, ^{68}Ga y ^{177}Lu al péptido análogo de minigastrina acoplado al quelante DOTA (DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). A pesar de que la incorporación obtenida para ambos superó el 95%, la pureza radioquímica inicial de la molécula de interés muchas veces no superó el 75%. Esto fue debido a la alta sensibilidad a las radiaciones ionizantes que la molécula peptídica presentó, probablemente debido a que 6 de sus 10 aminoácidos son susceptibles a la oxidación. Las distintas especies producidas pudieron detectarse gracias a la optimización del sistema cromatográfico, donde se combinó para cada radiotrazador un sistema de HPLC con un sistema de TLC, que a partir de cálculos matemáticos relacionando ambos métodos se consiguió determinar el % real de cada especie. Esto permitió distinguir y cuantificar hasta 15 especies presentes en el marcado con ^{68}Ga y hasta 23 especies en el marcado con ^{177}Lu .

En todos los marcados realizados con ambos radionucleidos, la impureza radioquímica con mayor trascendencia fue asignada al péptido conteniendo el residuo de metionina oxidado. En la marcación con ^{68}Ga , se evaluó el efecto del aumento de actividad, lo que incrementó esta impureza. Posiblemente debido a la formación de más radicales libres oxidantes generados en la interacción de las radiaciones ionizantes con el agua del medio de reacción, aumentando así la oxidación del residuo más sensible de la molécula, la metionina. Por lo cual, el agregado del aminoácido L-metionina a la marcación, disminuyó en gran medida y de forma exclusiva la formación de esta impureza, teniendo un efecto antioxidante.

Se distinguieron otras impurezas radioquímicas en los marcados que fueron asignadas como "otras impurezas peptídicas". Estas se vieron incrementadas con el aumento de la temperatura de marcación para ambos radionucleidos, pudiendo identificar hasta 8 impurezas peptídicas en el marcado con ^{68}Ga y hasta 14 en el marcado con ^{177}Lu . El aumento de temperatura en presencia de las radiaciones ionizantes posiblemente incrementa la velocidad de reacción de la radiolisis del agua, produciendo más radicales libres, y quizás también

incremente la velocidad de las reacciones de estos radicales libres con la molécula marcada, generando esta gran variedad de productos secundarios. En tanto, la oxidación del residuo de metionina no se vio tan afectada por el aumento de la temperatura. El agregado del ácido genticó a la marcación, disminuyó en gran medida y de forma exclusiva la formación de estas impurezas, teniendo un efecto antioxidante distinto al de la L-metionina.

El ácido genticó impidió la generación de la mayor parte de las impurezas peptídicas a lo largo del tiempo, a excepción de la impureza principal, que aumentó inesperadamente debido a la oxidación selectiva del residuo de metionina del péptido marcado con ^{177}Lu . Esta oxidación selectiva podría ser inducida por las especies oxidantes producidas en la reacción entre el ácido genticó y los radicales libres del agua, durante la protección del péptido radiomarcado del ataque de estas especies nocivas. La capacidad antioxidante del ácido genticó resultó ser dependiente del pH, siendo un mejor secuestrante de radicales libres a $\text{pH} > 4.5$. Por tanto, el pH no solo sería un factor importante para la incorporación del radiometal a la molécula, sino también para la eficacia del antioxidante necesario para su protección.

Se logró optimizar las cantidades de los dos antioxidantes incorporados en cada marcado, mejorando acentuadamente la pureza radioquímica de los dos radiotrazadores, a causa de atenuar y estabilizar la formación de todas las impurezas peptídicas. Sin embargo, no fue suficiente para que esta pureza superara siempre el 90%, haciéndose necesaria una purificación del crudo de reacción. Por tanto, se optimizó un método de purificación en tres pasos por extracción en fase sólida, a través de cartucho Sep-Pak C8 light, donde se consiguió una pureza radioquímica superior a 90% para el marcado con ^{68}Ga y del 95% para el marcado con ^{177}Lu .

Con el propósito de realizar una caracterización, se logró obtener la principal impureza marcada con ^{68}Ga (conteniendo el residuo de metionina oxidado), en una única etapa de marcación-oxidación donde se agregó H_2O_2 en presencia de los dos antioxidantes. Su purificación también fue optimizada en tres pasos por extracción en fase sólida, a través de cartucho Sep-Pak C8 light, donde se consiguió aumentar su pureza radioquímica de 78% a 90%.

La evaluación *in vitro* de la especificidad biológica se realizó tanto para el péptido H2-MG11 marcado con ^{68}Ga como para su principal impureza oxidada. En estos ensayos con células viables AR42J se obtuvo una unión específica a membrana y una internalización específica de la molécula marcada de interés, lo que demostraría una interacción específica de esta con los receptores CCK2 de las células. Sin embargo, para la impureza oxidada la unión específica a membrana se redujo de forma importante, sin lograr una internalización específica. Debido a que este último dato se obtuvo de un único ensayo, sería necesario repetir el mismo para poder concluir de forma acertada.

La evaluación biológica *in vivo* mediante estudios de biodistribución en ratones sanos se realizó para el péptido H2-MG11 marcado con ^{68}Ga y con ^{177}Lu . Para ambos se observó una rápida depuración sanguínea con alta eliminación urinaria, además de una muy baja captación en órganos y tejidos, incluyendo el riñón. El mismo perfil se observó para el péptido marcado con ^{68}Ga en los estudios realizados en ratones Nude utilizando un modelo tumoral, donde la acumulación por gramo de tumor fue elevada. Además, esta captación del radiotrazador en el tumor se evidenció en las imágenes PET/CT realizadas. Finalmente, los estudios comparativos de imágenes PET/CT con la principal impureza peptídica marcada con ^{68}Ga , mostraron una captación tumoral *in vivo* del péptido de interés significativamente mayor que la obtenida para la impureza.

En definitiva, se ha profundizado en la química de marcación de un péptido con dos radionucleidos metálicos diferentes, utilizados recientemente como parateragnóstico, en los que se han encontrado similitudes y diferencias. El hecho de que el péptido haya presentado una alta sensibilidad a la radiación, ha sido todo un reto, lo que ha dado la oportunidad de ahondar en el uso y efecto de dos antioxidantes que resultaron complementarios. El aprendizaje adquirido ha permitido realizar varias propuestas para mejorar el estudio realizado, que también podrían destinarse a la marcación de otras moléculas con radionucleidos metálicos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biemar, F.; Foti, M. Global progress against cancer—challenges and opportunities. *Cancer Biol Med* **2013**, *10*, 183-186. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2013.04.001
2. Our world in data. Disponible en Internet (acceso 09/05/19): <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
3. Global Cancer Observatory. Disponible en Internet (acceso 09/05/19): http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0
4. Organización Mundial de la Salud. Disponible en Internet (acceso 09/05/19): <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
5. University of Rochester Medical Center - Health Encyclopedia. Disponible en Internet (acceso 27/05/19): <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=85&contentid=p07178>
6. Fass, L. Imaging and cancer: A review. *Molecular Oncology* **2008**, *2*, 115-152. DOI: 10.1016/j.molonc.2008.04.001
7. U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Disponible en Internet (acceso 04/06/19): <https://www.nlm.nih.gov/tsd/acquisitions/cdm/subjects15.html>
8. Weissleder, R. Molecular Imaging in Cancer. *Science* **2006**, *312*, 1168-1171. DOI: 10.1126/science.1125949
9. Kircher, M.F.; Hricak, H.; Larson, S.M. Molecular imaging for personalized cancer care. *Molecular Oncology* **2012**, *6*, 182-195. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.02.005
10. Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H. Molecular Imaging. En: *Nuclear Medicine: The Requisites*, 4ª edición; Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H., Editores; Elsevier Saunders: Philadelphia, **2014**; pp. 16-23. ISBN 978-0-323-08299-0
11. Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H. Radiopharmaceuticals. En: *Nuclear Medicine: The Requisites*, 4ª edición; Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H., Editores; Elsevier Saunders: Philadelphia, **2014**; pp. 1-15. ISBN 978-0-323-08299-0
12. Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H. Radiation Detection and Instrumentation. En: *Nuclear Medicine: The Requisites*, 4ª edición; Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H., Editores; Elsevier Saunders: Philadelphia, **2014**; pp. 37-50. ISBN 978-0-323-08299-0
13. Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H. Single-Photon Emission Computed Tomography, Positron Emission Tomography, and Hybrid Imaging. En: *Nuclear Medicine: The Requisites*, 4ª edición; Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H., Editores; Elsevier Saunders: Philadelphia, **2014**; pp. 51-65. ISBN 978-0-323-08299-0

14. Historia de la Medicina Nuclear en Uruguay. Disponible en Internet (acceso 19/07/19): <http://www.subimn.org.uy/sociedad/historia/>
15. Velikyan, I. Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical Development. *Theranostics* **2014**, *4*, 47-80. DOI: 10.7150/thno.7447
16. Nuclear Medicine Systems: PET Instrumentation. Disponible en Internet (acceso 24/07/19): <https://slideplayer.com/slide/6287062/>
17. Lammertsma, A.A. Forward to the Past: The Case for Quantitative PET Imaging. *J Nucl Med* **2017**, *58*, 1019-1024. DOI: 10.2967/jnumed.116.188029
18. Bailey, D.L.; Willowson, K.P. Quantitative SPET/CT: SPECT joins PET as a quantitative imaging modality. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, *41* (Suppl 1), 17-25. DOI: 10.1007/s00259-013-2542-4
19. Dickson, J.; Ross, J; Vöö, S. Quantitative SPECT: the time is now. *EJNMMI Physics* **2019**, *6*, 4-10. DOI: 10.1186/s40658-019-0241-3
20. Carlsson, J.; Stigbrand, T.; Adams, G.P. Introduction to Radionuclide Therapy. En: *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*; 1st ed.; Stigbrand, T., Carlsson, J., Adams, G.P., Eds.; Springer: **2008**; pp. 1-11. ISBN 978-1-4020-8695-3
21. Tolmachev, V. Choice of Radionuclides and Radiolabelling Techniques. En: *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*; 1st ed.; Stigbrand, T., Carlsson, J., Adams, G.P., Eds.; Springer: **2008**; pp. 145-174. ISBN 978-1-4020-8695-3
22. Sgouros, G. High-LET-Emitting Radionuclides for Cancer Therapy. En: *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*; 1st ed.; Stigbrand, T., Carlsson, J., Adams, G.P., Eds.; Springer: **2008**; pp. 175-180. ISBN 978-1-4020-8695-3
23. Read, E.D.; Eu, P.; Little, P.J.; Piva, T.J. The status of radioimmunotherapy in CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Targ Oncol* **2015**, *10*, 15-26. DOI: 10.1007/s11523-014-0324-y
24. Frejd, F.Y. Novel Alternative Scaffolds and Their Potential Use for Tumor Targeted Radionuclide Therapy. En: *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*; 1st ed.; Stigbrand, T., Carlsson, J., Adams, G.P., Eds.; Springer: **2008**; pp. 89-116. ISBN 978-1-4020-8695-3
25. Boonstra, M.C.; de Geus, S.W.L.; Prevoo, H.A.J.M.; Hawinkels, L.J.A.C.; van de Velde, C.J.H.; Kuppen, P.J.K.; Vahrmeijer, A.L.; Sier, C.F.M. Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins. *Biomarkers in Cancer* **2016**, *8*, 119-133. DOI: 10.4137/BIC.S38542
26. Kostelnik, T.I.; Orvig, C. Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy. *Chem Rev* **2019**, *119*, 902-956. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00294
27. Heppeler, A.; Froidevaux, A.N.; Eberle, A.N.; Maecke, H.R. Receptor Targeting for Tumor Localisation and Therapy with Radiopeptides. *Curr Med Chem* **2000**, *7*, 971-994. DOI: 10.2174/0929867003374516

28. Fani, M.; Maecke, H.R.; Okarvi, S.M. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2012**, *2*, 481-501. DOI: 10.7150/thno.4024
29. The Medical Biochemistry Page. Mechanisms of Cellular Signal Transduction. Disponible en Internet (acceso 03/09/19): <http://themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php>
30. Fukumura, T.; Nakao, R.; Yamaguchi, M.; Suzuki, K. Stability of ^{11}C -labeled PET radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot* **2004**, *61*, 1279-1287. DOI: 10.1016/j.apradiso.2004.04.011
31. Chen, J.; Linder, K.E.; Cagnolini, A.; Metcalfe, E.; Raju, N.; Tweedle, M.F.; Swenson, R.E. Synthesis, stabilization and formulation of [^{177}Lu]Lu-AMBA, a systemic radiotherapeutic agent for Gastrin Releasing Peptide receptor positive tumors. *Appl Radiat Isot* **2008**, *66*, 497-505. DOI: 10.1016/j.apradiso.2007.11.007
32. Garrison, W.M. Reaction Mechanisms in the Radiolysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. *Chem Rev* **1987**, *87*, 381-398. DOI: 10.1021/cr00078a006
33. Liu, S.; Edwards, D.S. Stabilization of ^{90}Y -Labeled DOTA-Biomolecule Conjugates Using Gentisic Acid and Ascorbic Acid. *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 554-558. DOI: 10.1021/bc000145v
34. Breeman, W.A.P.; Fröberg, A.C.; de Blois, E.; van Gameren, A.; Melis, M.; de Jong, M.; Maina, T.; Nock, B.A.; Erion, J.L.; Mäcke, H.R.; Krenning, E.P. Optimised labeling, preclinical and initial clinical aspects of CCK-2 receptor-targeting with 3 radiolabeled peptides. *Nucl Med Biol* **2008**, *35*, 839-849. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2008.09.006
35. de Blois, E.; Chan, H.S.; Konijnenberg, M.; de Zanger, R.; Breeman, W.A.P. Effectiveness of Quenchers to Reduce Radiolysis of ^{111}In - or ^{177}Lu -Labelled Methionine-Containing Regulatory Peptides. Maintaining Radiochemical Purity as Measured by HPLC. *Curr Top Med Chem* **2012**, *12*, 2677-2685. DOI: 10.2174/1568026611212230005
36. de Blois, E.; Chan, H.S.; de Zanger, R.; Konijnenberg, M.; Breeman, W.A.P. Application of single-vial ready-for-use formulation of ^{111}In - or ^{177}Lu -labelled somatostatin analogs. *Appl Radiat Isot* **2014**, *85*, 28-33. DOI: 10.1016/j.apradiso.2013.10.023
37. Pawlak, D.; Rangger, C.; Peitl, P.K.; Garnuszek, P.; Maurin, M.; Ihli, L.; Kroselj, M.; Maina, T.; Maecke, H.; Erba, P.; Kremser, L.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Mikolajczak, R.; Decristoforo, C. From preclinical development to clinical application: Kit formulation for radiolabelling the minigastrin analogue CP04 with In-111 for a first-in-human clinical trial. *Eur J Pharm Sci* **2016**, *85*, 1-9. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.01.023
38. Okoye, N.C.; Baumeister, J.E.; Khosroshahi, F.N.; Hennkens, H.M.; Jurisson, S.S. Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications. *Radiochim Acta* **2019**, *107*, 1087-1121. DOI: 10.1515/ract-2018-3090

39. Correia, J.D.G.; Paulo, A.; Raposinho, P.D.; Santos, I. Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy. *Dalton Trans* **2011**, *40*, 6144-6167. DOI: 10.1039/c0dt01599g
40. Theranostics Australia. What is Theranostics? Disponible en Internet (acceso 09/10/19): <http://theranostics.com.au/what-is-theranostics/>
41. Frangos, S.; Buscombe, J.R. Why should we be concerned about a “g”? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, *46*, 519. DOI: 10.1007/s00259-018-4204-z
42. Wild, D.; Bomanji, J.B.; Benkert, P.; Maecke, H.; Ell, P.J.; Reubi, J.C.; Caplin, M.E. Comparison of ⁶⁸Ga-DOTANOC and ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT within patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* **2013**, *54*, 364-372. DOI: 10.2967/jnumed.112.111724
43. Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Cescato, R.; Wild, D.; Wang, X.; Erchegyi, J.; Rivier, J.; Mäcke, H.R.; Reubi, J.C. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonist for *in vivo* peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 16436-16441. DOI: 10.1073/pnas.0607761103
44. Fani, M.; Nicolas, G.P.; Wild, D. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. *J Nucl Med* **2017**, *58*, 61S-66S. DOI: 10.2967/jnumed.116.186783
45. Fani, M.; Kolenc Peitl, P.; Velikyan, I. Current Status of Radiopharmaceuticals for the Theranostics of Neuroendocrine Neoplasms. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 30. DOI: 10.3390/ph10010030
46. Rehfeld, J.F. The New Biology of Gastrointestinal Hormones. *Physiol Rev* **1998**, *78*, 1087-1108. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.4.1087
47. Dufresne, M.; Seva, C.; Fourmy, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol Rev* **2006**, *86*, 805-847. DOI: 10.1152/physrev.00014.2005
48. Wikipedia, the free encyclopedia. Cholecystokinin. Disponible en internet (acceso 30/12/19): <https://en.wikipedia.org/wiki/Cholecystokinin>
49. Reubi, J.C. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr Rev* **2003**, *24*, 389-427. DOI: 10.1210/er.2002-0007
50. Reubi, J.C.; Waser, B.; Läderach, U.; Stettler, C.; Friess, H.; Halter, F.; Schmassmann, A. Localization of Cholecystokinin A and Cholecystokinin B-Gastrin Receptors in the Human Stomach. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 1197-1205. DOI: 10.1016/S0016-5085(97)70131-8
51. Roosenburg, S.; Laverman, P.; van Delft, F.L.; Boerman, O.C. Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors. *Amino Acids* **2011**, *41*, 1049-1058. DOI: 10.1007/s00726-010-0501-y
52. Reubi, J.C.; Schaer, J-C; Waser, B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/Gastrin Receptors in Human Tumors. *Cancer Res* **1997**, *57*, 1377-1386. PMID: 9102227
53. Reubi, J.C. Targeting CCK Receptors in Human Cancers. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, 1239-1242. DOI: 10.2174/156802607780960546

54. American Cancer Society. Cáncer de tiroides. Disponible en internet (acceso 17/01/20): <https://cancer.org/es/cancer/cancer-de-tiroides>
55. Šabani, M.; Jelovac, D.B.; Petrović, M.B.; Gavrić, M. Management of Advanced Medullary Thyroid Carcinoma. *Journal of Tumor* **2014**, *2*, 202-207. DOI: 10.6051/j.issn.1819-6187.2014.02.38
56. Roman, S.; Lin, R.; Sosa, J.A. Prognosis of Medullary Thyroid Carcinoma. Demographic, Clinical, and Pathologic Predictors of Survival in 1252 Cases. *Cancer* **2006**, *107*, 2134-2142. DOI: 10.1002/cncr.22244
57. Lanzarini, E.; Marambio, A.; Amat, J.; Rodríguez, F.; Gac, P.; Cabané, P.; Loehnert, R.; Marambio, J.P. Carcinoma medular de tiroides: Experiencia de 20 años. *Rev. Chilena de Cirugía* **2010**, *62*, 15-21. DOI: 10.4067/S0718-40262010000100003
58. Gotthardt, M.; Béhé, M.P.; Beuter, D.; Battmann, A.; Bauhofer, A.; Schurrat, T.; Schipper, M.; Pollum, H.; Oyen, W.J.G.; Behr, T.M. Improved tumour detection by gastrin receptor scintigraphy in patients with metastasised medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2006**, *33*, 1273-1279. DOI: 10.1007/s00259-006-0157-8
59. Reubi, J.C.; Waser, B.; Schaer, J.C.; Laederach, U.; Erion, J.; Srinivasan, A.; Schmidt, M.A.; Bugaj, J.E. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med* **1998**, *25*, 481-490. DOI: 10.1007/s002590050247
60. de Jong, M.; Bakker, W.H.; Bernard, B.F.; Valkema, R.; Kwekkeboom, D.J.; Reubi, J.C.; Srinivasan, A.; Schmidt, M.; Krenning, E.P. Preclinical and Initial Clinical Evaluation of ¹¹¹In-Labeled Nonsulfated CCK₈ Analog: A Peptide for CCK-B Receptor-Targeted Scintigraphy and Radionuclide Therapy. *J Nucl Med* **1999**, *40*, 2081-2087.
61. Kwekkeboom, D.J.; Bakker, W.H.; Kooij, P.P.M.; Erion, J.; Srinivasan, A.; de Jong, M.; Reubi, J.C.; Krenning, E.P. Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* **2000**, *27*, 1312-1317. DOI: 10.1007/s002590000296
62. Behr, T.M.; Jenner, N.; Radetzky, S.; Béhe, M.; Gratz, S.; Yücekent, S.; Raue, F.; Becker, W. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med* **1998**, *25*, 424-430. DOI: 10.1007/s002590050
63. Liu, Y.D.; Goetze, A.M.; Bass, R.B.; Flynn, G.C. N-terminal Glutamate to Pyroglutamate Conversion *in Vivo* for Human IgG2 Antibodies. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 11211-11217. DOI: 10.1074/jbc.M110.185041
64. Behr, T.M.; Jenner, N.; Béhé, M.; Angerstein, C.; Gratz, S.; Raue, F.; Becker, W. Radiolabeled Peptides for Targeting Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor-Expressing Tumors. *J Nucl Med* **1999**, *40*, 1029-1044. PMID: 10452322

65. Behr, T.M.; Béhé, M.P. Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor-Targeting Peptides for Staging and Therapy of Medullary Thyroid Cancer and Other Cholecystokinin-B Receptor-Expressing Malignancies. *Semin Nucl Med* **2002**, *32*, 97-109. DOI: 10.1053/snuc.2002.31028
66. Béhé, M.; Kluge, G.; Becker, W.; Gotthardt, M.; Behr, T.M. Use of Polyglutamic Acids to Reduce Uptake of Radiometal-Labeled Minigastrin in the Kidneys. *J Nucl Med* **2005**, *46*, 1012-1015. PMID: 15937313
67. Gotthardt, M.; van Eerd-Vismale, J.; Oyen, W.J.G.; de Jong, M.; Zhang, H.; Rolleman, E.; Maecke, H.R.; Béhé, M.; Boerman, O. Indication for Different Mechanisms of Kidney Uptake of Radiolabeled Peptides. *J Nucl Med* **2007**, *48*, 596-601. DOI: 10.2967/jnumed.106.036020
68. Mather, S.J.; McKenzie, A.J.; Sosabowski, J.K.; Morris, T.M.; Ellison, D.; Watson, S.A. Selection of Radiolabeled Gastrin Analogs for Peptide Receptor-Targeted Radionuclide Therapy. *J Nucl Med* **2007**, *48*, 615-622. DOI: 10.2967/jnumed.106.037085
69. Good, S.; Walter, M.A.; Waser, B.; Wang, X.; Müller-Brand, J.; Béhé, M.P.; Reubi, J-C.; Maecke, H.R. Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2008**, *35*, 1868-1877. DOI: 10.1007/s00259-008-0803-4
70. IAEA - Nuclear Data Section. Live Chart of Nuclides. Disponible en Internet (acceso 26/03/20): <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>
71. Velikyan, I. ⁶⁸Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules* **2015**, *20*, 12913-12943. DOI: 10.3390/molecules200712913
72. Roesch, F.; Filosofov, D.V. Production, radiochemical processing and quality evaluation of ⁶⁸Ge. En: *Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators: ⁶⁸Ge, ⁸²Sr, ⁹⁰Sr and ¹⁸⁸W*, IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No. 2; International Atomic Energy Agency: Vienna, **2010**; pp. 11-30. ISBN 978-92-0-101110-7
73. Synowiecki, M.A.; Perk, L.R.; Nijsen, J.F.W. Production of novel diagnostic radionuclides in small medical cyclotrons. *EJNMMI radiopharm chem* **2018**, *3*, 3 (1-25). DOI: 10.1186/s41181-018-0038-z
74. Introduction. En: *Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators: ⁶⁸Ge, ⁸²Sr, ⁹⁰Sr and ¹⁸⁸W*, IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No. 2; International Atomic Energy Agency: Vienna, **2010**; pp. 1-9. ISBN 978-92-0-101110-7
75. RadioMedix Innovating Theranostics. Gallium 68 Generators. ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator brochure. Disponible en Internet (acceso 02/04/20): http://radiomedix.com/wp-content/uploads/ITG_Ge68Ga68-Generator_160830_V2.0.pdf

76. ^{68}Ga Production. En: *Gallium-68 Cyclotron Production*, IAEA TECDOC SERIES, IAEA-TECDOC-1863; International Atomic Energy Agency: Vienna, **2019**; pp. 2-11. ISBN 978-92-0-100819-0
77. Green, M.A.; Welch, M.J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Nucl Med Biol* **1989**, *16*, 435-448. DOI: 10.1016/0883-2897(89)90053-6
78. Dabrowiak, J.C. Ruthenium, Titanium and Gallium for Treating Cancer. En: *Metals in Medicine*, 1^a edición; John Wiley & Sons: Chichester, **2009**; pp. 149-189. DOI: 10.1002/9780470684986.ch5
79. Bauwens, M.; Chekol, R.; Vanbilloen, H.; Bormans, G.; Verbruggen, A. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of ^{68}Ga -Dotatoc for clinical application. *Nucl Med Commun* **2010**, *31*, 753-758. DOI: 10.1097/MNM.0b013e32833acb99
80. Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I. Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg Chem* **2010**, *49*, 10960-10969. DOI: 10.1021/ic101378s
81. von Guggenberg, E.; Ocak, M.; Decristoforo, C. Labelling of receptor binding biomolecules with ^{177}Lu and development of clinical formulations for patient application. En: *Report of the 2nd Research Coordination Meeting on Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Based on ^{177}Lu for Radionuclide therapy*, Coordinated Research Project; International Atomic Energy Agency: Milan, **2008**; pp. 44-51.
82. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Gallium (^{68}Ga) edotreotide injection. *European Pharmacopeia 10.0*. 01/2013:2482 corrected 9.6; pp.1208-1210.
83. Pawlak, D.; Koumariou, E.; Mikolajczak, R. Development of therapeutic radiopharmaceuticals based on ^{177}Lu for radionuclide therapy. En: *Report of the 2nd Research Coordination Meeting on Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Based on ^{177}Lu for Radionuclide therapy*, Coordinated Research Project; International Atomic Energy Agency: Milan, **2008**; pp. 159-172.
84. Larenkov, A.A.; Maruk, A.Y. Radiochemical Purity of ^{68}Ga -BCA-Peptides: Separation of All ^{68}Ga Species with a Single iTLC Strip. *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering* **2016**, *10*(9), 1181-1188 (scholar.waset.org/1999.2/10005501)
85. Golchoubian, H.; Hosseinpour, F. Effective Oxidation of Sulfides to Sulfoxides with Hydrogen Peroxide under Transition-Metal-Free Conditions. *Molecules* **2007**, *12*, 304-311. DOI: 10.3390/12030304.
86. Eder, M.; Neels, O.; Müller, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Henrich, U.; Eisenhut, M.; Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Kopka, K. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 779-796. DOI: 10.3390/ph7070779

87. Procedimiento Operativo para la *Preparación manual de ⁶⁸Ga-DOTA-TATE*: CUDIM, Montevideo, Uruguay, **2011**. PO-PR-005-01.
88. Cyr, J.E.; Pearson, D.A. (2007). Traducción de patente europea: *Estabilización de composiciones radio-farmacéuticas usando tioéteres hidrofílicos o 6-hidroxicromanos hidrofílicos*. ES 2 282 326 T3. España: Oficina Española de patentes y marcas.
89. Velikyan, I.; Beyer, G.J.; Långström, B. Microwave-Supported Preparation of ⁶⁸Ga Bioconjugates with High Specific Radioactivity. *Bioconjug Chem* **2004**, *15*, 554-560. DOI: 10.1021/bc030078f
90. Savage, K.; Waller, H.A.; Stubbs, M.; Khan, K.; Watson, S.A.; Clarke, P.A.; Grimes, S.; Michaeli, D.; Dhillon, A.P.; Caplin, M.E. Targeting of cholecystokinin B/gastrin receptor in colonic, pancreatic and hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* **2006**, *29*, 1429-1435. DOI: 10.3892/ijo.29.6.1429
91. Paulmichl, A.; Summer, D.; Manzl, C.; Rangger, C.; Orlandi, F.; Niedermoser, S.; Taguchi, T.; Wängler, B.; Decristoforo, C. Targeting Gastrointestinal Stromal Tumor with ⁶⁸Ga-Labeled Peptides: An *In Vitro* Study on Gastrointestinal Stromal Tumor-Cell Lines. *Cancer Biother Radiopharm* **2016**, *31*, 302-310. DOI: 10.1089/cbr.2016.2092
92. Miller, N.J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters - radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters* **1996**, *392*, 40-44. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00780-6
93. Andjelković, M.; Van Camp, J.; De Meulenaer, B.; Depaemelaere, G.; Socaciu, C.; Verloo, M.; Verhe, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem* **2006**, *98*, 23-31. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.044
94. Exner, M.; Hermann, M.; Hofbauer, R.; Kapiotis, S.; Speiser, W.; Held, I.; Seelos, C.; Gmeiner, B.M.K. The salicylate metabolite gentisic acid, but not the parent drug, inhibits glucose autoxidation-mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *FEBS Letters* **2000**, *470*, 47-50. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01289-8
95. Bacarese-Hamilton, A.J.; Adrian, T.E.; Chohan, P.; Antony, T.; Bloom, S.R. Oxidation/Reduction of Methionine Residues in CCK: A Study by Radioimmunoassay and Isocratic Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Peptides* **1985**, *6*, 17-22. DOI: 10.1016/0196-9781(85)90069-5
96. Kaloudi, A. PhD thesis: Radiolabeled gastrins in CCK2R-positive tumor targeting - Toward improved diagnostic efficacy via in situ enzyme-inhibition approaches (2016). ISBN: 978-94-028-0179-8
97. Encyclopaedia Britannica. Lutetium. Disponible en Internet (acceso 04/12/20): <https://www.britannica.com/science/lutetium>

98. Dash, A.; Pillai, M.R.A.; Knapp Jr., F.F. Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nucl Med Mol Imaging* **2015**, *49*, 85-107. DOI: 10.1007/s13139-014-0315-z
99. Gleisner, K.S.; Brolin, G.; Sundlöv, A.; Mjekiqi, E.; Östlund, K.; Tennvall, J.; Larsson, E. Long-term retention of $^{177}\text{Lu}/^{177\text{m}}\text{Lu}$ -Dotatate in patients investigated by gamma spectrometry and gamma camera imaging. *J Nucl Med* **2015**, *56*, 976-984. DOI: 10.2967/jnumed.115.155390
100. Stechynska, E.; Vasylechko, V.; Gryshchouk, G.; Patsay, I. Preconcentration of Lutetium from Aqueous Solution by Transcarpathian Clinoptilolite. *Acta Chim Slov* **2020**, *67*, 105-112. DOI: 10.17344/acsi.2019.5233
101. Aime, S.; Barge, A.; Botta, M.; Fasano, M.; Ayala, J.D.; Bombieri, G. Crystal structure and solution dynamics of the lutetium(III) chelate of DOTA. *Inorg Chim Acta* **1996**, *246*, 423-429. DOI: 10.1016/0020-1693(96)05130-4
102. Viola-Villegas, N.; Doyle, R.P. The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (H_4DOTA): Structural overview and analyses on structure-stability relationships. *Coord Chem Rev* **2009**, *253*, 1906-1925. DOI: doi:10.1016/j.ccr.2009.03.013
103. Liu, S.; Edwards, D.S. Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 7-34. DOI: 10.1021/bc000070v
104. Breeman, W.A.P.; de Jong, M.; Visser, T.J.; Erion, J.L.; Krenning, E.P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2003**, *30*, 917-920. DOI: 10.1007/s00259-003-1142-0
105. Schoffelen, R.; Sharkey, R.M.; Goldenberg, D.M.; Franssen, G.; McBride, W.J.; Rossi, E.A.; Chang, C-H.; Laverman, P.; Disselhorst, J.A.; Eek, A.; van der Graaf, W.T.A.; Oyen, W.J.G.; Boerman, O.C. Pretargeted ImmunoPET Imaging of CEA-expressing Tumors with a Bispecific Antibody and a ^{68}Ga - and ^{18}F -labeled Hapten-peptide in Mice with Human Tumor Xenografts. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 1019-1027. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0862
106. Balter, H.; Trindade, V.; Terán, M.; Gaudiano, J.; Ferrando, R.; Paolino, A.; Rodríguez, G.; Hermida, J.; De Marco, E.; Oliver, P. ^{177}Lu -Labeled Agents for Neuroendocrine Tumor Therapy and Bone Pain Palliation in Uruguay. *Curr Radiopharm* **2016**, *9*, 85-93. DOI: 10.2174/1874471008666150313112620
107. Davies, M.J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* **2016**, *473*, 805-825. DOI: 10.1042/BJ20151227
108. Gebicki, S.; Gebicki, J.M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J* **1993**, *289*, 743-749. DOI: 10.1042/bj2890743
109. Sarmadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **2010**, *31*, 1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020

110. Verlackt, C.C.W.; Van Boxem, W.; Dewaele, D.; Lemièrre, F.; Sobott, F.; Benedikt, J.; Neyts, E.C.; Bogaerts, A. Mechanisms of Peptide Oxidation by Hydroxyl Radicals: Insight at the Molecular Scale. *J Phys Chem C* **2017**, *121*, 5787-5799. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b12278
111. Moerlein, S.M., Welch, M.J. The Chemistry of Gallium and Indium as Related to Radiopharmaceutical Production. *Int J Nucl Med Biol* **1981**, *8*, 277-287. DOI: 10.1016/0047-0740(81)90034-6
112. Clarke, E.T.; Martell, A.E. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorg Chim Acta* **1991**, *190*, 37-46. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)80229-7
113. Wang, X.; Jin, T.; Comblin, V.; Lopez-Mut, A.; Merciny, E.; Desreux, J.F. A Kinetic Investigation of the Lanthanide DOTA Chelates. Stability and Rates of Formation and of Dissociation of a Macrocyclic Gadolinium (III) Polyaza Polycarboxylic MRI Contrast Agent. *Inorg Chem* **1992**, *31*, 1095-1099. DOI: 10.1021/ic00032a034
114. Choe, E.; Min, D.B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2009**, *8*, 345-358. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x
115. Amorati, R.; Pedulli, G.F.; Cabrini, L.; Zambonin, L.; Landi, L. Solvent and pH Effects on the Antioxidant Activity of Caffeic and Other Phenolic Acids. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 2932-2937. DOI: 10.1021/jf053159+
116. Erdemgil, F.Z.; Şanlı, S.; Şanlı, N.; Özkan, G.; Barbosa, J.; Guiteras, J.; Beltrán, J.L. Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta* **2007**, *72*, 489-496. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.11.007
117. Sazou, D.; Papadopoulos, N. The electrochemical oxidation of 2,5-dihydroxybenzoic acid on a mercury electrode in aqueous solutions. *Can J Chem* **1986**, *64*, 11-14. DOI: 10.1139/v86-003
118. Taylor, A.J.; Clydesdale, F.M. Potential of Oxidised Phenolics as Food Colourants. *Food Chem* **1987**, *24*, 301-313. DOI: 10.1016/0308-8146(87)90105-1
119. Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* **1999**, *66*, 401-436. DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00093-X
120. Serra, H.M.; Cafaro, T.A. Ascorbic acid: from chemistry to its crucial protective role in the eye. *Acta Bioquím Clín Latinoam* **2007**, *41*, 525-532.
121. Kramarenko, G.G.; Hummel, S.G.; Martin, S.M.; Buettner, G.R. Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide. *Photochem Photobiol* **2006**, *82*, 1634-1637. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2006.tb09823.x
122. Li, S.; Schöneich, C.; Wilson, G.S.; Borchardt, R.T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. V. Ascorbic Acid Promotes Rather than Inhibits the Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide in Small Model Peptides. *Pharm Res* **1993**, *10*, 1572-1579. DOI: 10.1023/A:1018960300769

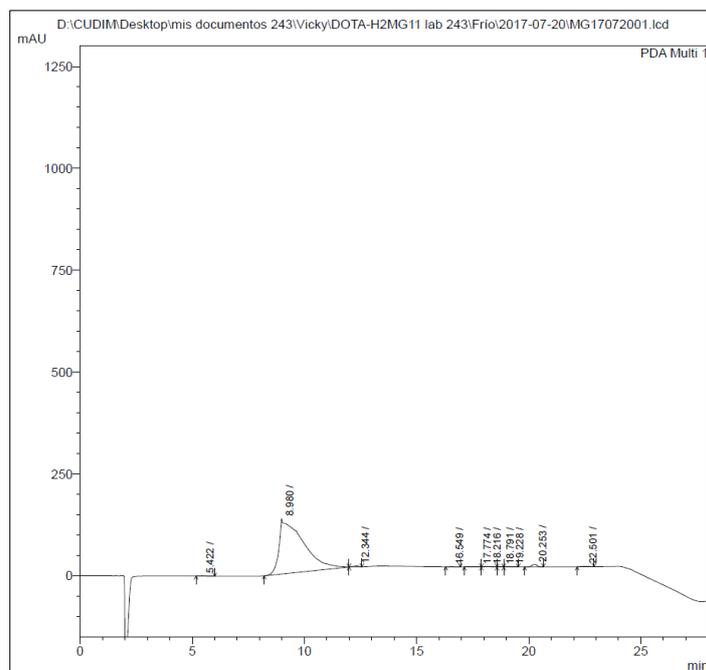
123. Li, S.; Schöneich, C.; Borchardt, R.T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. VIII. Oxidation of Methionine in Small Model Peptides by Prooxidant/Transition Metal Ion Systems: Influence of Selective Scavengers for Reactive Oxygen Intermediates. *Pharm Res* **1995**, *12*, 348-355. DOI: 10.1023/A:1016240115675
124. Joshi, R.; Gangabhairathi, R.; Venu, S.; Adhikari, S.; Mukherjee, T. Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: *in-vitro* and pulse radiolysis studies. *Free Radic Res* **2012**, *46*, 11-20. DOI: 10.3109/10715762.2011.633518
125. LaVerne, J.A. OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. *Radiat Res* **2000**, *153*, 196-200. DOI: 10.1667/0033-7587(2000)153[0196:ORAOP]2.0.CO;2
126. Le Caër, S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* **2011**, *3*, 235-253. DOI: 10.3390/w3010235
127. Fawdry, R.M. Radiolysis of 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and the role of reductant stabilisers. *Appl Radiat Isot* **2007**, *65*, 1193-1201. DOI: 10.1016/j.apradiso.2007.05.011
128. Maurin, M.; Garnuszek, P.; Baran, P.; Pawlak, D.; Mikołajczak, R. The radiometal makes a difference. Synthesis and preliminary characterization of DOTA-minigastrin analogue complexes with Ga, Lu and Y. *Nuclear Med Rev* **2015**, *18*, 51-55. DOI: 0.5603/NMR.2015.0014
129. Biotage. Microwave heating - a route to better quality crude peptides. Disponible en Internet (acceso 30/03/21): <https://selekt.biotage.com/peptideblogs/microwave-heating-a-route-to-better-quality-crude-peptides>
130. Velikyan, I.; Maecke, H.; Långström, B. Convenient Preparation of ⁶⁸Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature. *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 569-573. DOI: 10.1021/bc700341x
131. Chakravarty, R.; Chakraborty, S.; Dash, A.; Pillai, M.R.A. Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted ⁶⁸Ga with different bifunctional chelators. *Nucl Med Biol* **2013**, *40*, 197-205. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.11.001
132. Ocak, M.; Helbok, A.; Rangger, C.; Peitl, P.K.; Nock, B.A.; Morelli, G.; Eek, A.; Sosabowski, J.K.; Breeman, W.A.P.; Reubi, J.C.; Decristoforo, C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2011**, *38*, 1426-1435. DOI: 10.1007/s00259-011-1818-9
133. Pauwels, S.; Najdovski, T.; Dimaline, R.; Lee, C.M.; Deschodt-Lanckman, M. Degradation of human gastrin and CCK by endopeptidase 24.11: differential behaviour of the sulphated and unsulphated peptides. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *996*, 82-88. DOI: 10.1016/0167-4838(89)90098-8
134. Klingler, M.; Summer, D.; Rangger, C.; Haubner, R.; Foster, J.; Sosabowski, J.; Decristoforo, C.; Virgolini, I.; von Guggenberg, E. DOTA-

MGS5, a New Cholecystokinin-2 Receptor-Targeting Peptide Analog with an Optimized Targeting Profile for Theranostic Use. *J Nucl Med* **2019**, *60*, 1010-1016. DOI: 10.2967/jnumed.118.221283

135. Klingler, M.; Hörmann, A.A.; Rangger, C.; Desrues, L.; Castel, H.; Gandolfo, P.; von Guggenberg, E. Stabilization Strategies for Linear Analogues: Further Improvements *via* de Inclusion of Proline into the Peptide Sequence. *J Med Chem* **2020**, *63*, 14668-14679. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01233

APÉNDICE 1: Figuras

Cromatograma de la línea de base obtenida por HPLC (Gradiente 1, detección UV a $\lambda = 214$ nm), en el que se aprecia el pico en 8-11 min debido al cambio en el gradiente de los solventes.



APÉNDICE 2: Divulgación de resultados

Presentación en Congresos

“Péptido derivado de Minigastrina: estudios preliminares del marcado con ^{177}Lu ” Victoria Trindade, Marcelo Fernández, Graciela Rodríguez, Patricia Oliver, Henia Balter. *Alasbimn Journal* 12(46): October 2009.

Presentación de póster (H. Balter) en “XXII Congreso de ALASBIMN”. Cartagena de Indias, Colombia. 5 al 7 de noviembre de 2009.

“ ^{68}Ga and ^{177}Lu for diagnosis and therapy of tumors expressing CCK-2 receptors” Trindade, V.; Reyes, L.; Vasilskis, E.; Kreimerman, I.; Oliver, P.; Engler, H.; Balter, H. Presentación oral en “12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine”. Punta del Este, Uruguay. 11 al 13 de marzo de 2013.

“ ^{68}Ga -DOTA-His2-MG11: Labelling optimization, stability studies and preclinical evaluation of a Minigastrin peptide analogue” Trindade, V.; Bentancor, N.; Reyes, L.; Vasilskis, E.; Oliver, P.; Balter, H.; Engler, H. Presentación de póster en “XI Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, XXIV Congress of ALASBIMN y III Congreso de la Federación Mexicana de Medicina Nuclear e Imagen Molecular”. Cancún, México. 27 al 31 de agosto de 2014.

“ ^{177}Lu -DOTA-His2-MG11: Evaluation for CCK-2 receptor targeted therapy” Trindade, V.; Reyes, L.; Vasilskis, E.; Oliver, P.; Balter, H.; Engler, H. Presentación de póster en “XI Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, XXIV Congress of ALASBIMN y III Congreso de la Federación Mexicana de Medicina Nuclear e Imagen Molecular”. Cancún, México. 27 al 31 de agosto de 2014.

“Importancia de la conjunción de antioxidantes en el marcado de ^{177}Lu -Minigastrina” Victoria Trindade, Henia Balter, Henry Engler. Presentación de póster en “7º Congreso Uruguayo de Medicina Nuclear” organizado por la Sociedad Uruguaya de Biología y Medicina Nuclear. Montevideo, Uruguay. 30 de noviembre al 1 de diciembre de 2018.

Publicaciones

Oxidant and Antioxidant Effects of Gentisic Acid in a ^{177}Lu -Labelled Methionine-Containing Minigastrin Analogue. Trindade, V.; Balter, H. *Current Radiopharmaceuticals* 2020, 13, 107-119.

DOI: 10.2174/1874471012666190916112904