



Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM)
Facultad de Química - Universidad de la República (UdelaR)
PEDECIBA Química

TESIS DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

“Inhibidores de PSMA radiomarcados con ^{68}Ga en el diagnóstico de Cáncer de Próstata”

Q.F. Natalí Elizabeth Bentancor Díaz

Directora de Tesis: Dra. Henia Balter

Directora Académica: Dra. Ana Rey

Asesor Académico: Dr. Henry Engler

Montevideo, Uruguay

Diciembre, 2018

*A mis padres y hermanos,
por acompañarme incondicionalmente siempre.*

ÍNDICE

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	10
1.1) Definición e importancia del Cáncer de Próstata	10
1.2) Imagenología del CaP y Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	12
1.3) Producción de radiofármacos PET	14
1.4) Aplicaciones del ^{68}Ga en Radiofarmacia	16
1.5) Radiofármacos PET para diagnóstico de CaP	20
1.6) PSMA como blanco molecular de CaP	23
1.7) Expresión fisiológica de PSMA en sitios no prostáticos	25
1.8) Desarrollo de radiotrazadores dirigidos al PSMA	26
1.8.1) Estructura del sitio activo del PSMA	26
1.8.2) Anticuerpos PSMA-específicos	28
1.8.3) Inhibidores de PSMA de bajo peso molecular	28
1.8.4) Moléculas basadas en estructura tipo urea	29
1.8.5) [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en el diagnóstico de CaP	31
1.9) Objetivos	34
2. CAPÍTULO I: Purificación del eluido del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	35
2.1) Introducción	35
2.1.1) Purificación mediante intercambio catiónico	35
2.1.2) Purificación mediante intercambio aniónico	36
2.2) Parte experimental	36
2.2.1) Materiales y equipos	36
2.2.2) Métodos	37
2.2.2.1) Purificación mediante intercambio aniónico	37
2.2.2.2) Purificación mediante intercambio catiónico	37
2.3) Resultados y Discusión	38
2.3.1) Intercambio aniónico	38
2.3.2) Intercambio catiónico	40
2.4) Conclusiones	41
3. CAPÍTULO II: Síntesis y control de calidad de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11	42
3.1) Introducción	42
3.1.1) Características del complejo [^{68}Ga]Ga-HBEDD-CC	42
3.1.2) Efecto de la radiolisis	43
3.2) Parte experimental	44
3.2.1) Materiales y equipos	44
3.2.2) Métodos	45
3.2.2.1) Optimización de la marcación de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11	45
3.2.2.2) Marcación de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en módulo de síntesis	46
3.2.2.3) Control de calidad de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11	46

3.3) Resultados y Discusión	48
3.3.1) Optimización de la marcación de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	48
3.3.2) Estudio de diastereómeros de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	49
3.3.3) Estudio de impurezas de alto t _R en las marcaciones de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	51
3.3.4) Marcación de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en módulo de síntesis	55
3.3.5) Control de calidad de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	56
3.4) Conclusiones	59
4. CAPÍTULO III: Evaluación <i>in vitro</i> de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11	60
4.1) Introducción	60
4.1.1) Líneas celulares humanas de CaP	60
4.1.2) Estudio de la interacción ligando – receptor	61
4.2) Parte experimental	62
4.2.1) Materiales y equipos	62
4.2.2) Métodos	63
4.2.2.1) Ensayo de unión e internalización celular de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP	63
4.2.2.2) Evaluación del comportamiento de los diastereómeros de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP	64
4.2.2.3) Análisis estadístico	64
4.2.2.4) Determinación de IC ₅₀	64
4.3) Resultados y Discusión	65
4.3.1) Ensayo de unión e internalización celular de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP	66
4.3.2) Evaluación del comportamiento de los diastereómeros de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP	69
4.3.3) Determinación de IC ₅₀	71
4.4) Conclusiones	72
5. CAPÍTULO IV: Evaluación <i>in vivo</i> de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11	73
5.1) Introducción	73
5.1.1) Modelos xenográficos de CaP en animales de experimentación	73
5.1.2) Técnicas de evaluación biológica de radiotrazadores	74
5.2) Parte experimental	75
5.2.1) Materiales y equipos	75
5.2.2) Métodos	75
5.2.2.1) Animales de experimentación y líneas celulares	75
5.2.2.2) Desarrollo de los modelos tumorales	76
5.2.2.3) Estudios de biodistribución de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en animales sanos y con tumor	76
5.2.2.4) Estudios <i>in vivo</i> de imagenología molecular PET/CT con [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	77
5.2.2.5) Evaluación del comportamiento <i>in vivo</i> de los diastereómeros de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo animal de CaP	78

5.2.2.6) Evaluación del efecto de la actividad específica de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en estudios imagenológicos PET/CT en un modelo animal de CaP	78
5.2.2.7) Análisis estadístico	78
5.3) Resultados y Discusión	79
5.3.1) Puesta a punto de dos modelos animales de CaP	79
5.3.2) Estudios de biodistribución de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en animales sanos	81
5.3.3) Estudios de biodistribución de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo animal de CaP	83
5.3.4) Estudios <i>in vivo</i> de imagenología molecular PET/CT con [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en modelo tumoral de CaP	84
5.3.4.1) Seguimiento del tamaño tumoral	84
5.3.4.2) Evaluación del comportamiento <i>in vivo</i> de los diastereómeros de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	86
5.3.4.3) Evaluación del efecto de la actividad específica de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 en estudios imagenológicos PET/CT en un modelo animal de CaP	88
5.4) Conclusiones	90
6. CONCLUSIONES GENERALES	92
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
AGRADECIMIENTOS	101
ANEXO – Instancias de divulgación de resultados	102

ABREVIATURAS

Aesp	Actividad específica
CaP	Cáncer de próstata
CUDIM	Centro Uruguayo de Imagenología Molecular
CT	Tomografía Computada
% DI	Porcentaje de dosis en el órgano en cuestión, en función de la dosis total inyectada al animal
% DI/g	Porcentaje de dosis en el órgano en cuestión, corregido según el peso del órgano.
DS	Desviación estándar
EP	Farmacopea Europea
GMP	Good Manufacturing Practices
HBED-CC	ácido <i>N,N'</i> -bis[2-hidroxi-5-(carboxietil)bencil]etilendiamin- <i>N,N'</i> -diacético
HCl_{cc}	Ácido clorhídrico concentrado
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50 %
ITLC-SG	Cromatografía en capa fina instantánea, con soporte de sílica gel de alta resolución
NAAG	N-acetil-aspartil-glutamato
PAP	Fosfatasa ácida prostática
PBS	Buffer fosfato salino
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PET/CT	Tomografía por Emisión de Positrones acoplada a Tomografía Computada
2-PMPA	ácido 2-fosfometilpentanodioico
PRQ	Pureza radioquímica
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno prostático específico de membrana
RA	Receptor androgénico
RMI	Resonancia Magnética Nuclear
SFB	Suero fetal bovino
SPECT	Tomografía Computarizada de Fotón Único
T.A	Temperatura ambiente
T_{1/2}	Período de semidesintegración
T/NT	Relación target/no target (tumor/músculo)
USP	United States Pharmacopeia

RESUMEN

En Uruguay el cáncer de próstata (CaP) es el de mayor incidencia en el hombre y el segundo en mortalidad, seguido por el cáncer de pulmón, representando un importante problema de salud pública. Durante su progresión, el CaP puede comenzar como un tumor bien diferenciado, de crecimiento lento y andrógeno-dependiente, pero puede evolucionar hacia tumores cada vez más indiferenciados, agresivos y andrógeno-independientes. Esto implica que el CaP sea una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico y clínico, lo que determina la necesidad de contar con métodos diagnósticos específicos, precisos y actualizados.

Las técnicas de diagnóstico por imagen más usuales, como la resonancia magnética (RMI), tomografía computada (CT) y la ecografía, proporcionan imágenes exclusivamente estructurales del órgano de interés. La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica imagenológica no invasiva, que proporciona información metabólica adicional y tiene un rol relevante en el campo de la oncología. Estas tecnologías pueden combinarse para obtener imágenes funcionales y anatómicas superpuestas (PET/CT, PET/CT/RMI), permitiendo localizar con certeza el tumor primario y las metástasis. La imagenología molecular PET/CT constituye una herramienta útil para la cuantificación y caracterización de la biología tumoral *in vivo*.

El radiofármaco de referencia inicialmente utilizado en Uruguay para diagnóstico clínico de CaP fue la [^{11}C]colina. Sin embargo, este radiotrazador no posee las características óptimas en cuanto a sensibilidad y especificidad, especialmente si el nivel de PSA es bajo. En consecuencia se requieren radiotrazadores con mayor sensibilidad para pacientes en recaída bioquímica y niveles de PSA bajos, lo cual representa una constante búsqueda de moléculas sensibles para el diagnóstico de CaP y para la monitorización de la terapia.

En tal sentido, el presente trabajo tiene por objetivo la obtención y evaluación *in vitro* e *in vivo*, de nuevos radiotrazadores PET marcados con ^{68}Ga , que contribuyan al diagnóstico clínico del CaP.

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA), es una metaloenzima que se encuentra sobreexpresada de 100 a 1000 veces más en el 95% de las células de CaP. Se ha encontrado correlación entre la expresión elevada de PSMA y el aumento del grado de la enfermedad. Estos datos apoyan los usos clínicos potenciales para el PSMA en pacientes con CaP. También se ha observado que el PSMA se expresa en la

neovasculatura asociada a tumores sólidos, mientras que no está presente en la vasculatura normal, lo cual amplía las aplicaciones de dicha enzima. Se han desarrollado diversos agentes inhibidores de PSMA orientados al diagnóstico del CaP por imagenología PET/CT, de los cuales el [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 ha sido el más utilizado. Los resultados preliminares obtenidos a nivel preclínico, resultaron muy prometedores y alentaron la rápida introducción clínica de este agente imagenológico para el CaP en Alemania. Se han reportado diversos estudios en pacientes, comparando los estudios realizados con [^{18}F] / [^{11}C]colina y [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Como conclusión de dichos estudios, en pacientes con CaP en recaída bioquímica y con bajos niveles de PSA, el [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 detectó más lesiones que la [^{11}C]colina o [^{18}F]fluorcolina, es decir presentó mayor sensibilidad.

En esta tesis de Maestría, se optimizó la marcación y control de calidad de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, obteniendo un radiotrazador PET de elevada pureza y actividad específica. Se lograron separar y cuantificar mediante HPLC analítico los diastereómeros de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 y las distintas impurezas radioquímicas. A su vez se ensayaron métodos de purificación de soluciones de ^{68}Ga , de modo de disminuir las impurezas metálicas e incrementar la actividad específica del radiotrazador obtenido.

Se estudió el comportamiento de dichos diastereómeros en solución acuosa y se observó la interconversión de uno en el otro en función del tiempo post-marcación y del pH de la solución, identificándose a uno de ellos como el menos estable (D2).

La caracterización *in vitro* del radiotrazador demostró su captación específica e internalización mediante un mecanismo receptor - específico, en dos modelos tumorales de CaP humano andrógeno-dependiente. Si bien no fue posible aislar ambos diastereómeros, se evaluó el comportamiento *in vitro* de una mezcla de ellos, en la cual la proporción del diastereómero menos estable fue mayor. De dichos estudios se obtuvo una captación en cultivos celulares similar a la obtenida con la mezcla en la cual su proporción es mucho menor.

La evaluación biológica de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 se llevó a cabo empleando un modelo murino control (ratones sanos) y un modelo tumoral de CaP humano. En base a los ensayos de biodistribución realizados con el grupo control, se determinó que el radiotrazador presenta una alta eliminación por excreción urinaria, además de rápida depuración sanguínea y una buena estabilidad *in vivo*. El mismo perfil se observó en los estudios realizados utilizando el modelo tumoral, el cual además permitió evaluar la captación tumoral de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, que fue significativamente mayor que la

obtenida para el músculo, tomado como tejido sano de referencia, en todos los tiempos analizados. Los estudios de imagenología PET/CT mostraron una captación tumoral *in vivo* de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 que se incrementa a medida que el tumor crece. A su vez, permitió evaluar el comportamiento *in vivo* de los diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, que no presentaron diferencia en la captación tumoral, en dos etapas diferentes de crecimiento del tumor. También se analizó el efecto de la actividad específica del radiotrazador en su captación tumoral *in vivo*, determinando que efectivamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos con marcados de baja y elevada actividad específica. Dichos estudios son novedosos, ya que no se han reportado estudios similares con el radiotrazador en estudio. Estos resultados sugieren que el radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 presenta características óptimas para su aplicación como agente diagnóstico por imagen para el CaP.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1) Definición e importancia del Cáncer de Próstata

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento y diseminación incontrolados de un conjunto de células del cuerpo. Más precisamente el cáncer de próstata (CaP), se origina cuando las células de la próstata comienzan a crecer sin control, proceso que en general termina produciendo un adenocarcinoma. [1] Tradicionalmente se ha relacionado el riesgo de padecer cáncer con un estilo de vida no saludable, por ejemplo, el tabaquismo. Sin embargo, existen otros factores que pueden provocar dicha enfermedad, como factores internos, propios de cada persona (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunológicas y mutaciones que pueden ocurrir como consecuencia del propio metabolismo), o bien otros factores externos (agentes químicos, radiaciones e infecciones). [2]

El cáncer puede afectar a cualquier ser humano, pero existen diferencias epidemiológicas importantes a nivel internacional y regional. Uruguay presenta una tasa de incidencia estandarizada de cáncer de 298 casos / 100.000 personas-año, si se tienen en cuenta todos los tipos de cáncer en hombres y mujeres. En el contexto internacional, dicho valor resulta próximo a la estimación que realiza la IARC (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer) para el conjunto de países más desarrollados (267 / 100.000 casos). Este alto nivel de incidencia refleja una buena tasa de detección del cáncer en nuestro país, pero no aporta datos acerca del estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico. [2]

En Uruguay el CaP es el de mayor incidencia en el hombre y el segundo en mortalidad, luego del cáncer de pulmón. El envejecimiento de la población, y el uso cada vez más difundido de la dosificación del Antígeno Prostático Específico (PSA), ha provocado un aumento en la incidencia de la enfermedad. Según los datos del Registro Nacional del Cáncer, en el período 2009-2013, el promedio anual de mortalidad por CaP fue de 609 casos, mientras que la incidencia promedio fue de 1448. [3] La tasa de incidencia del CaP en Uruguay se aproxima a la de los países más desarrollados. La tasa de mortalidad es considerablemente mayor que la de los países más desarrollados, lo cual resulta en una relación mortalidad / incidencia semejante a la de los países menos desarrollados.

El riesgo de padecer CaP está fuertemente asociado a la edad, la historia familiar y la etnia, siendo la edad el factor de riesgo más importante. Clínicamente, el CaP se diagnostica mayoritariamente en hombres mayores de 60 años, mientras que solamente el 1% de estos tumores ocurren en hombres menores a 50. [2]

El CaP puede evolucionar desde un proceso indolente localizado en la próstata, a una recaída bioquímica después de un tratamiento radical con intención curativa, generando una enfermedad metastásica letal y resistente a la castración androgénica. Durante su progresión, el CaP puede comenzar como un tumor bien diferenciado, de crecimiento lento y andrógeno-dependiente, pero puede evolucionar hacia tumores cada vez más indiferenciados, agresivos y andrógeno-independientes. [4]

El tacto rectal es un examen médico que permite palpar la glándula prostática a través del recto, pudiendo evidenciar zonas anormales en la parte posterior de la próstata, donde comienzan la mayoría de los CaP. En pacientes mayores de 40 años se recomienda realizar la determinación sanguínea de PSA, uno de los marcadores de CaP más extensamente estudiados.

El PSA es una glicoproteína excretada por las células epiteliales de la próstata hacia el semen, por lo cual no es esperable que se encuentre en grandes cantidades en la sangre. La mayoría de los hombres tienen niveles de PSA menores a 4 ng/mL de sangre. La probabilidad de tener CaP aumenta a medida que el nivel de PSA sube, y más aún si se sobrepasa los 4 ng/mL. Sin embargo, un nivel por debajo de dicho valor no garantiza la ausencia de la enfermedad. Se estima que alrededor del 15% de los hombres que tienen un PSA menor de 4 ng/mL presentará CaP en una biopsia, mientras que si el PSA es mayor de 10 ng/mL, la probabilidad de tener CaP es mayor al 50%. Si bien la determinación de este biomarcador resulta muy práctica, existen varios factores ajenos al CaP que pueden elevar los niveles de PSA en sangre, tales como la prostatitis (infección o inflamación de la glándula) y la hiperplasia benigna de próstata (agrandamiento no canceroso de la próstata). A su vez, se ha demostrado que los niveles de PSA en sangre aumentan con la edad del paciente y con la administración de ciertos medicamentos que aumenten el nivel de testosterona. En estos casos, un valor de PSA elevado, podría no estar tan estrechamente relacionado con un CaP, limitando la utilidad de este estudio en el diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, existen diversos factores que inducen una disminución del nivel sanguíneo de PSA, como la obesidad o los tratamientos prolongados con estatinas, diuréticos tiazídicos e inhibidores de la 5- α -reductasa. [5]

Como se ha mencionado, desde el punto de vista biológico y clínico, el CaP es una enfermedad heterogénea, lo que determina la necesidad de contar con métodos diagnósticos específicos, precisos y actualizados. Por dichos motivos, se requieren estudios adicionales para el diagnóstico certero de CaP, como puede ser una biopsia en los casos sospechosos, o la determinación de otro biomarcador específico que se encuentre sobre-expresado, como por ejemplo el PCA3, entre otros [6], para complementar la información que aporten las técnicas imagenológicas.

1.2) Imagenología del CaP y Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

Las técnicas de diagnóstico por imagen más usuales, como la resonancia magnética (RMI), tomografía computada (CT) y la ecografía, proporcionan una imagen exclusivamente estructural del órgano de interés. La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT), proporcionan información metabólica adicional y han ganado interés en el campo de la oncología. Esto se debe principalmente a la alta eficiencia de detección de las desintegraciones radiactivas, que permite obtener imágenes funcionales de alta resolución con cantidades mínimas de trazador. Además, estas tecnologías pueden combinarse para obtener imágenes funcionales y anatómicas superpuestas (PET/CT, PET/CT/RMI, SPECT/CT).

Los métodos imagenológicos como el PET/CT, permiten localizar con certeza el tumor primario y las metástasis. Además el PET/CT permite mejorar considerablemente la calidad de imagen y la cuantificación de la captación respecto al SPECT. Estas técnicas resultan no invasivas, ya que consisten en la administración previa al paciente de una molécula marcada con un radionucleido (radiofármaco), generalmente por vía intravenosa o por otra vía, según el caso. Este radiofármaco es elegido adecuadamente para fijarse en el tejido, órgano o sistema a estudiar, realizándose su seguimiento desde el exterior a través de una gamma-cámara (si es un estudio SPECT) o una cámara PET, que registra la emisión de radiación por parte del radionucleido administrado. La cantidad de radiación recibida por el paciente es similar a la de cualquier otro tipo de estudio radiológico convencional. [7]

Los radionucleidos emisores de positrones son átomos inestables, con menor número de neutrones que los necesarios para lograr la estabilidad, por lo cual sufren la transformación espontánea de un protón en un neutrón, con emisión de un positrón (β^+) y un neutrino: $p^+ \rightarrow n + \beta^+ + \nu + Q$

Debido a la disminución del número atómico (por la pérdida de un protón), es necesario que se elimine un electrón de los orbitales electrónicos del nucleido hijo para mantener la neutralidad. Los positrones, tras ser emitidos, pierden su energía por colisiones atravesando una corta distancia en el medio, y una vez cercanos al reposo, cuando su velocidad tiende a cero, se combinan con su antipartícula, el electrón orbital, produciéndose el fenómeno de aniquilación. De esta manera la masa de ambas partículas en reposo se convierte en energía (ecuación de Einstein: $E = mc^2$), generándose dos fotones de 511 keV cada uno que se eyectan con la misma dirección y en sentidos opuestos (a 180°).

Las cámaras PET permiten la detección de los dos fotones emitidos simultáneamente por la aniquilación del positrón, si alcanzan los cristales de centelleo dentro de la ventana temporal de coincidencia (del orden de 10 nseg). Por tanto, cuando se registran sucesos en detectores opuestos espacialmente, con menos de 10 nseg de separación temporal entre ellos, se aceptan como coincidentes, por lo cual se registran y se procesan para generar la imagen. Esta energía, no solo es captada, sino también amplificada y transformada en una señal eléctrica que es analizada por un ordenador y convertida en imágenes tridimensionales del órgano blanco (figura 1).

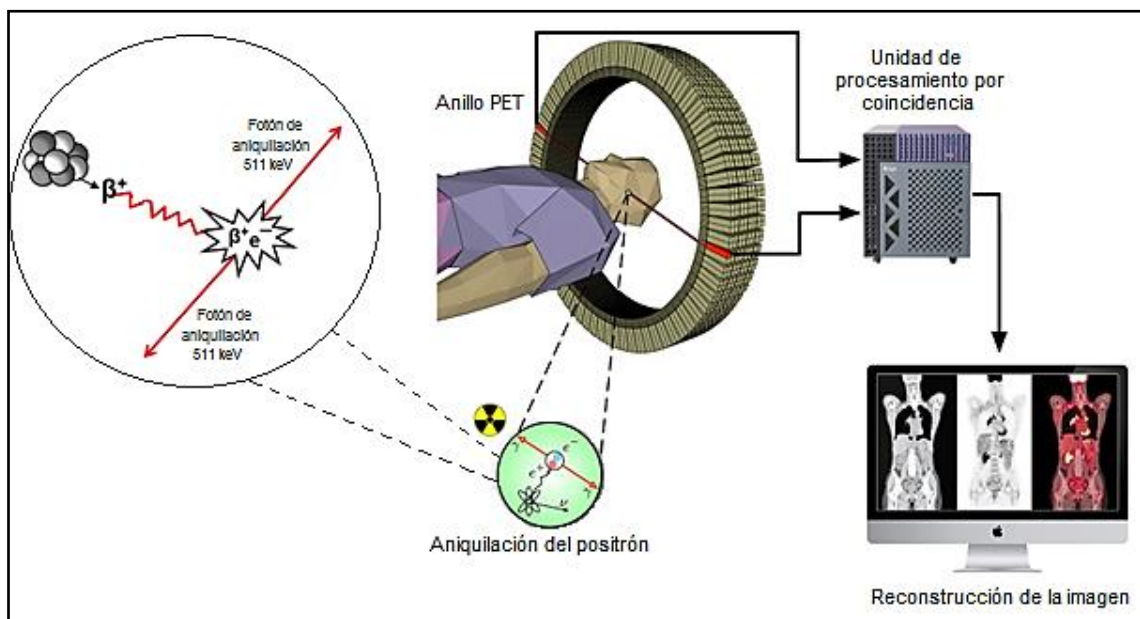


Figura 1- Esquema representativo del proceso de aniquilación del positrón y la adquisición de imágenes PET.

1.3) Producción de radiofármacos PET

Un radiotrazador es una sustancia radiactiva que puede introducirse en un sistema biológico, en cantidades traza, con el fin de medir propiedades del sistema y proporcionar información sobre el desarrollo de un proceso, sin perturbar dicho sistema. Un radiofármaco, es un radiotrazador que cumple con los requisitos para su administración a pacientes. Se administra a nivel de traza con fines diagnósticos o terapéuticos y no produce efectos farmacológicos, sino que es la energía emitida en el decaimiento radiactivo (radiación) la responsable de su función.

Para llegar a obtener un radiofármaco elaborado con criterios GMP para diagnóstico mediante PET, es necesario contar con la infraestructura apropiada, desde su etapa de producción y control de calidad, hasta su destino final que es la inyección al paciente. En Uruguay se cuenta con esta tecnología desde 2010, año en que se inauguró el CUDIM (Centro Uruguayo de Imagenología Molecular), que atiende a pacientes provenientes del sistema de salud tanto público como privado.

CUDIM cuenta con un ciclotrón que permite producir radionucleidos a partir de partículas aceleradas y distintos blancos de irradiación seleccionados adecuadamente. De esta manera se logra producir una gran variedad de radionucleidos, tales como ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N y ^{15}O , que luego serán destinados a la preparación de los radiofármacos. En el caso de radiofármacos de ^{18}F , ^{11}C y ^{13}N , se emplean módulos de síntesis automáticos o semi-automáticos, que se encuentran dentro de celdas blindadas de manipulación de material radiactivo (“hot cells”).

Además de los radionucleidos producidos en el ciclotrón, CUDIM dispone de ^{68}Ga , obtenido a partir del sistema generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, ubicado dentro de un módulo de síntesis semi-automático y en un flujo laminar blindado. En la tabla 1 se resumen las principales características de los radionucleidos PET utilizados en CUDIM.

Tabla 1- Resumen de radionucleidos PET utilizados en CUDIM

Radionucleido	T_{1/2}	Producción
^{11}C	20.3 min	Ciclotrón
^{18}F	110 min	Ciclotrón
^{13}N	10 min	Ciclotrón
^{15}O	122 seg	Ciclotrón
^{68}Ga	67.7 min	Generador

Las hot cells se encuentran ubicadas dentro del área de producción de radiofármacos. Ésta es un área clasificada, que asegura la calidad de aire adecuado para la preparación de soluciones inyectables, cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura (GMP) [8], y controlada desde el punto de vista de protección radiológica.

Los módulos de síntesis permiten la automatización de los procesos productivos, reduciendo los tiempos de síntesis, aspecto que resulta primordial debido al corto período de semidesintegración de los radionucleidos PET (del orden de minutos a pocas horas). Están diseñados de forma de asegurar la protección radiológica del operador y del medio ambiente, principio básico y general que rige la aplicación de tecnología PET y el manejo de radiaciones ionizantes. [9]

Luego de producido el radiofármaco, se toma una muestra representativa (bajo flujo laminar blindado) y se envía al laboratorio de control de calidad para que se realicen los controles fisicoquímicos y microbiológicos pertinentes. En muchos casos, dichos controles están descritos en las Farmacopeas oficiales USP y EP [10-11]. De no ser así, son establecidos por el Centro, en concordancia con las especificaciones para radiotrazadores similares, obtenidas de referencias bibliográficas específicas de cada radiofármaco. Una vez realizados dichos controles y verificado el cumplimiento de las especificaciones, el lote es liberado para su uso en pacientes. El radiofármaco pasa al área clínica, donde se realiza la dispensación de cada dosis y la inyección de los pacientes. Se espera un determinado tiempo de biodistribución y se procede a la adquisición de imágenes PET/CT. En la figura 2 se esquematiza el proceso general de producción de un radiofármaco de uso clínico, desde la producción del radionucleido hasta la adquisición de imágenes en el paciente.

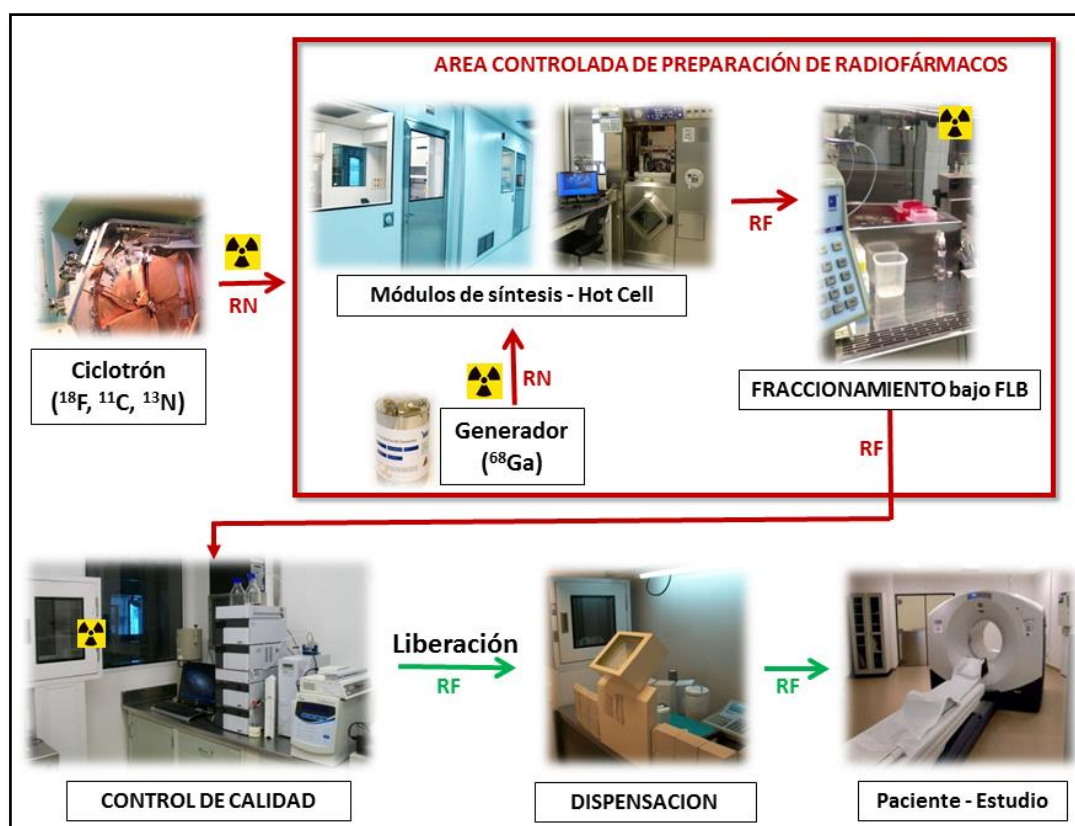


Figura 2- Esquema de producción de un radiofármaco PET de uso clínico en CUDIM (RN: radionucleido, RF: radiofármaco).

1.4) Aplicaciones del ^{68}Ga en Radiofarmacia

El ^{68}Ga es uno de los emisores de positrones metálicos más importantes en Medicina Nuclear. Presenta un período de semidesintegración ($T_{1/2}$) de 68 minutos con $E_{\text{máx}} = 1899 \text{ keV}$ (energía máxima) y decae a ^{68}Zn (estable). Además de los dos fotones de 511 keV resultantes del proceso de aniquilación del positrón, también posee una emisión gamma de 1077 keV de baja abundancia (3.22%). Se obtiene a partir de un sistema generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ bajo la forma química de $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$, por lo cual no es necesario contar con un ciclotrón en las instalaciones. El sistema generador contiene al radionucleido padre ^{68}Ge , que presenta un $T_{1/2} = 271$ días (relativamente largo), adsorbido en una columna cromatográfica. Este decae mediante captura electrónica a ^{68}Ga , su radionucleido hijo (figura 3).

El ^{68}Ga puede ser eluído de la columna del generador con un solvente adecuado, por tener distintas propiedades físico-químicas que el ^{68}Ge . El generador puede ser eluído repetidamente durante el día, pudiendo disponer del 94 % de la actividad máxima posible de ^{68}Ga cada cuatro horas. Esto permite realizar varias síntesis de radiofármacos

de ^{68}Ga a lo largo del día. La vida útil de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, dependiendo de la marca y actividad inicial del mismo, puede ser de 6 meses a 1 año para producción de radiofármacos y hasta 2 años para investigación, de lo cual resulta una buena relación costo-beneficio. Desde el punto de vista de la seguridad microbiológica, estos sistemas utilizan ácido clorhídrico de diferentes concentraciones como eluyente, por ejemplo, HCl 0.1 M o HCl 0.05 M, que generan un entorno altamente desfavorable para el crecimiento microbiano, lo cual ha sido demostrado por Petrik et al. [12]

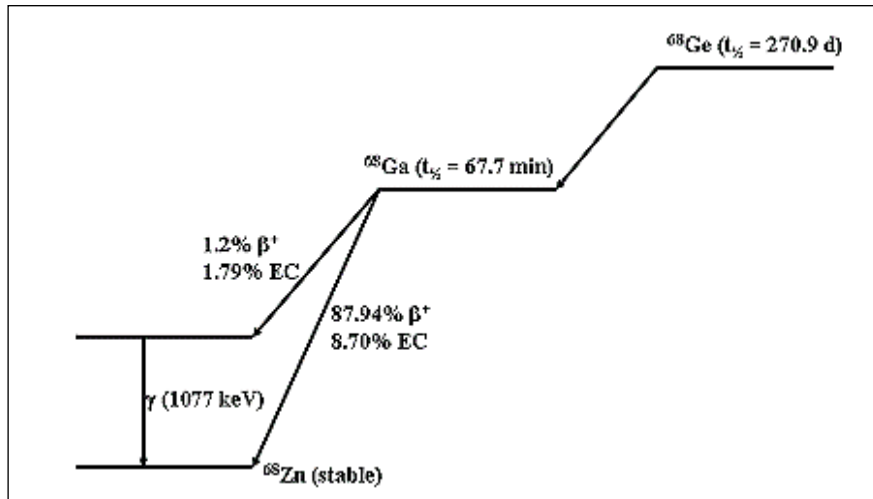


Figura 3- Esquema de decaimiento radiactivo del ^{68}Ga (modificado de [106]).

El contenido de ^{68}Ge en el eluido final es uno de los parámetros críticos a evaluar, ya que por sus características de emisión y su $T_{1/2}$ elevado, su concentración en el radiofármaco no puede superar el 0.001% según EP. [11] Este valor surge de considerar la hipótesis de que todo el ^{68}Ge (IV) administrado al paciente se deposita en la médula ósea, con una retención infinita.

El germanio no es farmacológicamente activo, e *in vivo* actúa como un material extraño no tóxico que se elimina fácilmente y, por lo tanto, como producto químico presenta un riesgo bajo para el hombre. Con respecto al ^{68}Ge (IV) radiactivo, dado que la masa del elemento es insignificante, el problema de seguridad se reduce a la radiación ionizante y, en particular a la acumulación de ^{68}Ga (III) en los sitios de captación del ^{68}Ge (IV). Sin embargo, el estudio dosimétrico de ^{68}Ge (IV) en ratas, demostró una excreción rápida y acumulación despreciable en los órganos. [13] Con dichos resultados, se propuso que un aumento de 100 veces del valor límite establecido por la Farmacopea, resultaría seguro para el paciente desde el punto de vista dosimétrico.

El uso y la optimización de estos sistemas generadores han sido extensamente estudiados en los últimos años. En el mercado se ofrecen varios tipos de generadores,

uno de ellos presenta matriz inorgánica de TiO_2 (EZAG) y asegura que la co-elución de ^{68}Ge es del orden de $10^{-4}\%$ (lo cual lo hace apto para inyección según el límite EP). Por otra parte, el generador de matriz orgánica (ITG) requiere una purificación del eluido previo a la marcación o bien, la purificación final del radiofármaco, ya que el eluido no cumple con dicha especificación. Existen otros generadores que se deben eluir con concentraciones mayores de HCl, lo cual dificulta su posterior procesamiento.

El estado de oxidación más estable del ^{68}Ga en solución acuosa es el +3, presentándose bajo la forma de catión libre hidratado sólo bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 3$). A pH entre 3 y 7, si se encuentra en concentraciones por encima de la nanomolar, se produce la precipitación del coloide $[\text{Ga}]\text{Ga}(\text{OH})_3$ por hidrólisis. Finalmente, a $\text{pH} > 7$ el ^{68}Ga se redisuelve bajo la forma de $[[\text{Ga}]\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ y a pH fisiológico, el reparto entre la fracción soluble e insoluble es de 49:1, por lo que se puede obtener una concentración máxima del anión de $2,5\ \mu\text{M}$ sin superar la solubilidad del hidróxido de galio y por tanto, sin que precipite como coloide (Figura 4).

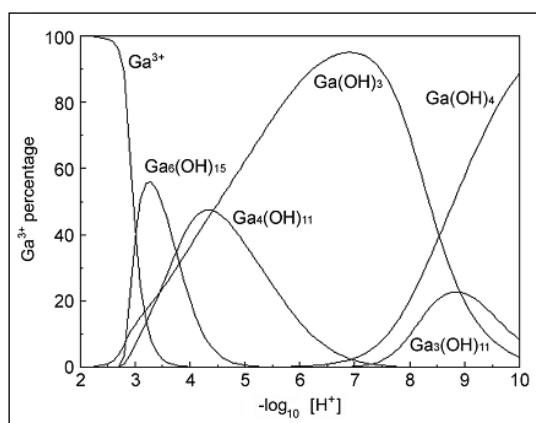


Figura 4- Especies de Ga^{3+} en solución acuosa en función del pH , extraído de [107]

Cabe destacar que existen otras impurezas en el eluido, que deben ser controladas y tenidas en cuenta al momento de seleccionar un generador y diseñar el procedimiento de marcación. Debido a que la química de coordinación del $[\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ es muy similar a la del Fe^{3+} (carga, radio iónico, número de coordinación y configuración electrónica), se debe evitar la presencia de metales en las etapas previas a la marcación y durante la misma. Esto tiene como finalidad reducir al mínimo la presencia de impurezas metálicas que puedan competir con el $[\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ y asegurar así la calidad del producto marcado. Para lograr esto se requiere una elevada pureza de los reactivos, así como el uso de materiales plásticos (evitando metales), en toda etapa previa a la marcación.

Las reacciones de coordinación de ^{68}Ga requieren un ajuste de pH preciso por dos razones fundamentales. En primer lugar, se requiere el pH correcto para la desprotonación de los átomos dadores de electrones, y por otro lado, es necesario mantener al $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ en solución, dado que, de lo contrario, podría formar $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{OH})_3$ y precipitar a valores de pH entre 3 y 7. El pH de marcación debe ajustarse para cada ligando en particular, pudiendo además optar por el uso del buffer que se considere más adecuado. El acetato de sodio, que forma una solución amortiguadora con el HCl proveniente del eluido del generador, tiene la ventaja de ser apto para uso farmacéutico, por lo cual es normalmente elegido para ajustar el pH en las marcaciones con ^{68}Ga . [14]

El ^{68}Ga es capaz de formar complejos estables con distintos quelantes, utilizando 4, 5 o sus 6 posiciones de coordinación. La conformación más estable resulta de los complejos formados con ligandos hexadentados, que posean átomos donores como el oxígeno, nitrógeno y/o azufre.

El rol de un agente bifuncional en un radiotrazador es, por un lado, unirse a la biomolécula, y por otro lado, debe ser capaz de formar un complejo estable con el radionucleido de interés. En radiofarmacia, el agente quelante bifuncional DOTA (figura 5) ha sido muy utilizado para formar complejos con ^{68}Ga , ^{90}Y y ^{177}Lu , entre otros. Este ligando macrocíclico muestra una elevada selectividad hacia los iones metálicos, desde el punto de vista conformacional y de su tamaño. La estabilidad del complejo $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA se debe a que el catión se aloja en el centro de la cavidad del quelante, quedando aislado de las especies competitivas, por ejemplo la transferrina plasmática. En comparación, el agente quelante bifuncional NOTA, forma un complejo con ^{68}Ga que resulta aún más estable que el $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA, debido a que su cavidad es más pequeña (figura 5). Esto además permite que la incorporación del ^{68}Ga sea más rápida y se produzca a menores temperaturas. Ambos quelantes han sido utilizados con éxito para la síntesis de radiofármacos de ^{68}Ga . [15]

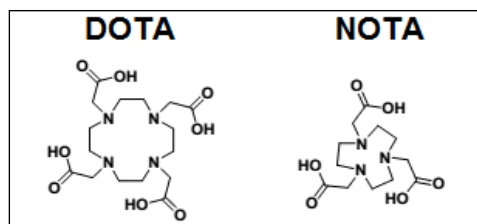


Figura 5- Estructura química de los dos agentes quelantes bifuncionales más utilizados para las marcaciones con ^{68}Ga .

1.5) Radiofármacos PET para diagnóstico de CaP

Actualmente se están investigando varios radiotrazadores prometedores para el diagnóstico del CaP mediante imagenología PET, además de los que se han utilizado tradicionalmente. (Tabla 2)

Tabla 2- Resumen de radiotrazadores PET utilizados para el diagnóstico de CaP

Radionucleido	Radiotrazador	Nombre	Referencias bibliográficas
¹⁸ F	[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]fluorodesoxiglucosa	[16-17]
	[¹⁸ F]NaF	[¹⁸ F]fluoruro de sodio	[18]
	[¹⁸ F]fluorcolina	[¹⁸ F]fluorcolina	[19]
	[¹⁸ F]FACBC	Ácido <i>anti</i> -1-amino-3-[¹⁸ F]-fluorociclobutano-1-carboxílico	[20]
	[¹⁸ F]FDHT	16-β-[¹⁸ F]-fluoro-5α-dihidrotestosterona	[21]
¹¹ C	[¹¹ C]colina	[¹¹ C]colina	[22-24]
	[¹¹ C]acetato	[¹¹ C]acetato	[25-27]
	[¹¹ C]SAM	[¹¹ C] <i>S</i> -adenosil-metionina	[28-29]
⁶⁸ Ga	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TATE	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TATE	[30]

La [¹⁸F]FDG es el radiotrazador inicialmente estudiado en el CaP. Dada la correlación entre su captación y el nivel de PSA, ha sido utilizada como marcador de metabolismo y agresividad tumoral. Los tumores presentan un metabolismo elevado de la glucosa, en comparación con el tejido normal. La glucosa marcada con ¹⁸F ingresa a las células y se fosforila, por lo cual no puede ser liberada al medio. No puede ser metabolizada por glucólisis antes de que decaiga su actividad. [17] Este mecanismo resulta inespecífico, ya que las afecciones benignas también pueden mostrar una alta localización de [¹⁸F]FDG. En consecuencia, en el caso de CaP metastásico con niveles de PSA normales no resulta efectiva. [16] Además, hay otros órganos captantes en la cercanía de la próstata, por lo que la resolución no es buena. Sin embargo, podría ser de utilidad para aquellos tumores agresivos que se diferencien rápidamente.

El [¹⁸F]NaF se puede utilizar para la detección de metástasis óseas, ya que el fluoruro se incorpora al hueso y forma fluoroapatita, proceso que se encuentra aumentado en el caso de las metástasis óseas. Este radiotrazador también es poco específico, ya que la captación de fluoruro por parte del hueso también se da normalmente durante el crecimiento óseo y en casos de inflamación o traumatismo. [18]

Por otra parte, las células de CaP presentan más bien metabolismo de ácidos

grasos, que de glucólisis, con sobre-expresión y aumento de la actividad de las enzimas lipogénicas. Los radiotrazadores [^{11}C]colina, [^{18}F]fluorcolina y [^{11}C]acetato, se han asociado con la sobreexpresión de este tipo de enzimas en el CaP. Los derivados de colina se internalizan a través de transportadores de colina y se fosforilan intracelularmente por la acción de la enzima colin-quinasa. Por otra parte, el acetato atraviesa la membrana celular a través del transportador de monocarboxilato y participa en la síntesis de novo de ácidos grasos de acetyl-CoA y malonil-CoA, mediante la acción de la enzima sintasa de ácidos grasos. [31] Ambos derivados de colina presentan rápida captación tumoral, pero tienen diferencias en cuanto a la excreción urinaria, que es mucho menor en el caso de la [^{11}C]colina. Se ha reportado que en la detección del CaP primario, el valor diagnóstico del PET con [^{11}C]colina es limitado, debido a la superposición significativa con la captación observada en la prostatitis o la hipertrofia prostática benigna. Además, no se ha encontrado correlación entre la captación de colina radiomarcada y el grado histológico tumoral, el avance de la enfermedad o el nivel de PSA. [22] Si se compara con la RMI, la [^{11}C]colina demostró tener menos sensibilidad en la localización del CaP primario. [23] Sin embargo, la [^{18}F]fluorcolina presentó mejor performance en la detección de este tipo de CaP, siendo capaz de localizar áreas dominantes de malignidad, pero no las lesiones pequeñas. [19] Por otra parte, para la estadificación y detección de metástasis, los estudios muestran que la [^{11}C]colina presenta valores de sensibilidad y especificidad relativamente altos (80 % y 96 % respectivamente) en la detección de metástasis ganglionares. [24]

Aunque se ha estudiado menos ampliamente que los radiotrazadores PET derivados de colina, el [^{11}C]acetato presenta similar sensibilidad y especificidad en la detección de CaP recurrente. [25,27] Una revisión de varios estudios para la detección de metástasis locales, ganglionares y óseas en el CaP recurrente, concluyó que no hay diferencias contundentes entre ambos radiotrazadores. [26]

El [^{18}F]FACBC (Fluciclovine, Axumin, o ácido *anti*-1-amino-3- ^{18}F fluorociclobutano-1-carboxílico) es un aminoácido sintético análogo de *L*-leucina, que se cree es captado en el CaP a través del transportador de aminoácidos ASCT2, que es dependiente de sodio. Un estudio en 50 pacientes que comparó [^{18}F]FACBC con el [^{111}In]-Capromab Pendetide (ProstaScintTM) en la detección de CaP recurrente encontró que [^{18}F]FACBC es más sensible para la detección de sitios de la enfermedad intraprostáticos y extraprostáticos. [20] Este radiotrazador fue aprobado por la FDA en mayo de 2016, para estudios PET en pacientes con sospecha de recurrencia del CaP.

La [¹⁸F]FDHT (16-β-[¹⁸F]-fluoro-5α-dihidrotestosterona) es un análogo de la dihidrotestosterona, ligando endógeno del receptor de andrógenos, y se ha estudiado al igual que otros tantos radiotrazadores novedosos. En una evaluación inicial realizada en 7 pacientes, que comparó la utilidad de [¹⁸F]FDHT y [¹⁸F]FDG en la detección de CaP, se observó que el estudio con [¹⁸F]FDG identificó mayor cantidad de lesiones, si bien al momento de cuantificar su captación, no hubieron diferencias en los valores. [21]

Por otra parte, investigaciones realizadas en el CUDIM han reportado el uso de [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE en el diagnóstico del CaP recurrente, basándose en la sobre-expresión de receptores SSTR2 en las células neuroendócrinas prostáticas. [30] Este radiotrazador presenta bajo nivel de captación y baja sensibilidad a valores bajos de PSA, además de presentar falsos positivos por inflamación o infección.

Otra de las líneas de investigación que se desarrolla en el CUDIM, tiene como blanco molecular la GNMT (Glicina *N*-metiltransferasa), una enzima que se encuentra sobre-expresada en el CaP. En consecuencia, la identificación de ligandos de la GNMT para su posterior marcación con radionucleidos PET, constituye una nueva herramienta para el diagnóstico de esta patología por imagenología molecular. En tal sentido, se ha sintetizado el radiotrazador [¹¹C]SAM (*S*-adenosil metionina), que ha sido evaluado *in vitro* [28] e *in vivo*. Los estudios comparativos PET/CT con [¹¹C]colina, mostraron una captación tumoral *in vivo* de [¹¹C]SAM significativamente mayor que la obtenida para [¹¹C]colina en animales de experimentación. A su vez, se realizaron los estudios dosimétricos y se está desarrollando un estudio clínico piloto en pacientes a fin de evaluar la potencial utilidad de [¹¹C]SAM en el diagnóstico de CaP. [29]

De todos los radionucleidos PET anteriormente nombrados, el radiofármaco de referencia inicialmente utilizado en Uruguay para diagnóstico de CaP fue la [¹¹C]colina. Se ha descrito que dicho radiofármaco es útil en la visualización mediante PET de varios tipos de tumores, con una elevada señal tumor/fondo, incluso en aquellos de crecimiento lento y/o bien diferenciados, como es el caso del CaP. Sin embargo, este radiotrazador no posee las características óptimas en cuanto a sensibilidad y especificidad, y más aún si el nivel de PSA es bajo. [32] Se requieren radiotrazadores con mayor sensibilidad para pacientes en recaída bioquímica y niveles de PSA menores a 4 ng/mL, lo cual representa una constante búsqueda de moléculas sensibles para el diagnóstico de CaP y la monitorización de la terapia.

1.6) PSMA como blanco molecular de CaP

La primer evidencia de la expresión del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) en la próstata fue aportada por Horoszewicz en 1987 [33], utilizando el anticuerpo monoclonal 7E11-C5, obtenido por inmunización de ratones con células tumorales LNCaP. Esta línea celular ha sido extensamente estudiada y utilizada como modelo tumoral de CaP, dado que proviene de un nodo linfático metastásico de un paciente con CaP hormono-refractario. Por dicho motivo, las células LNCaP expresan marcadores característicos de las células epiteliales de la próstata: PSA, PAP (fosfatasa ácida prostática) y receptor de andrógenos funcional.

Desde su descubrimiento, se ha visto que la expresión de PSMA se ve aumentada con el avance del CaP, desde la hiperplasia prostática benigna, a la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, hasta el adenocarcinoma prostático. [34] Se ha encontrado correlación entre la expresión elevada de PSMA y el aumento del grado de la enfermedad, lo cual implicaría que el PSMA desempeña un papel importante en la progresión del CaP. [4, 35-36] Estos datos apoyan los usos clínicos del PSMA como blanco molecular en pacientes con CaP. Hasta ahora, las principales aplicaciones clínicas han estado en los dominios del diagnóstico por imagen y de la terapéutica.

En el tejido prostático benigno, el PSMA tiende a estar dentro del citoplasma y localizarse en el lado apical del epitelio que rodea los conductos y, por lo tanto, no se encuentra disponible para la unión. [37] El PSMA citoplasmático es una forma truncada del antígeno que se conoce como PSM' y no tiene actividad folato-hidrolasa ni NAALADasa, por lo tanto, no es un blanco accesible para radiotrazadores. [38] Si bien el papel fisiológico del PSMA en la próstata sigue sin estar claro, la transformación neoplásica de las células prostáticas, da como resultado su translocación desde la superficie apical a la luminal del conducto prostático, donde se vuelve accesible en el exterior de la célula para unirse a los ligandos. Esta translocación del PSMA deriva en su sobreexpresión en el CaP, que puede alcanzar a ser de 100 a 1000 veces más en el 95% de las células de CaP. [39]

En 1993, el grupo de Ron Israeli, realizó modificaciones al anticuerpo 7E11-C5, obteniendo el CYT-356, que se utilizó para clonar el ADNc del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) por primera vez. [40] Desde entonces, se ha demostrado que el PSMA es idéntico a otras dos enzimas, por lo cual se la ha denominado también como: glutamato carboxipeptidasa II (GCP II), folato hidrolasa I,

N-acetil-L-aspartil-L-glutamato peptidasa I (NAALADasa I) o NAAG peptidasa. En todos los casos, se trata de una metaloenzima dependiente de Zn, con un peso molecular de 90-100 kDa.

El PSMA humano es una proteína que contiene 750 aminoácidos y tiene una estructura conformada por 3 dominios; un dominio N-terminal intracelular (AA 1-18), un dominio transmembrana compuesto por una sola hélice (AA 19-43) y un gran dominio extracelular altamente glicosilado (AA 44-750). [41] El dominio N-terminal citoplasmático interactúa con varias proteínas que modulan la endocitosis del PSMA a través de diferentes rutas. [42-43]

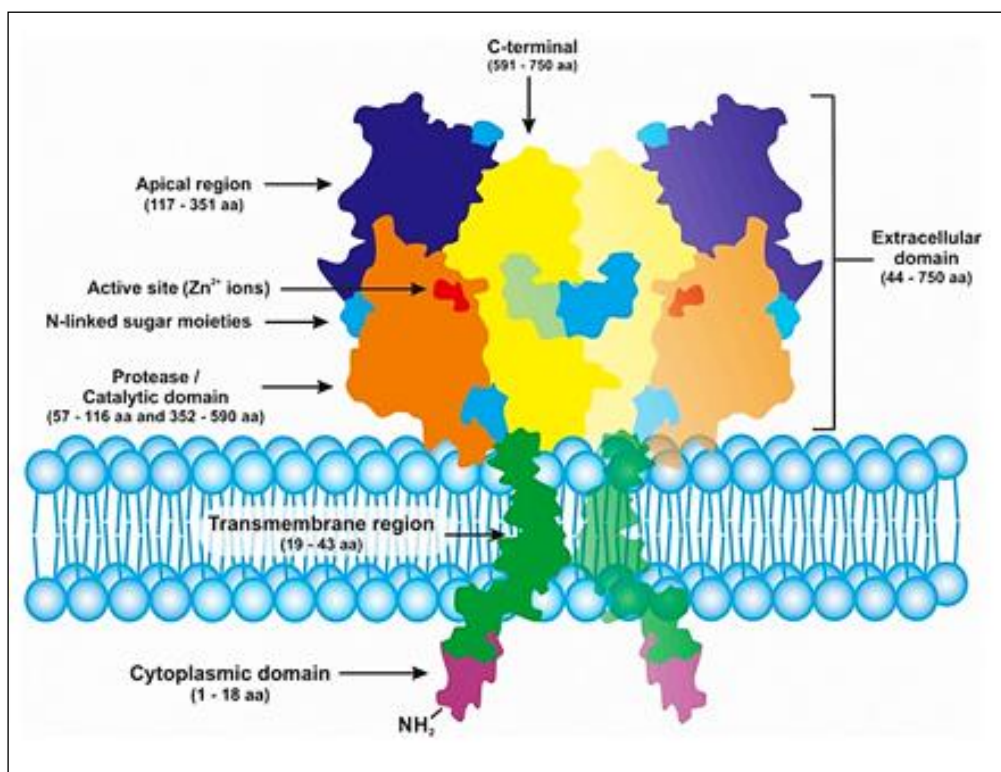


Figura 6- Representación esquemática del PSMA (homodímero). Fuente: [109]

Como se observa en la figura 6, la mayor parte de la proteína está orientada al medio extracelular, donde puede actuar sobre sus sustratos naturales. Este dominio extracelular se homodimeriza al igual que muchos otros receptores transmembrana. En este caso, la formación del homodímero es inducida por la unión del ligando, y se cree que el homodímero es necesario para mediar en la respuesta celular del receptor [44], aunque el sitio activo en cada subunidad es estructuralmente independiente. [45] Este dominio extracelular también está fuertemente *N*- y *O*-glicosilado (los glucanos pueden

representar hasta el 25% del peso molecular total de la proteína) y la *N*-glicosilación es indispensable para la actividad enzimática y la estabilidad del PSMA. [46]

1.7) Expresión fisiológica de PSMA en sitios no prostáticos

El PSMA no es específico de la próstata, ya que se encuentran receptores en glándulas lagrimales y salivales, túbulos renales proximales, intestino delgado, hígado y bazo. También se expresa en la neovasculatura asociada a tumores sólidos, mientras que no está presente en la vasculatura normal. Además, se ha descrito en otros tipos de tumores, como glioblastoma, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, de mama, renal y colorrectal. [47-50] A pesar de su presencia en tejidos normales, el hecho de que el PSMA se ha relacionado con la angiogénesis en tumores agresivos, implicaría un rol de esta enzima en la progresión del cáncer. [51]

La actividad folato hidrolasa del PSMA y la ubicación intestinal de esta enzima, son necesarias en la nutrición humana porque los humanos requieren ácido fólico, y el folato en los alimentos se presenta como poli- γ -glutamato. Los folatos poli-glutamados no pueden ingresar al interior celular por los sistemas de transporte de folato. Para ser absorbidos se requiere que la folato hidrolasa de membrana (PSMA) elimine secuencialmente los glutamatos C-terminales, hasta llegar a obtener el folato monoglutamato, que puede ser absorbido en el intestino. [38]

Por otra parte, el PSMA se encuentra en los astrocitos y células de Schwann, cumpliendo funciones como enzima responsable de la hidrólisis del N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG), el neurotransmisor peptídico más abundante en el sistema nervioso de los mamíferos. El NAAG se une extracelularmente al PSMA y como resultado de la hidrólisis, se obtienen N-acetil-aspartato y glutamato. Los estudios de la estructura enzimática han demostrado la existencia de un túnel profundo, de 20 Å de longitud, que conecta la superficie extracelular de la enzima con su sitio activo, denominado bolsillo de unión a NAAG. [53] Dicho bolsillo es también el sitio de unión de varios de los ligandos inhibidores de PSMA desarrollados recientemente. En la figura 7 se esquematizan estas dos funcionalidades del PSMA.

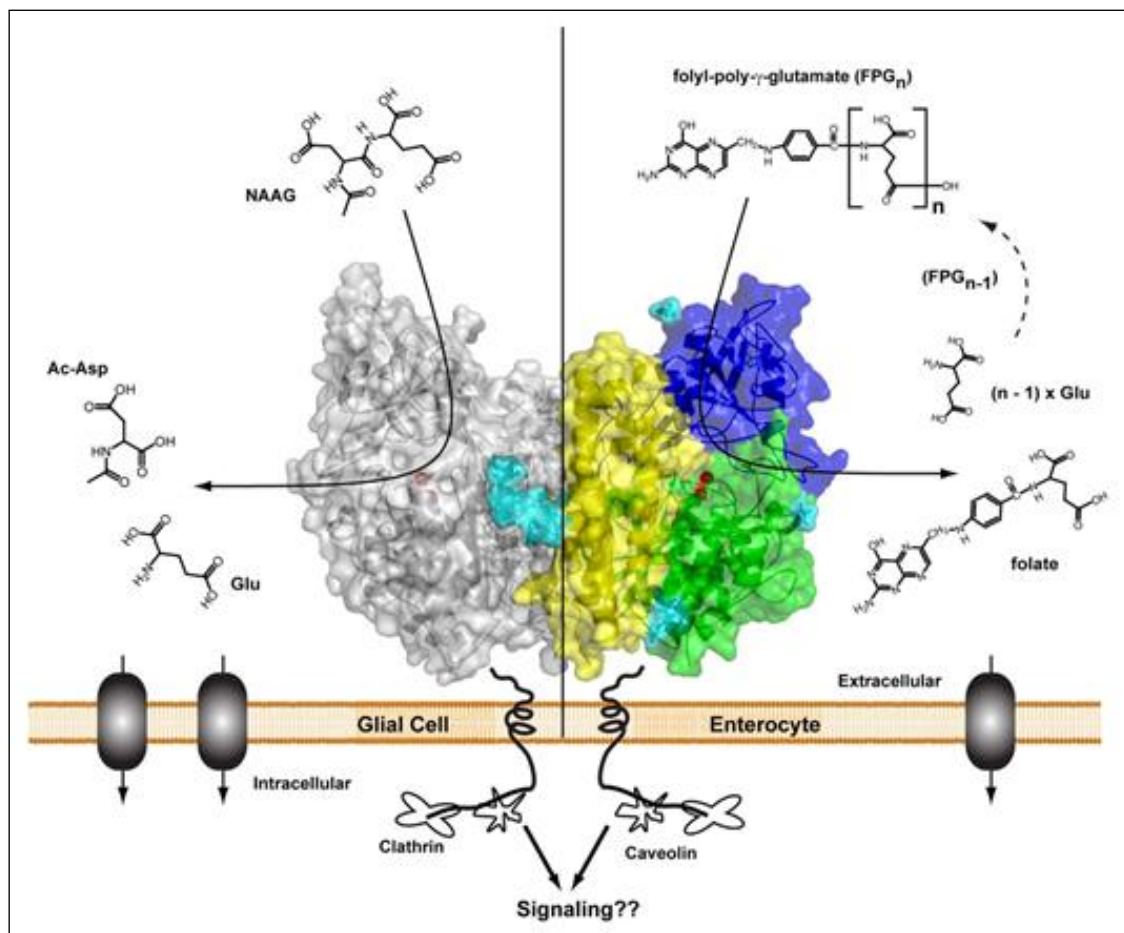


Figura 7- Esquemización de las funciones enzimáticas del PSMA. Fuente: [51]

1.8) Desarrollo de radiotrazadores dirigidos al PSMA

1.8.1) Estructura del sitio activo del PSMA

Se han desarrollado numerosos radiotrazadores específicos para imagenología, que tienen como blanco molecular el PSMA. Incluso se han diseñado radiotrazadores para terapia, ya que el complejo PSMA-ligando se internaliza después de la unión, a través de un mecanismo específico de endocitosis mediada por receptor. Este hecho conduce a una retención en el interior celular, que es beneficiosa para la eficacia terapéutica y además mejora la calidad de la imagen. [42-43]

Con la finalidad de orientar la búsqueda de nuevas moléculas que presenten afinidad por el PSMA, se ha estudiado extensamente la estructura de dicha enzima, haciendo énfasis en su cavidad interna, en la que se encuentra el sitio activo. En dicha cavidad, se pueden reconocer 4 sectores importantes, los cuales se detallan a continuación (figura 8) [53-54];

a) **bolsillo S1'**: también denominado bolsillo farmacofórico, es un sitio de reconocimiento de residuos glutamatos, que presenta una preferencia de unión muy fuerte hacia el extremo C-terminal de dichos residuos.

b) **bolsillo hidrofóbico accesorio S1**: es bastante específico para las cadenas laterales de glutamato y aspartato, ambos aminoácidos con carga negativa. Esta especificidad es conferida por el "parche de arginina", una disposición espacial de las argininas 534, 536 y 463 de las cadenas laterales. Dos de estos residuos arginina son algo flexibles, lo cual probablemente contribuye a una especificidad de sustrato menos rigurosa dentro del bolsillo S1 de la enzima (en comparación con el bolsillo S1'), aceptando una amplia variedad de grupos distales en los ligandos. [55] Además, en este bolsillo se reconoce una zona de interacción hidrófoba, definida por las cadenas laterales de 3 residuos tirosina (Tyr549, Tyr552 y Tyr700).

c) **sitio activo con 2 átomos de Zn (II)**: es indispensable para la actividad hidrolítica de la enzima y es uno de los elementos tenidos en cuenta para el diseño de inhibidores, ya que los inhibidores de PSMA de alta afinidad contienen un grupo de unión a zinc.

d) **un túnel irregular** que conecta al sitio activo con la superficie externa del PSMA. Si bien el bolsillo S1' es restringido en su forma y tamaño para lograr especificidad de unión a residuos glutamatos o muy similares, el túnel de acceso es bastante espacioso y permite acomodar una variedad de grupos funcionales, con distintos tamaños y propiedades físico-químicas.

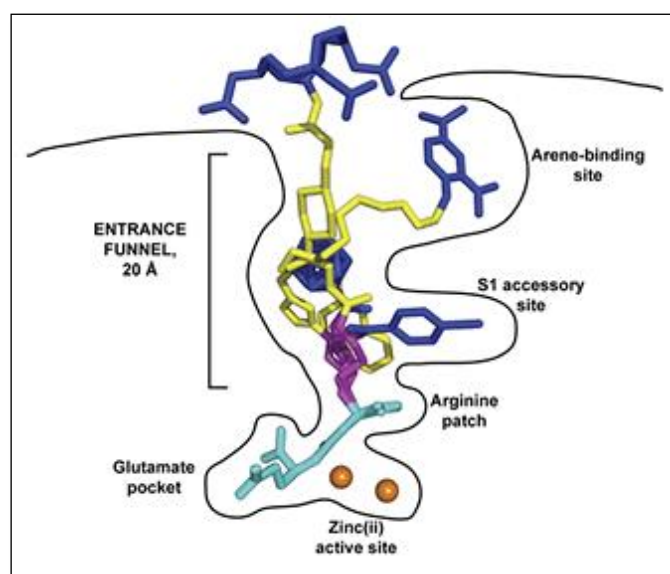


Figura 8- Representación esquemática del sitio activo del PSMA. Se muestra la disposición espacial de 4 inhibidores de PSMA basados en urea, superpuestos: DCIBzL, ARM-P4, carborano y PSMA-617. En celeste: farmacóforo (compartido por las 4 estructuras). En naranja: átomos de Zn (II). Fuente: [53]

1.8.2) Anticuerpos PSMA-específicos

Basándose en la estructura macromolecular del PSMA, se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos. Desde 1996 se ha utilizado el anticuerpo monoclonal murino conocido como ProstaScint™ (¹¹¹In-Capromab pendetide), que constituye el único agente para imagenología del CaP aprobado al momento por la FDA. Se trata del anticuerpo 7E11 desarrollado a partir de las células LNCaP, conjugado a DTPA, un agente quelante que permite su posterior radiomarcado con ¹¹¹In (SPECT). Si bien se postula que reconoce el dominio intracelular del PSMA, lo que implica que las células deben estar muertas o en proceso de muerte para que el anticuerpo se una a su epítipo, se reportó unión del anticuerpo a células tumorales viables. [56] Desafortunadamente, su valor en la detección de CaP ha sido cuestionado debido a su alta tasa de falsos positivos y el bajo contraste entre tejido tumoral y normal. [57]

Se han desarrollado otros anticuerpos con epítopos extracelulares, dirigidos al PSMA. De ellos, el más citado en bibliografía es el J591, que ha sido marcado con ¹¹¹In para diagnóstico de CaP mediante SPECT y con otros radionucleidos para uso terapéutico; como ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹³¹I, ²¹³Bi y ²²⁵Ac. [58]

Todos los anticuerpos comparten ciertas limitaciones en su aplicación diagnóstica como radiotrazadores. Debido a su naturaleza química macromolecular, los anticuerpos presentan lenta depuración sanguínea y eliminación. Además, necesitan un tiempo considerable para acumularse en el tumor, por lo que para obtener una buena calidad en las imágenes, se requiere su radiomarcado con isótopos de T_{1/2} relativamente largo, como el ¹¹¹In (T_{1/2} = 67 horas). Por esta razón, el uso de estos radiotrazadores resulta en una dosis de radiación relativamente alta para el paciente.

1.8.3) Inhibidores de PSMA de bajo peso molecular

Un sitio de unión en una enzima, que normalmente se uniría al sustrato natural, puede unirse alternativamente a otras moléculas que imiten la estructura de dicho sustrato. Estas moléculas se clasifican como inhibidores enzimáticos porque reducen la capacidad de la enzima para convertir el sustrato en moléculas de producto. La capacidad que presenta una molécula para inhibir una enzima, está dada por su valor de IC₅₀, que es la concentración del inhibidor requerido para reducir la actividad de la enzima en un 50%, determinado mediante estudios *in vitro*. [59] Los valores de IC₅₀ se

expresan en unidades de concentración (generalmente en nM) y cuanto menor es el valor, mayor es la capacidad del inhibidor para bloquear la reacción enzimática.

La actividad enzimática del PSMA fue estudiada para la síntesis y posterior evaluación de una gran variedad de inhibidores de bajo peso molecular. En una primera instancia, Jackson y colaboradores, determinaron en 1996, que el 2-PMPA (ácido 2-fosfonometilpentanodioico) es un potente inhibidor de PSMA. Esta molécula contiene un grupo fosfato terminal y exhibe un valor de IC_{50} de 0.3 nM, el valor más bajo que se ha informado para esta clase de compuestos, por lo que resulta ser un inhibidor muy potente de PSMA. [60] Dicha estructura se diseñó de forma que los dos grupos ácidos carboxílicos interaccionen con la zona de reconocimiento de glutamatos, mientras que el grupo fosfonato sea el que forme el complejo con los átomos de Zn del sitio activo del PSMA. [51] Posteriormente, se realizaron diversos estudios relacionando la estructura con la actividad enzimática (SAR), utilizando al 2-PMPA como estructura base, obteniendo así otros potentes inhibidores de PSMA con grupos fosfonatos (figura 9).

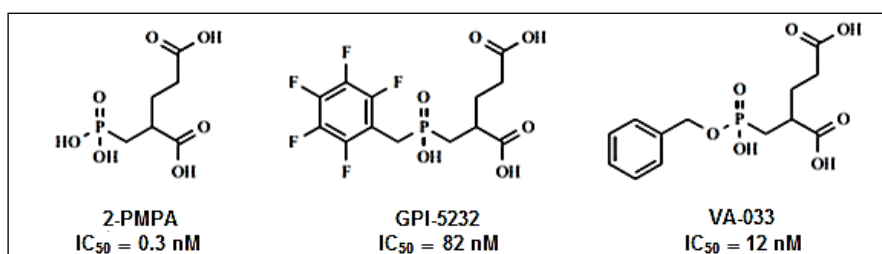


Figura 9- Inhibidores de PSMA de bajo peso molecular

1.8.4) Moléculas basadas en estructura tipo urea

Esta clase de inhibidores de PSMA basados en estructuras tipo urea, fue descrita por primera vez por Kozikowski, quien se basó en los trabajos previos reportados por Jackson desde 1996. [60-61] Partiendo de la estructura del NAAG, ligando natural del PSMA, y aplicando el diseño racional de fármacos, llegó a obtener estructuras que comprendían dos aminoácidos unidos mediante un enlace ureido entre sus dos grupos NH_2 (figura 10). Dichas moléculas fueron evaluadas *in vitro* y se demostró su poder como inhibidores de PSMA. [62-63] El grupo ureido de los inhibidores imita el enlace peptídico plano del sustrato natural del PSMA (NAAG), actuando como un bioisómero de amida, pero resistiendo a la hidrólisis por parte de la enzima. [64]

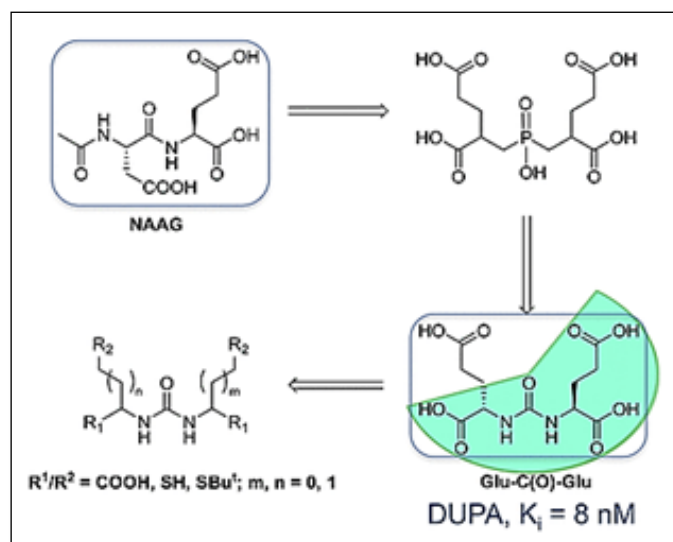


Figura 10- Ejemplo de diseño racional de fármacos inhibidores de PSMA, basados en estructura tipo urea. Fuente: [53]

Continuando con esta línea de diseño estructural, en 2002, Pomper reportó la síntesis del primer inhibidor de PSMA radiomarcado: [^{11}C]DCMC. En 2005, el grupo de Foss realizó uno de los primeros estudios preclínicos en tumores xenogénicos de CaP con dos ligandos inhibidores de PSMA: [^{11}C]DCMC y [^{125}I]DCIT (figura 11A), para imagenología PET y SPECT respectivamente. [65]

En el año 2008 se introdujeron en la clínica los primeros agentes inhibidores de PSMA basados en la estructura Glu-urea-Lys: [^{123}I]MIP-1072 y [^{123}I]MIP-1095 (figura 11B). [66-67]

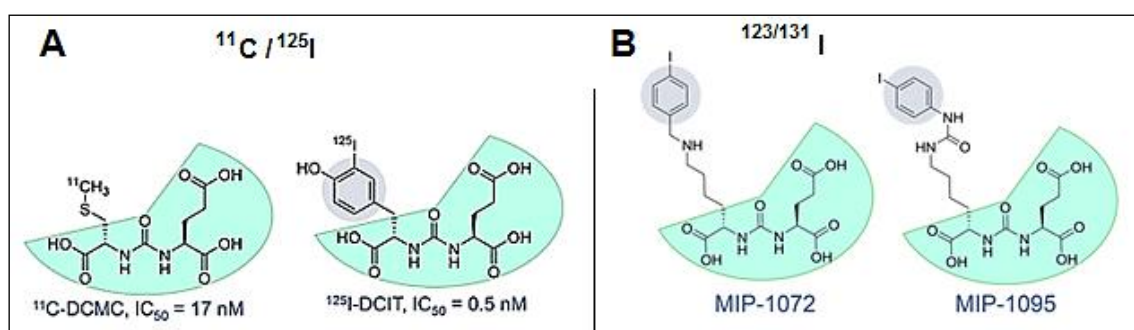


Figura 11- Estructuras de inhibidores de PSMA basados en urea. A) [^{11}C]DCMC y [^{125}I]DCIT. B) [$^{123/131}\text{I}$]MIP-1072 y [$^{123/131}\text{I}$]MIP-1095. Modificada de: [53]

Un trabajo publicado en 2009 por el grupo de Kularantne [57], comparó varias estructuras enlazantes entre el dominio de unión a PSMA llamado DUPA (ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)-ureido]pentanodioico), y un complejo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ formado por un agente quelante de cadena abierta (DaP-Asp-Cys). De tal comparación, resultó que la

lipofilia del enlazador se correlaciona significativamente con mejores propiedades de unión a PSMA. Además, las investigaciones de la estructura cristalina del PSMA realizadas por Barinka [64], indicaron que, además de las interacciones electrostáticas entre la urea y los grupos carboxílicos en el centro activo que contiene al Zn (II), existen interacciones lipofílicas debidas a la existencia de un bolsillo hidrófobo localizado al lado del sitio activo (bolsillo S1). El trabajo de Liu publicado en 2008 [68], también presenta al sitio activo de PSMA como un bolsillo con múltiples interacciones, reforzando la idea de un farmacóforo con varios requisitos. Se propuso una estructura base que debería contener: tres grupos carboxílicos capaces de interactuar con las cadenas laterales del PSMA, un oxígeno que interaccione con el Zn en el sitio activo, y una estructura aromática capaz de interactuar con una parte lipofílica del bolsillo S1 compuesto por tirosinas. Los datos sugieren que estas interacciones son aditivas en términos de eficiencia funcional y que solo los inhibidores que interactúan con todas las partes del sitio de unión, muestran una unión eficiente y una alta tasa de internalización. Las moléculas que carecen de una de estas interacciones muestran otros modos de acción y una unión más débil.

Estos resultados condujeron al desarrollo de un farmacóforo conteniendo dos restos aminoacídicos unidos mediante un enlace ureido: Lys-NH-CO-NH-Glu (Lys-urea-Glu), que ha sido utilizado en la síntesis de distintos radiotrazadores.

1.8.5) [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en el diagnóstico de CaP

En el año 2012, Eder conjuntamente con sus colaboradores del German Cancer Research Centre (Deutsches Krebsforschungszentrum) en Heidelberg, Alemania, sintetizaron el PSMA-HBED-CC (DKFZ-PSMA-11 o más comúnmente referido como PSMA-11). Para ello, realizaron el acoplamiento de la estructura farmacofórica Lys-urea-Glu, descrita anteriormente, a través de un espaciador (ácido 6-aminohexanoico o Ahx), con el quelante bifuncional HBED-CC (figura 12). [69] El HBED-CC es un agente quelante de cadena abierta, que presenta una rápida cinética de unión a ⁶⁸Ga y una alta estabilidad del complejo *in vitro* e *in vivo*. [70] Además, es capaz de interactuar con el bolsillo de unión hidrofóbico del receptor, debido a su cadena lateral lipofílica que contiene los dos anillos fenólicos. La flexibilidad del espaciador Ahx facilita la interacción con elementos estructuralmente definidos en el túnel de

entrada al sitio activo, como por ejemplo, el bolsillo hidrofóbico accesorio S1, contribuyendo así a la afinidad incrementada de dichos ligandos por PSMA. [53]

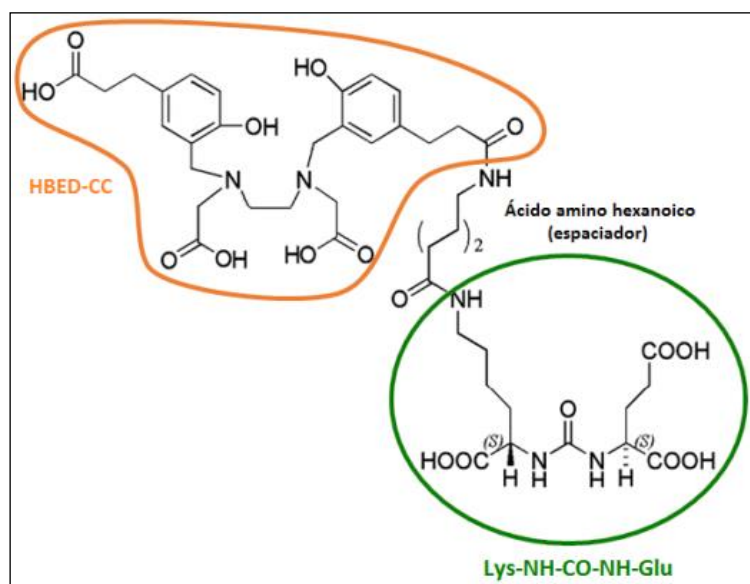


Figura 12- Estructura del [HBED-CC]-(Ahx)-Lys-NH-CO-NH-Glu, precursor para la marcación con ^{68}Ga .

En dicha publicación, también se reporta el marcado del PSMA-11 con ^{68}Ga y su evaluación inicial en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los resultados preliminares obtenidos a nivel preclínico, resultaron muy prometedores y alentaron la rápida introducción clínica de este agente imagenológico para el CaP en Alemania.

Se han reportado diversas comparaciones en pacientes, con los resultados obtenidos de los estudios realizados con $[^{18}\text{F}] / [^{11}\text{C}]$ colina y $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$. Como conclusión de dichos estudios, en pacientes con CaP en recaída bioquímica y con bajos niveles de PSA, el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ detectó más lesiones que la $[^{11}\text{C}]$ colina o $[^{18}\text{F}]$ fluorcolina, es decir presentó mayor sensibilidad. [71-74]

En CUDIM se realizó un estudio comparativo prospectivo para evaluar las tasas de detección de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ y $[^{11}\text{C}]$ colina, en pacientes con CaP y en recaída bioquímica. Además, se estudió el valor agregado del sistema trimodal PET / CT / MRI. Ambos estudios fueron concordantes en el hallazgo de la patología en el 50 % de los pacientes analizados. Un 25 % de dichos estudios, fueron positivos solamente en el caso del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, mientras que solamente el 3 % de ellos resultaron positivos con $[^{11}\text{C}]$ colina exclusivamente. Las relaciones tumor / fondo en todas las lesiones concordantes ($n = 96$), fueron mayores para $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ (110.3 ± 107.8) que para $[^{11}\text{C}]$ colina (27.5 ± 17.1). [72]

Otra ventaja que presenta el [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 frente a la [^{11}C]colina, es su mayor $T_{1/2}$, que permite realizar el estudio a un número mayor de pacientes. Basándose en este hecho y en la mejor performance clínica demostrada, en CUDIM se decidió comenzar con la producción de rutina de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 para los pacientes con CaP en recaída bioquímica. De esta manera, pasó a ser el [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, el nuevo radiofármaco de referencia en el Centro para este tipo de patología. Desde ese momento, se restringieron las aplicaciones clínicas de [^{11}C]colina para tumores no prostáticos, y se disminuyó significativamente el número de producciones de dicho radiofármaco. Por dichos motivos, en el presente trabajo no se realizará la comparación de los resultados obtenidos para [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 con [^{11}C]colina en el modelo biológico.

1.9) Objetivos

En esta tesis de Maestría se propone optimizar la síntesis y caracterización de nuevos radiotrazadores PET marcados con ^{68}Ga , inhibidores de PSMA, con alta especificidad para el diagnóstico de CaP. En tal sentido, el objetivo general es la obtención del radiotrazador [^{68}Ga]Ga-HBED-CC-(Ahx)-Lys-NH-CO-NH-Glu ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11, figura 12) y su evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Para lograr tal cometido, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la cinética de formación y degradación de la molécula marcada (radiotrazador) en función de parámetros tales como temperatura, pH, concentración de actividad y masa de precursor.
- Optimización de métodos de control de calidad de dicho radiotrazador, en especial cromatográficos como ITLC-SG y HPLC a fin de identificar, resolver y cuantificar las especies formadas y las potenciales impurezas.
- Estudiar la estabilidad del radiotrazador *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar estudios *in vitro* de unión a distintos cultivos celulares que expresen la estructura target, es decir, que sean positivas para PSMA, a través de los cuales se podrán determinar: unión específica, máxima capacidad de unión, concentración de inhibición 50% (IC_{50}) y porcentaje de internalización. Además, se utilizarán cultivos celulares no expresantes de PSMA como control negativo de los ensayos.
- Realizar la evaluación biológica y radiofarmacológica (*in vivo*) del radiotrazador. Para ello se efectuarán distribuciones biológicas a distintos tiempos post-inyección en ratones Nude, con tumores inducidos con células expresantes de PSMA (modelo animal de CaP), así como en controles sanos (ratones Swiss).
- Realizar estudios imagenológicos *in vivo* en los modelos animales de CaP, a través de la adquisición de imágenes estáticas y/o dinámicas en cámara PET/CT y su posterior análisis utilizando el software PMOD.
- Evaluar el efecto de la actividad específica del radiofármaco en el comportamiento *in vivo*, realizando estudios imagenológicos en el modelo animal de CaP para evaluar la captación tumoral.
- Evaluar el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de los diastereómeros de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11.

2. CAPÍTULO I: Purificación del eluido del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

2.1) Introducción

Durante el desarrollo de la presente tesis, debido a problemas técnicos con el generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (EZAG), comenzó a aumentar la presencia de impurezas metálicas en el eluido. Dicho incidente afectó negativamente las marcaciones de ^{68}Ga , debido a que dichas impurezas compiten con el ^{68}Ga en su capacidad de incorporarse a la molécula de interés, o bien pueden formar coloides y absorber al $^{68}\text{Ga(III)}$, como en el caso del Ti(IV) . [75] Esto conlleva a un notorio incremento de la masa de precursor requerida para las marcaciones (al aumentar la masa disponible de agente quelante, se logra aumentar el rendimiento de la marcación). Dicho aumento de masa, trae como consecuencia una disminución importante de la actividad específica (Aesp) del radiotrazador obtenido. Una Aesp menor puede implicar un deterioro en la calidad de las imágenes PET obtenidas, además del riesgo de no detectar posibles micro-metástasis en un paciente.

Generalmente, el contenido metálico del eluido del generador, puede ser reducido con una frecuencia de elución regular, así como mediante elución fraccionada o bien la purificación del eluido. Durante el período de tiempo en que no se contó con un eluido de ^{68}Ga con baja concentración de impurezas metálicas, se buscó optimizar métodos de purificación del eluido publicados (previo a la marcación), con el fin de minimizar dichas impurezas que compiten con el ^{68}Ga . Es así que se probaron distintos métodos de purificación, transformando el $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ en especies aniónicas o catiónicas y purificando las mismas por cromatografía de intercambio iónico.

2.1.1) Purificación mediante intercambio catiónico

Estos métodos de intercambio catiónico, se basan en la formación del catión $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ y su separación de las especies aniónicas presentes o de los cationes de menor fuerza o carga. Se hace pasar el $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ eluido del generador, a través de una columna que intercambia cationes. Así, el ^{68}Ga queda adsorbido en la columna (como $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$), mientras que el resto de los metales se eluyen hacia el descarte (^{68}Ge (IV)), se eliminan con la solución de lavado (Zn (II) y Fe (III)), o bien quedan retenidos en su mayoría en la columna durante todo el proceso (Ti (IV)). El ^{68}Ga inicialmente retenido, se eluye con una mezcla acetona / HCl , ya que el incremento de

la concentración de acetona en dicha solución disminuye la afinidad del ^{68}Ga por la resina de intercambio catiónico orgánica. [76] Este método ha sido modificado para evitar el uso de la acetona, ya que puede inducir la formación de impurezas orgánicas y además, se trata de un solvente no apto para inyección en concentraciones por encima de 0.3 %, por lo que debe ser eliminado del producto final. En su lugar, se ha propuesto el uso de soluciones ácidas de NaCl [77-78] y etanol [79] como eluyentes, o bien, una segunda purificación para eliminar la acetona.

2.1.2) Purificación mediante intercambio aniónico

Las purificaciones basadas en el intercambio aniónico, consisten en el agregado de HCl_{cc} al $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ eluído del generador. El objetivo es alcanzar concentraciones de $\text{HCl} > 3\text{M}$, para obtener complejos fuertemente aniónicos: $[[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_6]^{3-}$ y $[[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_4]^-$, que son adsorbidos en una columna de intercambio aniónico. En el pasaje del eluido por la columna, el ^{68}Ge (impureza radionucleídica), no es adsorbido (se requieren concentraciones de $\text{HCl} > 6\text{M}$), por lo cual se lograría eliminar. [108] La elución del ^{68}Ga purificado se realiza con un pequeño volumen de agua ultrapura. Este tipo de metodología, si bien no presenta acetona en la solución purificada, implica el uso de soluciones fuertemente ácidas, lo cual no es muy práctico y requiere precauciones adicionales. Se utilizó este método para concentrar el eluído obtenido a partir del generador ITG, que ya estaba muy decaído y poco concentrado, además del contenido de impurezas metálicas aumentado respecto a lo normal.

2.2) Parte experimental

2.2.1) Materiales y equipos

Las purificaciones de los eluídos de generadores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, se realizaron con los generadores suministrados por ITG (ITG Isotope Technologies Garching GmbH, Alemania), y por Eckert & Ziegler (IGG100, EZAG, Eckert & Ziegler Isotop Production, Alemania). Las medidas de actividad se realizaron en un calibrador de dosis Capintec® CRC-25R. El ácido clorhídrico utilizado para la elución del generador y la preparación de soluciones fue de calidad Suprapur (MERCK). El etanol fue de grado HPLC (MERCK) y los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. Las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura filtrada por $0.22\ \mu\text{m}$ (de resistividad $18.2\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C), obtenida en el momento con un equipo MERCK

MILLIPORE Direct-Q™ 5. Se utilizó la columna de intercambio catiónico Strata™-X-C (33 µm, 60 mg, Phenomenex®), y cartuchos de intercambio aniónico CHROMAFIX® 30-PS-HCO₃⁻ (Macherey-Nagel). En las etapas de purificación se utilizaron jeringas con émbolo plástico (B. Braun). El ⁶⁸Ga purificado fue recolectado en todos los casos en microtubos tipo eppendorf de 1.5 mL, con tapa rosca, resistentes a las temperaturas de incubación. Para las marcaciones y el control de calidad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 se utilizaron los mismos reactivos y equipos detallados en el punto 3.2.1.

2.2.2) Métodos

2.2.2.1) Purificación mediante intercambio aniónico

Se realizó el acondicionamiento del cartucho con HCl 5.0 M, seguido de HCl 1.0 M, agua ultrapura y HCl 4.0 M (1 mL en todos los casos). Se eluyó el generador con 5 mL de HCl 0.05 M (ITG) o 4 mL de HCl 1.0 M (EZAG) en vial plástico. Con jeringa de émbolo plástico se cargó el [⁶⁸Ga]GaCl₃ y HCl_{cc} (3.3 - 4 mL, según el generador utilizado). Se homogeneizó el contenido de la jeringa y se hizo pasar lentamente por el cartucho de intercambio aniónico. Se lavó con 2 mL de HCl 4.0 M lentamente y se secó con 2 mL de aire. Por último, se eluyó el ⁶⁸Ga con dos fracciones de 0.3 mL de agua ultrapura, recogiénolas en el tubo tipo eppendorf que se usó luego para la marcación.

Para la obtención del radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, se adicionó una solución de NaOAc 2.5 M (145 – 190 µL) para ajustar pH = 4.0 (se tomó una alícuota de la solución y se midió el pH en el momento). Luego se incorporó el precursor PSMA-11 (2.6 – 10.6 nmoles) y se incubó durante 5 minutos a 100 °C. Se determinó la PRQ por HPLC e ITLC-SG.

2.2.2.2) Purificación mediante intercambio catiónico

La columna de intercambio catiónico utilizada fue pre-acondicionada con HCl 5.5 M (1 mL) y agua ultrapura (10 mL) [78], o HCl 4 M y luego agua ultrapura (1 mL) [76]. Se hizo pasar el [⁶⁸Ga]GaCl₃ eluido del generador EZAG por la columna, recogiendo el líquido en un vial de descartes, luego se lavó con 1 mL de solución de lavado (según tabla 3) y se pasó 1 mL de aire con jeringa. A continuación, se eluyó el ⁶⁸Ga con la mitad del volumen total de solución de elución (según tabla 3), se esperó 2 minutos y se eluyó con la otra mitad de volumen, seguidos por 2 mL de aire. Por último, se acondicionó la columna nuevamente para el próximo uso, de la misma manera que el

acondicionamiento inicial. El ^{68}Ga eluido se recogió directamente en el vial tipo eppendorf de plástico, que fue luego utilizado para la reacción de marcación. En todas las etapas de purificación se utilizaron jeringas de plástico (con émbolo también plástico), de forma de minimizar las impurezas metálicas en el eluido.

Para la obtención del radiotrazador [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, luego de la purificación con solución ácida de acetona, se adicionó una solución de NaOAc 0.25 M (16 - 25 μL) para ajustar $\text{pH} = 4.0$ (se toma una alícuota de la solución y mide en el momento) y el precursor PSMA-11 (2.6 nmoles). En el caso de la purificación etanólica, se utilizó una fracción del ^{68}Ga obtenido (450 μL), a la cual se adicionó NaOAc 2.5 M (137 - 150 μL) y precursor PSMA-11 (2.1 - 4.2 nmoles). En ambos casos se incubó durante 5 minutos a 100 °C y se determinó la PRQ por HPLC e ITLC-SG.

2.3) Resultados y Discusión

Frente al inconveniente del aumento de las impurezas en el eluido del generador de ^{68}Ga , las primeras medidas que se tomaron consistieron en acortar el período de inter-elución del generador y realizar eluciones fraccionadas. Pese a ello, las marcaciones del precursor PSMA-11 presentaban altos valores de ^{68}Ga libre, por lo cual se comenzó a aumentar la masa de precursor utilizado para dichas marcaciones. Alternativamente, se decidió poner en práctica los métodos de purificación de [^{68}Ga]GaCl₃ reportados en bibliografía, con el fin de obtener valores de Aesp aceptables. Para los métodos de purificación catiónica, se utilizó el eluido proveniente del generador EZAG, mientras que para las purificaciones por intercambio aniónico, se utilizó también el generador ITG.

2.3.1) Intercambio aniónico

Se ensayó el método de purificación de [^{68}Ga]GaCl₃ reportado por Velikyan [108], utilizando un cartucho de intercambio aniónico comercial (Chromafix). Dependiendo de la concentración de HCl en el eluido del generador (ITG o EZAG), se modificaron las cantidades de HCl_{cc} a adicionar en la etapa inicial, de modo de alcanzar una solución de [^{68}Ga]GaCl₃ en HCl 5.0 M. Los resultados obtenidos con los eluidos de ambos generadores, se muestran en la figura 13, donde se representa el porcentaje de actividad recuperado para el vial de purificado (el [^{68}Ga]GaCl₃ que luego se usó para las marcaciones), el vial de descarte y lo remanente en el cartucho, respecto a la actividad total empleada. Se obtuvo 84.1 ± 3.7 % de recuperación de actividad para el eluido del

generador ITG (n = 4) y 74.8 ± 2.7 % para el generador EZAG (n = 3). En ensayos previos, se utilizó una concentración de HCl 4.0 M en la solución que se pasó a través del cartucho (resultante de la mezcla de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ y HCl_{cc}), según lo recomendado en bibliografía [108], con la que se obtuvo una menor recuperación de actividad: 70.2 ± 2.0 % (n = 2). Si bien se obtuvieron valores de eficiencia mayores en la purificación de los eluidos correspondientes al generador ITG, se logró concentrar la actividad de los eluidos de ambos generadores y utilizarlos posteriormente en marcaciones de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$.

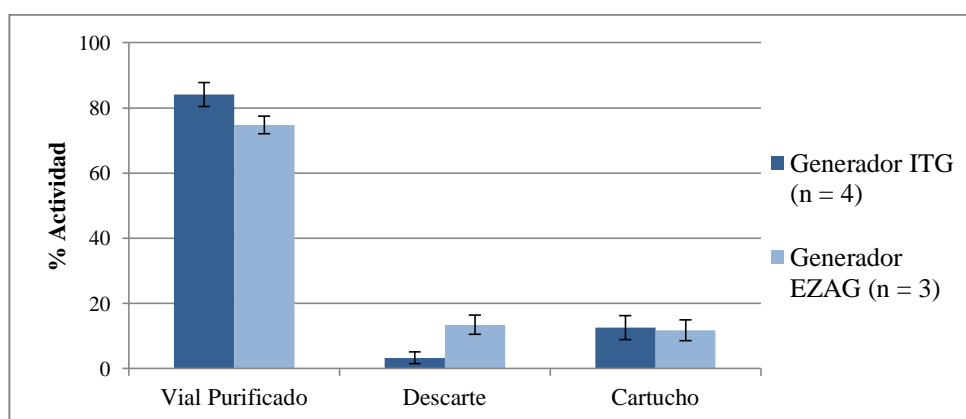


Figura 13- Valores de actividad promedio obtenida luego de la purificación de $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ por intercambio aniónico.

Para proceder a la marcación, fue necesario ajustar el pH de la solución resultante, que resultó muy bajo en todos los casos, debido al empleo de HCl concentrado en la purificación. Esta etapa no fue reproducible, puesto que la recuperación de actividad fue variable, incluso entre repeticiones del mismo procedimiento. En parte, esto se debe a que se trabajó con volúmenes pequeños en pruebas preliminares.

Luego del ajuste de $\text{pH} = 4$ de la solución de marcación, se procedió a ensayar distintas relaciones actividad/masa de precursor PSMA-11, a fin de maximizar la Aesp obtenida. La máxima Aesp obtenida fue: 64.5 MBq/nmol (PRQ = 100 %) y 16.3 MBq/nmol (PRQ = 97.5 %), para los eluidos ITG y EZAG respectivamente. Ambos valores resultan bajos respecto a los obtenidos cuando los generadores estaban aún en condiciones óptimas. Esto puede deberse a que, según bibliografía [76], este método no provee una purificación suficiente del ^{68}Ga respecto a Zn(II) y Fe(III), y a las elevadas concentraciones metálicas iniciales presentes en el eluido.

Sin embargo, esta técnica de purificación resultó adecuada para concentrar el eluido, lo cual permite aumentar la cinética de las reacciones de marcación.

2.3.2) Intercambio catiónico

Como alternativa a la técnica de purificación mediante columnas de intercambio aniónico, se ensayó la purificación por intercambio catiónico. Para ello, se utilizó una columna fuertemente catiónica, probando distintas soluciones eluyentes compuestas por HCl / acetona [76], HCl / etanol [79] o HCl / NaCl [77-78], con el fin de eliminar el uso de acetona, dada su toxicidad. En la tabla 3 se resumen las condiciones ensayadas y se presentan los valores de porcentaje de recuperación, en función de la actividad total empleada.

Tabla 3- Condiciones ensayadas para la purificación del eluido con la columna Strata-X-C.

N°	Solución de lavado inicial	Solución de elución	Recuperación (%)
1	-	NaCl 5 M / HCl 5.5M	2.1 ^a
2	-	NaCl 5 M / HCl 0.9 M	10.1 ^a
3	Acetona / HCl 0,15M (80:20)	Acetona / HCl 2.1 M (97.6:2.4)	96.5 ± 2.6 (n = 4) ^a
4	EtOH / HCl 0,15M (80:20)	EtOH / HCl 2.1 M (97.6:2.4)	0
5		EtOH / HCl 0.9 M (90:10)	0
6		EtOH / HCl 9.0 M (90:10)	8.5 ^a
7			78.0 ± 6.7 ^b (n = 3)
^a Dato correspondiente a 400 µL de volumen de elución			
^b Dato correspondiente a 1000 µL de volumen de elución			

Hubieron dos condiciones de purificación que arrojaron buen rendimiento (buena recuperación de actividad respecto a la actividad inicial). La que mejor resultó es la n° 3, que utiliza una mezcla de ácido clorhídrico con acetona. Dicha purificación se llevó a cabo con niveles de actividad entre 100 – 470 MBq, obteniendo una concentración de actividad máxima de 1134 MBq/mL. El problema de utilizar acetona en la purificación del eluido (previo a la marcación), es que se debe estar seguro de que su presencia no afectará el proceso de marcación. Hay autores que afirman remover dicha acetona mediante incubación a 95 °C en un vial abierto. [76] Aún así, luego de la marcación sería necesario una purificación del marcado, para asegurar la efectiva eliminación de la acetona, solvente no apto para inyección en humanos ni animales de experimentación en concentraciones por encima de 0.3%.

El otro método (n° 7), reemplaza la acetona por etanol, un solvente orgánico apto para inyección (en concentraciones finales menores al 10 %). La actividad utilizada en estos ensayos se encontró en el rango de 140 – 360 MBq, obteniendo en promedio 78.0 % de dicha actividad (n = 3). En este caso, si bien la recuperación de actividad

también fue auspiciosa, el volumen necesario para eluir el ^{68}Ga fue mayor (1000 μL) respecto al método que utiliza acetona (400 μL), resultando una concentración de actividad máxima de 281 MBq/mL. Una menor concentración de actividad implica una menor cinética de reacción en las marcaciones.

Con el ^{68}Ga obtenido a partir de las purificaciones que presentaron altos valores de recuperación de actividad, se realizaron marcaciones de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. El rendimiento de marcación no fue el esperado. La máxima Aesp que se logró fue de todas formas aceptable: 45 MBq/nmol. En óptimas condiciones, con el generador EZAG se alcanzaba 150 MBq/nmol y con el ITG entre 250 y 350 MBq/nmol.

2.4) Conclusiones

Durante el período de tiempo en que no se contó con un eluido de ^{68}Ga con baja concentración de impurezas metálicas, se intentaron ensayar y optimizar diferentes métodos de purificación del eluido previo a la marcación, con el fin de disminuir dichas impurezas. Se ensayaron diversas metodologías de purificación, transformando el [^{68}Ga]GaCl₃ en especies aniónicas o catiónicas, y purificando por cromatografía de intercambio iónico, empleando distintas columnas y eluyentes.

La máxima Aesp que se logró luego de la purificación con el método de intercambio catiónico fue 45 MBq/nmol (máxima recuperación de actividad: 97 %). En tanto, cuando se realizó la purificación por intercambio aniónico, se logró recuperar el 75 % de la actividad inicial, y una Aesp máxima de 16 MBq/nmol para el mismo generador (EZAG).

Si bien existen inconvenientes prácticos en la aplicación de ambos métodos, relacionados al uso de un ácido concentrado o acetona, con ambas técnicas de purificación se logró una recuperación de actividad de al menos un 75 %, aunque no mejoró sustancialmente la calidad del eluido. En parte, esto se debe a que solamente se pudo trabajar con volúmenes pequeños en pruebas preliminares y utilizando las columnas de las que se disponía. Además, la concentración inicial de metales fue mayor a la que normalmente presentaría el eluido de los generadores.

3. CAPÍTULO II: Síntesis y control de calidad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

3.1) Introducción

3.1.1) Características del complejo [⁶⁸Ga]Ga-HBED-CC

En el diseño de radiofármacos metálicos existen distintas estrategias de marcación, de las cuales la más utilizada es la de “pendant approach”, basada en la utilización de agentes bifuncionales. Un agente bifuncional es una molécula capaz de, por un lado, coordinar al radionucleido metálico, y por otro lado, unirse covalentemente a la biomolécula de interés. En muchos casos, estos agentes también cuentan con una región espaciadora, entre la región de coordinación del metal y el resto de la molécula, para minimizar los cambios estructurales sufridos a causa de dicha coordinación.

El HBED-CC (ácido *N,N'*-bis[2-hidroxi-5-(carboxietil)bencil]etilendiamin-*N,N'*-diacético, figura 14) es un agente quelante bifuncional de cadena abierta, que forma complejos de alta estabilidad con ⁶⁸Ga, incluso a temperatura ambiente. [70] Se trata de un ligando polidentado que forma 6 enlaces covalentes coordinados con el ⁶⁸Ga, lo cual completa la esfera de coordinación del metal.

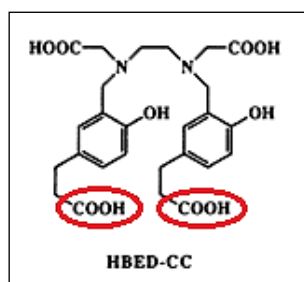


Figura 14- Estructura del agente quelante HBED-CC. En rojo se marcan los grupos COOH disponibles para conjugar a la biomolécula.

Cuando el metal se incorpora a la molécula de HBED-CC, se produce el frenado de la libre rotación de los grupos metilenos adyacentes a los átomos de nitrógeno del HBED-CC, por lo cual la molécula adquiere características ópticas. [80] Esto conllevaría a la formación de tres diastereómeros distintos, con las siguientes configuraciones de dichos nitrógenos: *RR*, *RS* y *SS*. En cada caso, el complejo formado adoptaría una geometría de prisma trigonal, en la cual el átomo de [⁶⁸Ga]Ga³⁺ ocupa el centro del prisma, configuración coherente con sus 6 posiciones de coordinación. [80-82] Analizando estas publicaciones, se concluye que el diastereómero más favorecido sería el que presenta la configuración *RR*, por ser estéricamente el menos impedido (ver figura 15).

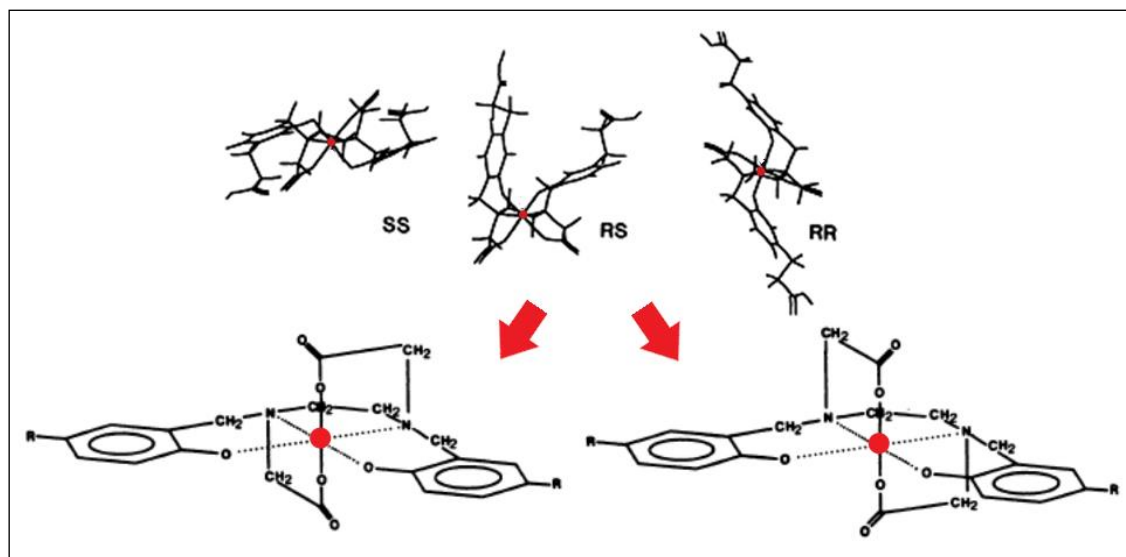


Figura 15- Superior: Diastereómeros del complejo $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-HBED-CC}$, propuestos mediante modelado molecular (modificada de: [81]). **Inferior:** $\text{R}=\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$. Enantiómeros propuestos del complejo $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-HBED-CC}$. En rojo se representa al átomo central: ^{68}Ga (modificada de: [83])

Para enlazar el HBED-CC covalentemente a una biomolécula con afinidad por un receptor, como la estructura farmacofórica glu-urea-lys, una opción conveniente es la formación de un enlace amida, a través de uno de los grupos COOH que no participan en la unión al metal (figura 14). Por ende, cuando se realizan las marcaciones del precursor PSMA-11 (HBED-CC-Ahx-Lys-NH-CO-NH-Glu), que contiene como unidad quelante el HBED-CC, se obtendrá una mezcla de dichos diastereómeros. Este aspecto ha sido muy poco estudiado en la bibliografía consultada, por lo cual hay dudas acerca de la incidencia de la formación de los diastereómeros en la afinidad de unión del radiotrazador.

En el presente capítulo, se estudiará la formación de dichos diastereómeros y su proporción relativa en distintas condiciones de reacción. También se evaluará la estabilidad de los mismos a pH neutro, con el fin de posibilitar luego el estudio de su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, abordado en los siguientes capítulos de este trabajo.

3.1.2) Efecto de la radiolisis

La radiolisis es un proceso que consiste en la descomposición de la molécula precursora, o del complejo formado, a causa de la radiación. Se describen dos tipos de radiolisis, dependiendo del mecanismo de ruptura de los enlaces químicos del

radiofármaco. Si dichos enlaces se rompen por las radiaciones que emite la propia molécula, se trata de un proceso de autoradiólisis.

En la radiolisis indirecta, las radiaciones producen la descomposición del solvente en radicales libres, que son capaces de oxidar al radiofármaco. La radiolisis indirecta, puede ser disminuída si el pH de la solución se ajusta cercano a 7, ya que muchas reacciones de formación de radicales libres ocurren a pH extremos. [84] Existen diversas estrategias para disminuir el efecto de la radiolisis durante la marcación y almacenamiento de los radiotrazadores, como por ejemplo, aumentar el volumen de la solución final (dilución), incorporar un agente antioxidante a la formulación o bien, trabajar con la menor cantidad posible de actividad compatible con el uso.

En este capítulo se describen las estrategias llevadas a cabo para evaluar si existe radiolisis en el marcado de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, y se analizará si dicha radiolisis sería el origen de las impurezas radioquímicas presentes en el marcado, evidenciadas mediante HPLC analítico.

3.2) Parte experimental

3.2.1) Materiales y Equipos

El [^{68}Ga]GaCl₃ empleado en las marcaciones fue eluído del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ disponible en CUDIM al momento de realizar dichas marcaciones: ITG (ITG Isotope Technologies Garching GmbH, Alemania) o Eckert & Ziegler IGG100 (EZAG, Eckert & Ziegler Isotop Production, Alemania). Las medidas de actividad se realizaron en un calibrador de dosis Capintec® CRC-25PET o CRC-25R. El ácido clorhídrico y el acetato de sodio, utilizados para la elución del generador y el ajuste de pH de la marcación, fueron de calidad Suprapur (MERCK). Los demás reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad analítica o superior y el acetonitrilo de grado HPLC. Las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura filtrada por 0,22 μm (de resistividad 18.2 M Ω .cm a 25°C), obtenida en el momento de un equipo MERCK MILLIPORE Direct-Q™ 5. El precursor HBED-CC-Ahx-Lys-NH-CO-NH-Glu utilizado para las marcaciones (PSMA-11), se adquirió de ABX (GmbH, Alemania). Para las pruebas de radiolisis se utilizó ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, MERCK). En las marcaciones en frío, se utilizó Ga(NO₃)₃ (Sigma Aldrich) en lugar de [^{68}Ga]GaCl₃.

Las reacciones de marcación manuales se llevaron a cabo en microtubos tipo eppendorf de 1.5 mL con tapa rosca, resistentes a las temperaturas de incubación. Para el calentamiento se utilizó un heating block digital, equipado con adaptador para los tubos tipo eppendorf empleados.

Las marcaciones para pacientes se realizaron en módulo de síntesis (iQS, ITG, Alemania), empleando kits para manejo de microfluidos estériles (ITG), situado en área blanca, bajo condiciones GMP. Se empleó precursor PSMA-11 liofilizado (ABX), el que fue reconstituido a diluciones intermedias y finales, estables durante 3 meses y 1 mes respectivamente. Para la purificación del radiofármaco se utilizaron cartuchos Sep-pak C18 light (Waters). Para la esterilización final del producto se utilizó un filtro esterilizante de 0.22 μm .

El control de calidad se realizó en un HPLC analítico Shimadzu UFLC equipado con un detector de arreglo de diodos y detector gamma en serie, empleando una columna analítica C-18 de fase reversa de 100 x 4.6 mm (Chromolith® Performance, MERCK). Para la cromatografía en capa fina se utilizaron tiras de ITLC-SG de 9.5 x 1.0 cm (cromatografía en capa fina instantánea, con soporte de sílica gel de alta resolución, Varian), cuya actividad se midió con un scanner de TLC equipado con detector de radiación gamma (EZ-SCAN, USA). El análisis de etanol como solvente residual se realizó mediante cromatografía gaseosa en un Shimadzu GC-2010 Plus, equipado con un detector FID. La determinación de endotoxinas bacterianas se realizó utilizando el equipo portátil Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, Inc).

3.2.2) Métodos

3.2.2.1) Optimización de la marcación de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

Para las marcaciones del precursor HBED-CC-Ahx-Lys-NH-CO-NH-Glu (PSMA-11) con ^{68}Ga , se eluyó el generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG) con 4 mL HCl 0.05 M. En etapas de optimización, se utilizó 1 mL de dicho eluido para la marcación con distintas cantidades de precursor (0.04 - 1.25 μg ; 0.04 - 1.32 nmol), con el fin de maximizar la actividad específica del marcado (Aesp). La mezcla de reacción se ajustó a pH = 4 con 250 μL de NaOAc 0.25 M. La incubación se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de temperatura: ambiente (T.A) o a 100 °C (en heating block), durante distintos intervalos de tiempo (de 1 a 5 minutos). Se estudió la estabilidad del marcado

hasta dos horas post-marcación por HPLC e ITLC-SG. En etapas más avanzadas de trabajo, se cambió de proveedor para el generador, por lo cual se utilizó el generador EZAG, el cual se eluyó con HCl 0.1 M, utilizando NaOAc 0.5 M para ajustar el pH de reacción.

Para el estudio del comportamiento en solución de los diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, se realizaron marcaciones con distintas relaciones actividad/masa de precursor, incubando durante 5 minutos a T.A.

Para las marcaciones en frío del precursor PSMA-11, se utilizaron 50 µL de NaOAc 0.25 M, 194.7 µL de HCl 0.05 M, 26 nmoles de precursor PSMA-11 y 5.3 µL de solución de Ga(NO₃)₃ 50 mM en HCl 0.05 M. La mezcla de reacción, a pH = 4, se calentó durante 5 minutos a 100 °C, de manera análoga a las marcaciones de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11.

3.2.2.2) Marcación de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en módulo de síntesis

Se utilizó el módulo de síntesis ITG, empleando sistemas para manejo de microfluidos estériles (kits), que se ensamblaron previamente a cada síntesis, bajo flujo laminar blindado. Se siguió el procedimiento operativo PO-PR-029-01. Se utilizaron 4 mL de [⁶⁸Ga]GaCl₃ en HCl 0,05 M, eluído directamente desde el generador ITG hacia el reactor, 1 mL de NaOAc 0.25 M para ajustar el pH y 55 - 65 µg de precursor PSMA-11. La purificación del producto, se realizó utilizando un cartucho Sep-pak C18 light, previamente activado con 5 mL de etanol absoluto y 10 mL de agua para inyección. La elución del [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 del cartucho se realizó con 2 mL Etanol 30 % estéril. El pasaje del radiofármaco al vial final (que contenía 8 mL de NaCl 0.9 % para la formulación del producto), se realizó a través de un filtro esterilizante de 0.22 µm. Se estudió la estabilidad del marcado hasta tres horas post-marcación por HPLC e ITLC-SG.

3.2.2.3) Control de calidad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

El aspecto de la solución final fue chequeado por inspección visual y el pH determinado usando un pH-metro previamente calibrado. El contenido de etanol fue analizado por GC de acuerdo a lo establecido en la USP, Capítulo General <467> [85].

Para determinar la pureza radioquímica, se ensayaron varios sistemas de gradientes de RP-HPLC en columna analítica C-18, manteniendo constante el flujo (1 mL / min), la temperatura (T.A) y variando la concentración de la fase móvil orgánica

(B, TFA 0.1 % en acetonitrilo) en relación a la fase móvil acuosa (A, TFA 0.1 % en agua). El perfil de elución se realizó con los datos obtenidos por el detector gamma y el de arreglo de diodos (UV, $\lambda = 214$ y 284 nm). Para el método optimizado, los tiempos de retención fueron de 1.6 min para el $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ y 7.0 y 8.2 para los diastereómeros de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ (detector gamma). La pureza radioquímica por HPLC (% PRQ_{HPLC}), fue calculada considerando el porcentaje de área bajo la curva de los dos diastereómeros de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, en relación a la actividad total. Para la determinación de las especies coloidales de ^{68}Ga se utilizó ITLC-SG, cuantificando la actividad a lo largo de la tira cromatográfica con un scanner de TLC equipado con detector de radiación gamma. En dichas condiciones, el radiotrazador migra con el frente de solvente ($R_f = 0.8 - 0.9$), mientras que el ^{68}Ga libre (sin reaccionar) y el $[^{68}\text{Ga}]\text{coloi}$ de quedan retenidos en el origen ($R_f = 0 - 0.2$). La pureza radioquímica por ITLC-SG (% $\text{PRQ}_{\text{ITLC-SG}}$), fue calculada como porcentaje de área bajo el pico correspondiente al $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$. Para el cálculo de la pureza radioquímica global (% $\text{PRQ}_{\text{Global}}$), se aplicó el siguiente algoritmo:

$$\% \text{PRQ}_{\text{Global}} = \frac{\% \text{PRQ}_{\text{HPLC}} \times \% \text{PRQ}_{\text{ITLC-SG}}}{\% \text{PRQ}_{\text{HPLC}} + \% \text{impurezas peptídicas}_{\text{HPLC}}}$$

Dicho algoritmo, tiene en cuenta que la PRQ obtenida por HPLC no es la real, ya que dicho método analítico no permite cuantificar el $[^{68}\text{Ga}]\text{coloi}$ de. Teniendo el dato real de porcentaje de dicha impureza aportado por la cromatografía por ITLC-SG, es posible convertir el porcentaje de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ calculado por HPLC al valor real de PRQ global.

La identidad radioquímica fue determinada por comparación de los tiempos de retención del producto marcado con el correspondiente al estándar de referencia Ga-PSMA-11 (en frío). La Aesp fue determinada considerando la actividad del producto medida al final de la síntesis, corregida por el porcentaje de PRQ global, y la masa del precursor utilizado en la síntesis. La pureza radionucleídica fue determinada en base al espectro gamma de la muestra y la identidad radionucleídica por medida del período de semidesintegración. La esterilidad y la concentración de endotoxinas bacterianas se determinaron de acuerdo a lo establecido en los Capítulos Generales <71> y <85> de la USP, respectivamente. [86-87] El test de endotoxinas bacterianas se realizó mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos del Limulus (test de LAL). [88]

3.3) Resultados y Discusión

3.3.1) Optimización de la marcación de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

Se determinó la evolución de las especies en la marcación del precursor PSMA-11 durante 5 minutos a 100 °C, y también a tiempos menores, completando los 5 minutos, a T.A. Para una relación actividad / masa de 758 ± 31 MBq/nmol, se observaron mayores rendimientos de marcación a 100 °C que a T.A, aunque se logra obtener alrededor de 50 % de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en dicha condición (figura 16).

Se obtuvo una incorporación máxima del ⁶⁸Ga al precursor (PRQ cercana al 100 %) a partir de los 0.32 nmoles de PSMA-11, para actividades de 361 ± 11 MBq. La máxima Aesp alcanzada fue de 1171 MBq/nmol (figura 16), para las condiciones de marcación optimizadas: pH = 4 e incubación 5 minutos a 100 °C. Se estudió la estabilidad de la molécula marcada por HPLC e ITLC-SG a lo largo del tiempo, al pH de marcación y a un pH cercano al fisiológico (pH = 7), ajustado mediante el agregado de buffer fosfato 0.5 M, luego de finalizada la incubación. En ambos casos se obtuvieron valores de PRQ mayores al 90 % a todos los tiempos estudiados, límite establecido por las farmacopeas oficiales para radiofármacos de diagnóstico [10-11]. El [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 resultó ser muy estable en términos comparativos a su período de semidesintegración físico, tanto al pH de marcación, como a pH fisiológico.

También se observó que, si se empleaba una mayor cantidad de precursor, el rendimiento de marcación de la reacción llevada a cabo durante 5 minutos a T.A aumentaba, alcanzando una PRQ cercana al 100 %. En dichas condiciones, la máxima relación actividad / masa fue de 100 MBq/nmol. Se verificó la estabilidad del complejo obtenido en dichas condiciones y a pH = 7, ajustado en este caso mediante el agregado de NaOH 0.1M. (Tabla 4)

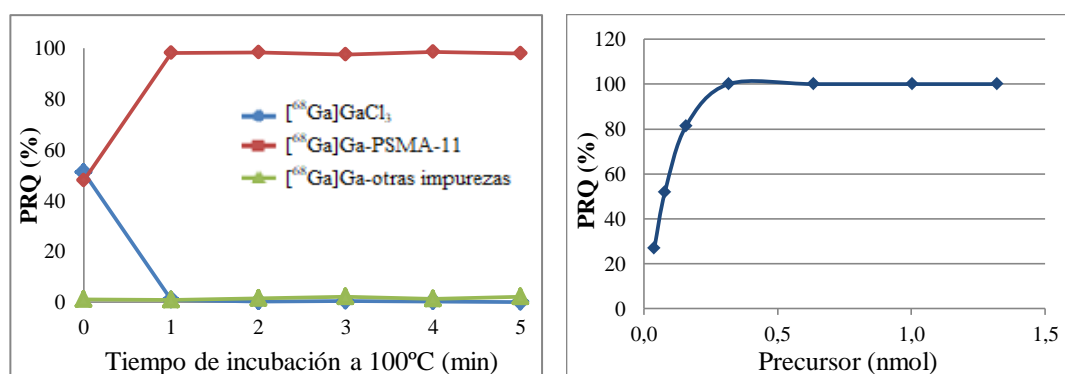


Figura 16: Izquierda- PRQ (%) de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en función del tiempo de incubación a 100°C. Derecha- Relación PRQ/masa de precursor PSMA-11(para las condiciones optimizadas).

Tabla 4 – Resultados de estabilidad a pH = 7 del marcado durante 5 minutos a T.A.

Pureza radioquímica (PRQ) de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 a distintos tiempos post-finalización de la incubación		
t = 0 ^a	t = 60 min ^b	t = 90 min ^b
(97,9 ± 0,4) %	(94,3 ± 1,2) %	(94,3 ± 3,7) %

Los resultados se expresaron como promedio de la PRQ ± DS. ^a(n=9), ^b(n=3)

3.3.2) Estudio de diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

En las marcaciones realizadas a T.A también se observó otro aspecto interesante de este complejo; se evidenciaron por HPLC dos picos cercanos del producto marcado (D1 y D2), que se interconvertían uno en el otro, al pH de marcación y en función del tiempo. También se observó que dichos picos aparecían en distintas proporciones dependiendo de la temperatura y el tiempo de incubación, siendo máxima la proporción de D1 (D1/D2 = 25) cuando la marcación se llevaba a cabo a 100 °C y al menos durante 5 minutos (figura 17). En dichas condiciones, se mantuvo estable la proporción entre D1 y D2 a lo largo del tiempo, mientras que cuando la incubación se efectuó por menos tiempo, o bien a T.A, el diastereómero D2 apareció en mayor proporción (D1/D2 = 2 aprox.). A medida que transcurrió el tiempo post-marcación, D2 se fue convirtiendo en D1 hasta que se alcanzó una relación D1/D2 de aproximadamente 25, a pH = 4 y con alta relación actividad / masa de precursor (758 ± 31 MBq/nmol) (figura 18).

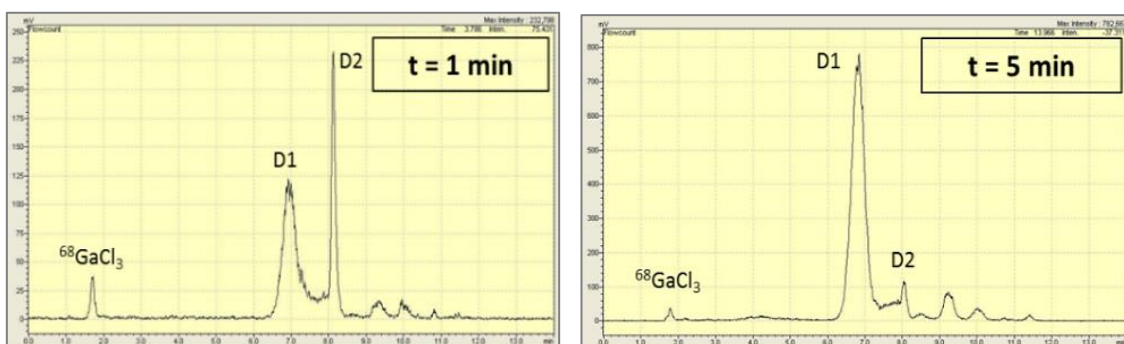


Figura 17: Cromatogramas de HPLC del radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (detección gamma), resultante de incubar la mezcla de reacción a 100 °C durante 1 o 5 minutos (comportamiento a pH = 4).

Según la bibliografía consultada, estos picos observados por HPLC (D1 y D2), corresponderían a los diastereómeros que se forman cuando se incorpora el ⁶⁸Ga a la molécula precursora. [80] En dicho proceso, se produciría el frenado de la libre rotación de los grupos metilenos adyacentes a los átomos de nitrógeno del HBED-CC, por lo cual cada par de H metilénicos se volvería no equivalente (figura 18). En consecuencia, se podrían formar tres diastereómeros distintos, con las siguientes configuraciones de

dichos nitrógenos: *RR*, *RS* y *SS*. De las publicaciones de Schumacher se desprende que el diastereómero más favorecido sería el que presenta la configuración *RR*, por ser estéricamente el menos impedido y sería además el que predomina en las marcaciones a 100 °C (D1), por incrementarse la cinética de la reacción.

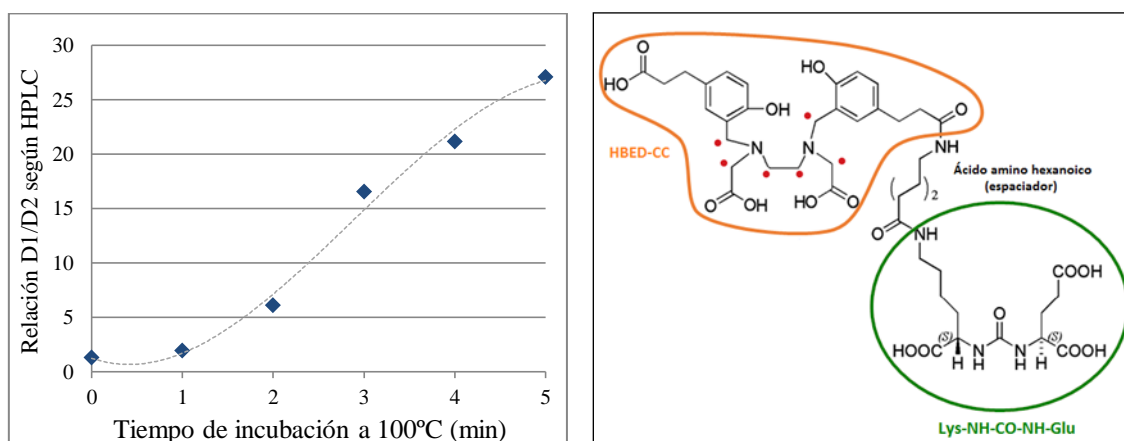


Figura 18: **Izquierda-** Gráfico que representa la relación D1/D2 en función del tiempo de incubación a 100°C. **Derecha-** Precursor PSMA-11, se resaltan en rojo las posiciones de los H que se vuelven no equivalentes al incorporarse el ^{68}Ga .

Con el objetivo final de evaluar la afinidad relativa que presentan ambas especies formadas por el receptor PSMA en futuros estudios *in vitro* e *in vivo*, los cuales requieren incubaciones de al menos media hora, fue necesario estudiar la estabilidad en función del tiempo de ambos diastereómeros, en presencia de los reactivos utilizados para la realización de dichos estudios. Se estudió la estabilidad en buffer fosfato, NaOH y suero fisiológico (NaCl 0,9 %), soluciones que son utilizadas para realizar los ajustes de pH y osmolaridad, requisitos previos a dichos ensayos.

Se evidenció que, luego de finalizada la marcación a pH = 4 durante 5 minutos a T.A, si se ajustaba el pH de la solución a 7 (utilizando NaOH), la interconversión de D2 en D1 se frenaba. En una serie de 9 marcados, en los cuales la relación actividad / masa de precursor fue de 28 ± 1.7 MBq/nmol, se obtuvo una relación D1/D2 de 2.0 ± 0.3 , la cual se mantuvo estable con el transcurso del tiempo, luego de ajustar a pH = 7 con NaOH 0.1 M. En tales condiciones, la PRQ del [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 obtenido, resultó ser mayor a 95 % en todos los tiempos estudiados. En la figura 19A, a modo de ejemplo, se observa el perfil de HPLC de un marcado realizado en dichas condiciones, que presentó una relación D1/D2 = 1.8 inicialmente (PRQ = 97.1 %), y luego de 100 min de haberse ajustado el pH a 7, la relación de diastereómeros se mantuvo casi incambiada: D1/D2 = 2.0 (PRQ = 96.5 %).

Por otra parte, se observó que con el agregado de buffer fosfato 0.5 M a la mezcla de reacción, luego de finalizada la incubación a T.A durante 5 minutos, el complejo formado se descompuso. Como resultado, en el perfil de HPLC se observa un aumento del porcentaje de ^{68}Ga libre (sin complejear) y un nuevo pico, situado entre D1 y D2 (figura 19B). Este pico, por su tiempo de retención intermedio entre los diastereómeros de ^{68}Ga]Ga-PSMA-11, podría ser el tercer diastereómero reportado en la bibliografía. La falta de estabilidad, observada por el notorio incremento del ^{68}Ga libre, puede deberse a que se incorporaron grupos fosfatos a la mezcla de reacción, que pueden actuar desplazando al ^{68}Ga de su unión al precursor. Además, los reactivos utilizados para la preparación del buffer fosfato, no fueron de calidad Suprapur o libres de metales, lo cual también puede estar influyendo en la desestabilización del complejo. Si bien resulta extraño, este comportamiento se da sólo en el caso de que la marcación se llevase a cabo a T.A, ya que si la incubación se hacía a 100 °C, el producto resultó ser estable frente al agregado de fosfatos. Con estos resultados, se podría pensar que el complejo ^{68}Ga]Ga-HBED-CC requiere de altas temperaturas para ser estable, es decir, una alta energía cinética de las moléculas podría influenciar la estabilidad del complejo y desplazar el equilibrio hacia la formación del mismo.

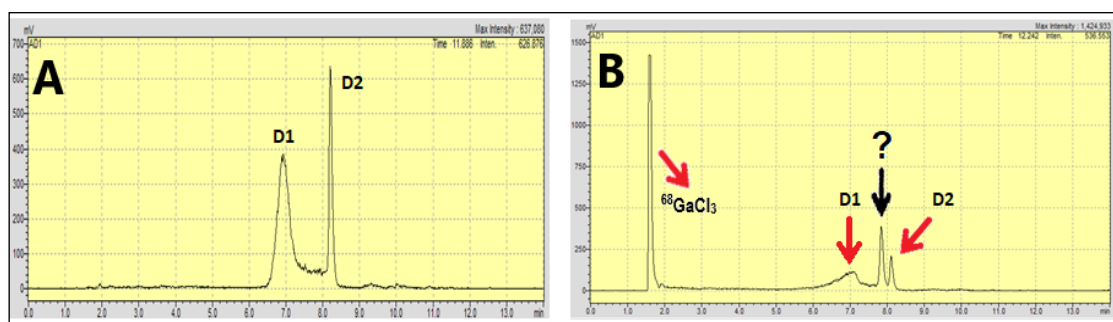


Figura 19: Cromatogramas por HPLC de ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 obtenido luego de la incubación durante 5 min a T.A, **A:** estabilidad 100 min post-marcación a pH = 7 (Detector gamma). **B:** 45 minutos post-agregado de buffer fosfato 0.5 M.

3.3.3) Estudio de impurezas de alto t_R en las marcaciones de ^{68}Ga]Ga-PSMA-11

Como se puede observar en la figura 17, en los cromatogramas obtenidos por HPLC, aparecen varios picos secundarios, de menor tamaño y mayor tiempo de retención que los diastereómeros de ^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Para tratar de explicar el origen de dichas impurezas, se evaluaron distintos aspectos del marcado, que se discuten a continuación.

- Evaluación del efecto del calentamiento

En un primer momento, se pensó que estos picos secundarios podrían atribuirse a la descomposición del precursor debida al calentamiento a 100°C. Esta hipótesis se dejó sin efecto cuando se observaron las mismas impurezas luego de realizar las marcaciones a T.A (ver figura 17). Además, se realizaron marcaciones durante 30 min a 100 °C, para estudiar cuáles serían las posibles impurezas causadas por la degradación térmica de la molécula. De estas marcaciones se obtuvieron perfiles muy similares a los obtenidos cuando se incubaba por solamente 5 minutos (figura 20). Sin embargo, cuando se calentó la mezcla de reacción por 30 minutos, la proporción de D2 fue mayor, respecto a la obtenida cuando el calentamiento se hacía durante 5 minutos. Este comportamiento no era el esperado, ya que se había observado que el diastereómero identificado como D2, se presentaba en mayor proporción cuando la incubación se realizaba a T.A.

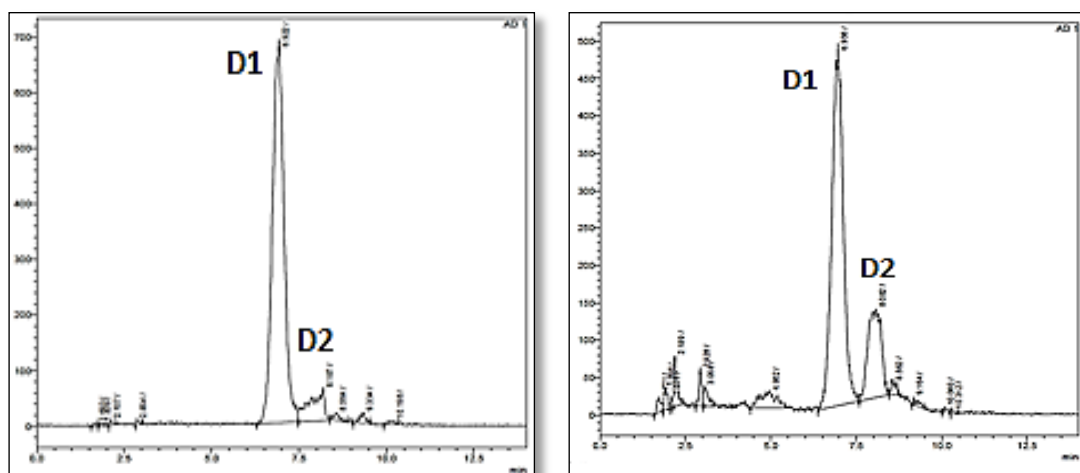


Figura 20- Perfiles de HPLC de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 obtenido por incubación a 100 °C durante 5 min (izquierda) o 30 min (derecha).

- Evaluación del efecto de radiolisis en el marcado

Se estudió el efecto de la radiolisis en el marcado, que podría explicar el origen de dichas impurezas. Se ensayaron tres maneras de reducir dicho efecto: a) diluir la mezcla de reacción, b) disminuir la actividad del marcado y c) adicionar un agente antioxidante.

Se evaluó el efecto de la concentración de actividad durante y después de la marcación. Para ello, se realizó una dilución 1/5 de una solución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 115 MBq/mL, en agua ultrapura, luego de finalizada la marcación. Se comparó la PRQ de la solución diluida respecto a la de la solución más concentrada, en función del

tiempo. No se observaron diferencias en el valor de PRQ global, ni en el porcentaje de las impurezas en estudio, hasta las 2 horas post-dilución.

A su vez, se ensayaron marcaciones con distintos niveles de actividad (65 - 330 MBq) en un mismo volumen final, para así estudiar el efecto de la concentración de actividad en las marcaciones. Se mantuvo constante la relación actividad/masa de precursor (780 MBq/nmol), de modo de que no fuera otro parámetro a considerar en dichas marcaciones. Los resultados obtenidos se observan en la figura 21, donde se representa la PRQ de los marcados en función de la concentración de actividad. Los valores de PRQ aumentaron con el incremento de la actividad, para un mismo volumen. Esto puede explicarse debido a una mayor cinética de la reacción de marcación, favorecida por un incremento en la concentración de los reactivos. Sin embargo, no se observó disminución de las impurezas en estudio en ningún caso, concluyéndose que una disminución de la actividad de marcación, no influyó la presencia de dichas impurezas.

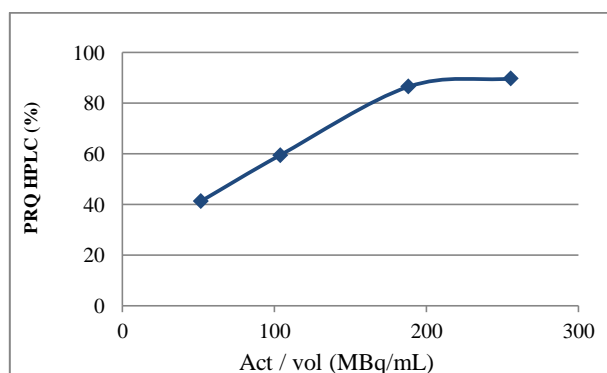
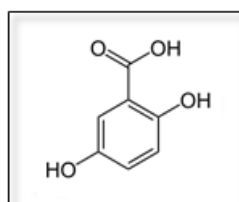


Figura 21- Relación entre PRQ y concentración de actividad en las marcaciones de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11.

Por otra parte, se evaluó el efecto del ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, figura 22) como agente antioxidante [89], ya sea incorporándolo previo a la marcación, o inmediatamente después de la incubación. Para introducir el agente antioxidante en la mezcla de reacción, se utilizó un buffer NaOAc – ácido gentísico 0.24 M pH = 4.4, de forma de que luego del agregado del [^{68}Ga]GaCl₃, se alcanzara el pH de marcación (pH = 4.0). En el otro caso, se incorporó el antioxidante luego de finalizada la incubación, mediante el agregado de una solución de ácido gentísico 0.12 M en agua ultrapura (13 mM en la mezcla de reacción). En ambas situaciones se estudió la estabilidad de la solución final en función del tiempo, hasta 90 minutos post-marcación. Al comparar los marcados sin agente antioxidante con aquellos en los cuales se utilizó ácido gentísico, los porcentajes de área bajo la curva

correspondientes a las impurezas en estudio no fueron distintos (tabla 5). Tampoco se logró disminuir el número de impurezas.



Condiciones del marcado	% Impurezas (mayor t_R)
Sin AG	10,7
Con agregado de AG pos-marcación	9,1
Con buffer NaOAc-AG	10,1

Figura 22- Estructura del ácido gálico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico). **Tabla 5-** Resultados de las marcaciones de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 con ácido gálico (AG)

Ninguna de las variantes ensayadas para disminuir los efectos de radiolisis en el marcado, introdujo cambios en el número o el porcentaje de las impurezas radioquímicas en estudio. Por lo tanto, dichas impurezas se atribuirían a la descomposición del propio precursor en solución acuosa, y no a los efectos de la radiolisis.

- Marcaciones “en frío” de Ga-PSMA-11

Cabe destacar que las cantidades de precursor utilizadas para las marcaciones con ^{68}Ga , son del orden nanomolar, por lo cual no son detectables al UV en el análisis por HPLC. Este hecho impedía que se pudiera comparar el perfil UV del [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, con el obtenido por el detector gamma. Para subsanar este inconveniente, se realizaron inyecciones al HPLC de soluciones de precursor más concentradas. Se observó que aquellas fracciones con mayor tiempo de almacenamiento (aliquotadas y congeladas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$), presentaron mayor porcentaje de picos secundarios pequeños al UV (figura 23). A su vez, se realizaron conjugaciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ con el precursor PSMA-11, para obtener el estándar frío del complejo Ga-PSMA-11 (figura 24B), resultando un perfil UV similar al obtenido en las marcaciones del precursor con ^{68}Ga (figura 24A, detección gamma).



Figura 23- Cromatogramas de HPLC con detección UV a 284nm. **A:** Precursor PSMA-11 recién aliuotado. **B:** Precursor PSMA-11 con 6 meses de aliuotado.

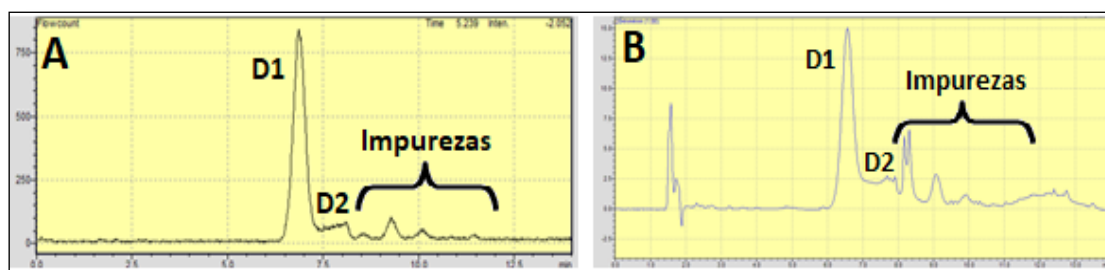


Figura 24- **A:** Cromatograma de HPLC típico de un marcado de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ con precursor descompuesto (detección gamma). **B:** Cromatograma de HPLC del complejo Ga-PSMA-11 (detección UV a 284 nm).

Como resultado final de estos estudios, se reafirmó la hipótesis de que las impurezas radioquímicas de alto t_R en el HPLC, se debían a la falta de estabilidad del precursor en solución acuosa. Frente a dichas observaciones, se decidió otorgar una vida útil de aproximadamente 3 meses a las fracciones de precursor alicuotado.

3.3.4) Marcación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en módulo de síntesis

Las marcaciones de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en módulo de síntesis, se realizaron bajo condiciones GMP, en un flujo laminar blindado que contiene al módulo ITG (figura 26). El procedimiento de síntesis semiautomática del radiofármaco fue optimizado para realizar todo el procedimiento en dos horas, incluyendo todas las etapas: acondicionamiento del flujo laminar y preparación de materiales, marcación y purificación del radiofármaco, formulación final, filtración esterilizante y control de calidad fisicoquímico (figura 25). En este tipo de marcaciones, por ser destinadas a uso en pacientes, se realizó siempre la purificación del radiofármaco, previo a la etapa de formulación (ajuste de pH y osmolaridad de la solución final). La purificación se realizó mediante cartucho de extracción en fase sólida reversa (C18), ubicado on line en el módulo de síntesis. Dicha purificación resultó imprescindible para que el radiofármaco producido cumpliera con el límite de ^{68}Ge establecido por EP.

Además, se logró separar el radiofármaco del ^{68}Ga libre que no reaccionó (no queda adsorbido en el cartucho, se colecta en el vial de descartes) y del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-coloide}$ (queda retenido en el cartucho). El radiofármaco se obtuvo en una solución final de suero fisiológico con un 6 % de etanol aproximadamente. Los lotes productivos de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ permitieron la inyección de hasta 5 pacientes por lote, ya que el $T_{1/2}$ del radionucleido y la actividad del generador fueron los factores limitantes. El radiofármaco resultó muy estable en su formulación final. Dicha estabilidad se

comprobó hasta 3 horas post-marcación, tiempo que asegura la inyección del paciente y la adquisición de imágenes (figura 27).

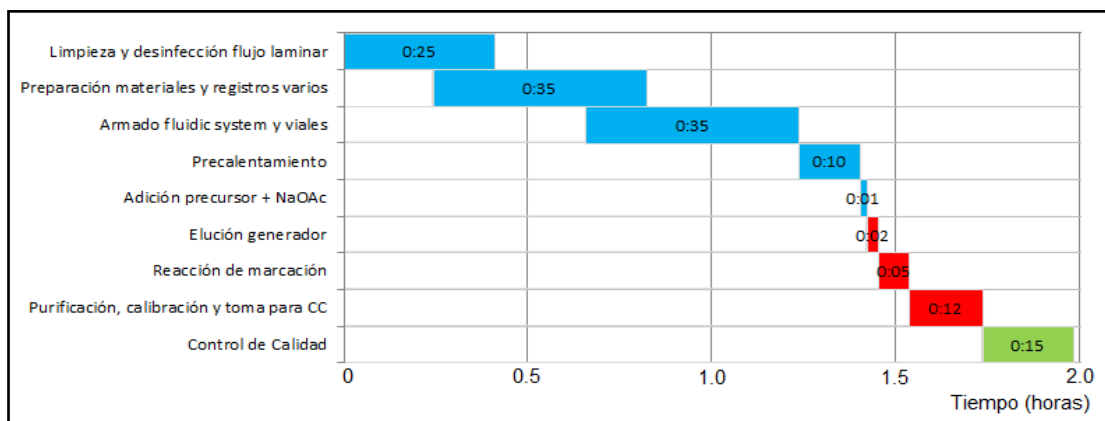


Figura 25- Esquema temporal de distribución de tareas en una producción de rutina de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en módulo de síntesis.

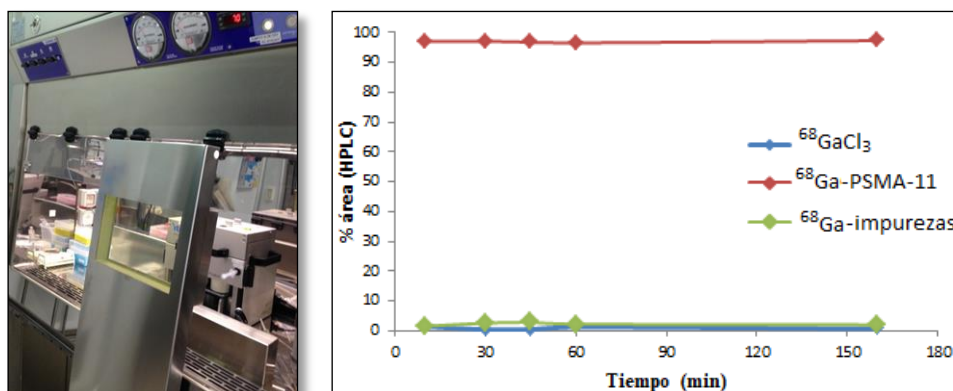


Figura 26 (izquierda)- Fotografía del flujo laminar blindado que contiene al módulo de síntesis ITG. **Figura 27 (derecha)-** Estabilidad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en formulación final, determinada por HPLC.

3.3.5) Control de calidad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$

Para lograr resolver lo mejor posible la mezcla de reacción, y observar el comportamiento de ambos diastereómeros, así como de las impurezas radioquímicas observadas, se probaron trece sistemas de HPLC con diferente lipofilidad y gradiente de solventes. Se varió la concentración de la fase móvil orgánica B en función del tiempo (figura 28). Todos los gradientes ensayados utilizaron las mismas fases móviles A (acuosa) y B (orgánica), que fueron, FM A: 0.1 % TFA (ácido trifluoroacético) en agua y FM B: 0.1 % TFA en acetonitrilo. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar un gradiente que logró buena resolución de ambos diastereómeros, a la vez que separó las demás impurezas: ^{68}Ga libre e impurezas radioquímicas, que presentaron

un mayor tiempo de retención en la columna respecto al radiotrazador. En la figura 28 se muestran los gradientes empleados y se señala en rojo el que permitió mejores características de resolución de los componentes de la mezcla de reacción.

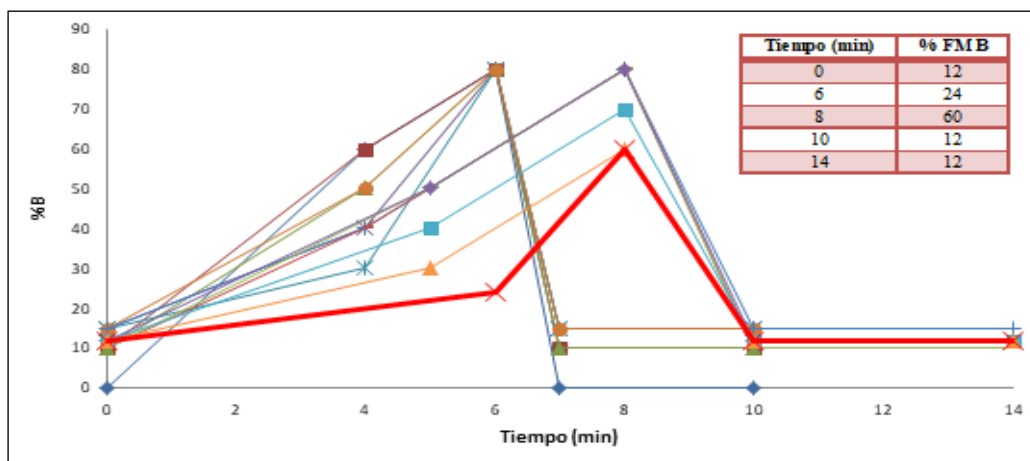


Figura 28- Gradientes de HPLC ensayados para el control de calidad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$. La línea roja indica el gradiente seleccionado, el que se detalla en el margen superior derecho.

Respecto a las impurezas coloidales, el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{OH})_3$, es una especie insoluble cuya formación es favorecida al pH de marcación en concentraciones por encima de la nanomolar. Su determinación se llevó a cabo mediante ITLC-SG, ya que las especies coloidales quedan retenidas en la columna del HPLC y no se pueden cuantificar. Se ensayaron diversas fases móviles para separar la molécula marcada del ^{68}Ga libre y del $[^{68}\text{Ga}]\text{coloiide}$ (ver tabla 6). Se eligió la mezcla $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$ (1:1) como fase móvil, ya que fue la que permitió obtener mejor resolución de los picos (figura 29). En dicho sistema, el $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ migró con el frente del solvente, mientras que el ^{68}Ga libre presentó un $R_f = 0 - 0.2$, al igual que el $[^{68}\text{Ga}]\text{coloiide}$. Así pues, con la determinación de ^{68}Ga libre por HPLC y la de $[^{68}\text{Ga}]\text{coloiide}$ a partir de la cromatografía en ITLC-SG, se pudieron determinar todos los componentes: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, ^{68}Ga libre y $[^{68}\text{Ga}]\text{coloiide}$ (además de las otras impurezas determinadas por HPLC, ya discutidas anteriormente).

Solventes	Proporción
$\text{NH}_4\text{OAc} / \text{MeOH}$	1 : 1
$\text{NaCl} 0,9\% / \text{MeOH}$	4 : 1
$\text{NaCl} 0,9\% / \text{MeOH} / \text{NH}_3$	4 : 1 : 0.25

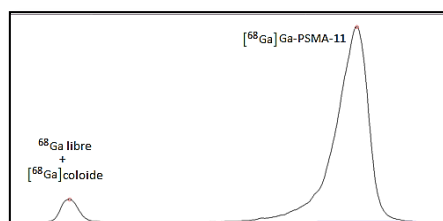


Tabla 6- Fases móviles ensayadas para la cromatografía por ITLC-SG de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$. **Figura 29-** Perfil de ITLC-SG para $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, en $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$ (1:1), obtenido con scanner (detección gamma).

En la tabla 7, se muestra a modo de ejemplo, un detalle de las especificaciones del radiofármaco obtenido en el módulo de síntesis en condiciones GMP, así como los resultados del control de calidad de 3 lotes de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 producidos en CUDIM para uso en pacientes. Además de los parámetros fisicoquímicos que se controlan inmediatamente después de producido el lote, se verificó la esterilidad y la concentración de endotoxinas bacterianas de la solución final. El test de esterilidad es un test que no puede realizarse en el momento, por lo cual, su resultado se conoce 2 semanas después de producido el radiofármaco. Cada lote analizado, cumplió con el requisito de esterilidad y la concentración de endotoxinas estuvo de acuerdo con los estándares establecidos para una solución inyectable.

El [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 producido cumplió con todas las especificaciones establecidas para el control de calidad, por lo cual resultó apto para su aplicación como solución inyectable en pacientes.

Tabla 7- Especificaciones y resultados del control de calidad de un lote productivo de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. ND = no detectado.

Técnica	Análisis	Especificación	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3
Visual	Apariencia	Solución incolora, transparente libre de partículas visibles	Cumple	Cumple	Cumple
pHmetro	pH	4,0 – 8,0	6,7	5,9	5,9
HPLC+ ITLC	Pureza radioquímica total	> 90 %	97,0	96,3	98,4
HPLC	Pureza radioquímica HPLC	> 90 %	97,5	98,5	99,2
HPLC	Identificación	Tr (min) por HPLC similar al estándar	4,5	3,9	4,0
ITLC	Pureza radioquímica ITLC-SG	> 90 %	99,5	97,8	99,2
HPLC+ ITLC	Impureza A ([⁶⁸ Ga]Ga(OH) ₃)	A+B < 10 %	0,5	2,2	0,8
HPLC	Impureza B ([⁶⁸ Ga]GaCl ₃)	A+B < 10 %	ND	ND	ND
GC	Determinación de solventes	Etanol < 10 %	4,9	6,4	6,0
Centelleo sólido	Pureza radionucleídica (espectro)	> 99,5 % de emisión gamma a 511 keV y/o 1077 keV	Cumple	Cumple	Cumple
T _{1/2}	Identidad (T _{1/2})	62 – 74 min.	64	67	69
Centelleo sólido	Determinación de ⁶⁸ Ge	< 0,001% (medido después de 48 h)	Cumple	Cumple	Cumple
Endosafe®	Determinación de pirógenos	< 25 EU/mL (<175 EU/Vol.Iny.)	Cumple	Cumple	Cumple

3.4) Conclusiones

Se optimizaron las condiciones de marcación del precursor PSMA-11 con ^{68}Ga por método manual, y pudieron ser transferidas a un módulo semiautomático de síntesis de radiofármacos de ^{68}Ga . Se obtuvo un radiofármaco de elevada pureza y actividad específica. Se comprobó la estabilidad del mismo en distintas condiciones, resultando ser muy estable, tanto al pH de marcación como a pH fisiológico. Se logró establecer un sistema de cromatografías (HPLC e ITLC-SG) que permitió cuantificar todas las posibles impurezas radioquímicas presentes en los marcados.

Se lograron separar y cuantificar mediante HPLC analítico los diastereómeros de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, los cuales se presentaron en distintas proporciones dependiendo de la temperatura y el tiempo de incubación. Para las condiciones optimizadas de marcación, se encontró que uno de ellos fue el predominante, alcanzando una relación 25:1 entre ellos. Además, se estudió el origen de las impurezas radioquímicas de mayor t_R en el HPLC. Éstas resultaron ser atribuidas a la descomposición del precursor en solución acuosa, posibilitando determinar la vida útil del mismo y descartando que hubiera un efecto de radiolisis considerable en el marcado.

Como conclusión general, se logró obtener un nuevo radiotrazador PET, que cumplió con todas las especificaciones establecidas para el control de calidad.

4. CAPÍTULO III: Evaluación *in vitro* de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

4.1) Introducción

4.1.1) Líneas celulares humanas de CaP

El éxito de un radiofármaco cuyo blanco molecular es un receptor, depende entre otras cosas, de la alta afinidad y la especificidad de unión al receptor. Las técnicas de cultivo celular pueden contribuir significativamente en las etapas iniciales del desarrollo de nuevos radiotrazadores, aportando información sobre la interacción con el receptor, la captación / eflujo del radiotrazador, o la interacción con otros receptores celulares. Es por ello que para la evaluación *in vitro* de radiotrazadores dirigidos a blancos sobreexpresados en ciertos tumores, resulta de gran interés contar con estudios realizados en líneas celulares tumorales específicas. Los cultivos celulares tumorales, son modelos homogéneos que permiten un conocimiento más preciso de la biología tumoral. En el caso del CaP, existen varias líneas celulares humanas que han sido extensamente estudiadas.

La línea tumoral LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate), fue desarrollada en 1977 por el grupo de Horoszewicz [90] a partir de un ganglio linfático con lesión metastásica de CaP. Dichas células expresan PSMA y fosfatasa ácida prostática (PAP), además de receptores androgénicos (RA). [91-92] De características similares, la línea celular MDA-PCa-2b, también expresante de PSMA y RA, deriva de una metástasis ósea de un paciente con adenocarcinoma de próstata andrógeno-independiente. [93] Estas dos líneas celulares constituyen excelentes modelos tumorales andrógeno-dependientes para la evaluación de radiotrazadores en CaP.

Por otra parte, la línea celular PC3, fue desarrollada por el grupo de Kaighn en 1976, a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata grado IV. [94] Estas células no expresan PSMA ni RA, por lo cual constituyen un modelo tumoral indiferenciado de CaP, andrógeno-independiente y muy resistente a los tratamientos comunes.

En CUDIM se dispone de las tres líneas celulares de CaP mencionadas, las cuales se utilizaron para el estudio de la interacción de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 con su blanco molecular: el receptor PSMA.

4.1.2) Estudio de la interacción ligando – receptor

Existen diversos métodos experimentales para evaluar la interacción entre un ligando y su receptor, dentro de los cuales los más utilizados son: ensayos de competencia, ensayos para determinar unión máxima, ensayos de internalización y externalización, entre otros.

Los estudios de unión e internalización celular, son herramientas que resultan de gran utilidad para conocer la capacidad de una molécula de unirse a su sitio de reconocimiento celular, que puede estar en la membrana celular, y de ingresar al interior de la célula. Con este tipo de ensayos, se puede definir si las células estudiadas presentan sitios de unión específicos para el receptor, y si internalizan al radiotrazador en cuestión. También se puede estudiar si un ligando internalizado permanece en el citoplasma celular, o si es nuevamente externalizado. En general, estos ensayos consisten en la incubación de las células, que expresan el receptor de interés, con una pequeña cantidad de radiotrazador. Luego se separa la fracción de actividad unida a la membrana celular y se lisan las células para obtener la fracción internalizada. Se diferencia además, la actividad específicamente unida, de aquella inespecífica (debido a interacciones con la superficie de la placa o cualquier otro factor propio del ensayo), bloqueando algunos de los pozos con un agente inhibidor de dicha unión. El ensayo de internalización se realiza basándose en que el radiotrazador unido a la membrana (pero que no ingresó a la célula), se disociará en medio ácido, pasando a ser extraído en los lavados que se realicen.

Por otra parte, los ensayos de competencia por la unión al receptor, permiten determinar el valor de IC_{50} (concentración inhibitoria 50 %), que representa la concentración de ligando no marcado (frío) que es capaz de inhibir por competencia, el 50 % de la unión máxima del ligando marcado (radiotrazador) a su sitio específico de reconocimiento. Analizar dicho valor permite conocer la afinidad del ligando por su receptor. Un ligando con menor valor de IC_{50} presenta una mayor afinidad de unión al receptor *in vitro*, ya que se requerirá una menor concentración del ligando para competir con el radiotrazador. Para realizar la determinación de IC_{50} , se asume que la unión del radiotrazador al receptor es reversible, al igual que la interacción del receptor con el bloqueante o inhibidor, ya que se trata de un ensayo de competencia. Conocer los valores de IC_{50} resulta de gran utilidad en la comparación de la afinidad de unión de distintos ligandos hacia un mismo sitio de reconocimiento. Se trata de un método de

screening que se aplica comúnmente al estudio de diferentes moléculas, con el fin de identificar un compuesto líder en una serie de nuevas moléculas en investigación. [95]

En el presente capítulo, se estudiará el comportamiento *in vitro* del [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, mediante ensayos de unión e internalización en tres líneas celulares de CaP. Se evaluará la captación del radiotrazador en función del tiempo, así como su grado de internalización. Se determinará además, el valor de IC₅₀ para el [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en concentrados de membranas, obtenidos a partir de cultivos de células LNCaP y MDA-PCa-2b, expresantes del receptor de membrana PSMA.

4.2) Parte experimental

4.2.1) Materiales y equipos

Para los estudios de unión e internalización celular se utilizaron tres líneas celulares de CaP humano: LNCaP (ATCC®CRL-1740™, PSMA+), MDA-PCa-2b (ATCC® CRL-2422™, PSMA+) y PC3 (ATCC® CRL1435™, PSMA-). Todas fueron adquiridas en American Type Culture Collection Cell (ATCC). Para el mantenimiento de las células en cultivo se utilizaron los medios RMPI 1640, HPCI, DMEM y suero fetal bovino (SFB, Gibco™). Como agente bloqueante se utilizó el precursor PSMA-11 “frío”, hasta que se dispuso de un inhibidor más adecuado para tal fin, el 2-PMPA (ácido 2-fosfonometil-pentano-1,5-dioico, ABX). Para las marcaciones de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 se utilizaron los mismos reactivos detallados en el punto 3.2.1. Los reactivos utilizados en la preparación de los distintos buffers y soluciones fueron de calidad analítica (MERCK, Sigma-Aldrich, Carlo Erba) y se usaron sin purificación adicional. En las mediciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo, acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®. El control de calidad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 se realizó con un equipo de HPLC analítico Shimadzu UFLC equipado con un detector de arreglo de diodos, detector gamma en serie y una columna analítica C-18 de fase reversa de 100 x 4.6 mm (Chromolith® Performance, MERCK). Para la cromatografía en capa fina se utilizaron tiras de ITLC-SG (Varian), cuya actividad se midió con un scanner de TLC equipado con detector de radiación gamma (EZ-SCAN, USA). En los ensayos de competencia, se utilizó el equipo Harvester (Brandel Inc) para los enjuagues sucesivos.

4.2.2) Métodos

4.2.2.1) Ensayo de unión e internalización celular de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP

Para la realización de los ensayos de unión e internalización celular, se emplearon dos líneas celulares de CaP que expresan el receptor PSMA (LNCaP y MDA-PCa-2b), y una que no lo expresa, como control negativo (PC3). Las células PC3 se cultivaron en DMEM, las LNCaP se cultivaron en RMPI 1640 y las MDA-PCa-2b se cultivaron en HPCI. En todos los casos, el medio de cultivo comercial se suplementó con SFB al 10 % (v/v) y solución antibiótica/antimicótica. Las células fueron cultivadas bajo atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO₂ a 37 °C. Los ensayos se realizaron según el método reportado por Vasilskis *et al.* [96] Se utilizaron las células en estado de confluencia, cultivadas al menos 2 días antes del ensayo, en placas de 6 pozos a razón de 300.000 células por pozo. El día del ensayo, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con buffer fosfato salino frío (PBS 0.01 M). Se agregó medio de cultivo suplementado con 1 % de SFB (1.2 mL / pozo). La mitad de los pozos fue bloqueada mediante el agregado de agente bloqueante (150 µL / pozo), que se incorporó en exceso de 10.000 veces respecto a la cantidad de precursor empleada para la preparación del radiofármaco. A la otra mitad (no bloqueada) se les agregó buffer de ensayo (solución de seroalbúmina bovina al 0.5 % en PBS 0.01 M, 150 µL / pozo). A continuación, a todos los pozos se les añadió [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (0.5 MBq, 150 µL / pozo), y las placas se incubaron a 37 °C durante un tiempo predefinido: 1, 2 o 3 horas según el caso. El radiotrazador se sintetizó según el método de marcación manual de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, desarrollado en el punto 3.2.2.1, incubando durante 5 minutos a 100 °C. Las diluciones de agente bloqueante y radiotrazador se realizaron en buffer de ensayo. Finalizada la incubación, se retiró todo el medio y se lavó con PBS frío, para detener la interacción y eliminar el radiotrazador que no se unió a las células. Luego se realizaron dos lavados con 1 mL de buffer glicina frío (0.05 M de glicina / NaCl 0.1 M, pH 2.8), incubando durante 5 minutos cada vez, a fin de poder recoger la fracción del radiotrazador que se adhirió a la membrana celular (fracción unida). El tercer enjuague se realizó con 1 mL de buffer de ensayo. Luego, las células se lisaron con NaOH 0,1 M (3 lavados de 1 mL) para obtener la fracción internalizada. Finalmente, se midieron ambas fracciones en un contador de centelleo sólido y se corrigieron dichos datos teniendo en cuenta el decaimiento del radionucleido durante el ensayo. Para tomar como

referencia de la actividad total sembrada, se prepararon 3 tubos con 150 μL de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 y 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. Se calculó la captación celular específica total, como porcentaje de la actividad específicamente unida (AU_{esp}) respecto a la actividad total añadida inicialmente a las células (tubos TOTALES), siendo la $\text{AU}_{\text{esp}} = \text{unión total (pozos no bloqueados)} - \text{unión no específica (pozos bloqueados)}$.

4.2.2.2) Evaluación del comportamiento de los diastereómeros de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP

Se utilizó la línea celular LNCaP, y se procedió de manera similar a la descrita en el punto anterior (4.2.2.1), pero realizando algunas modificaciones. En este caso, el radiotrazador se obtuvo mediante incubación de 5 minutos a T.A y luego se ajustó a $\text{pH} = 7$ con NaOH 0.1 M. A su vez, para las diluciones de agente bloqueante y radiotrazador, se reemplazó el buffer de ensayo por NaCl 0.9 % (suero fisiológico, Fármaco Uruguayo). El día del ensayo, luego de retirar el medio de cultivo y lavar las células con PBS 0.01 M frío, se agregó 1.2 mL de suero fisiológico en cada pozo (en lugar de medio de cultivo suplementado con SFB). A continuación se procedió de manera análoga al punto anterior.

4.2.2.3) Análisis estadístico

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 %.

4.2.2.4) Determinación de IC_{50}

Para la determinación del coeficiente de inhibición 50 % (IC_{50}) se utilizaron homogeneizados de membranas, obtenidos a partir de células LNCaP y MDA-PCa-2b. Se evaluó la capacidad de unión de una cantidad fija del radiotrazador ([^{68}Ga]Ga-PSMA-11) a una cantidad constante del preparado de membranas, en presencia de niveles crecientes del ligando “frío” (precursor PSMA-11). Los ensayos se llevaron a

cabo en tubos de poliestireno y por triplicado. Se realizó el bloqueo de los tubos con 50 μL de una solución de seroalbúmina bovina al 10 % en buffer Tris-Mg (Tris 0.025 M / MgCl_2 0.01 M, pH 7.5). A continuación, se agregó a cada tubo 50 μL de precursor PSMA-11, en concentraciones crecientes, de modo de obtener al menos 7 puntos. Se incorporó el concentrado de membranas (100 μL por tubo) y el radiotrazador (50 μL por tubo, 1 MBq). El radiotrazador se sintetizó según el método de marcación manual de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, desarrollado en el punto 3.2.2.1, incubando durante 5 minutos a 100 °C. A su vez, se prepararon dos tubos destinados a analizar la unión no específica, en los cuales el bloqueante utilizado representó un exceso de 3.000 veces respecto a la masa de PSMA-11 en el radiotrazador. Otros dos tubos se prepararon para estudiar la unión máxima del radiotrazador, en los cuales se reemplazó la solución bloqueante por buffer Tris-Mg. Se incubaron todos los tubos a 37 °C durante 60 minutos. Finalizada la incubación, se lavaron tres veces los tubos con 3 mL de buffer Tris-Mg cada vez, utilizando el equipo Harvester. Dicho aparato permitió recoger en papel de filtro, y por separado, las membranas celulares correspondientes a cada tubo, que contenían los receptores PSMA y el radiotrazador que se unió a ellos. A continuación se midió la actividad de cada filtro en un contador de centelleo sólido, y se corrigieron dichos datos teniendo en cuenta el decaimiento del radionucleido durante el ensayo. Utilizando el software Graphpad Prism, se construyeron los gráficos de actividad en función de la concentración de precursor en base logarítmica, y se calculó el valor de IC_{50} en ambas líneas celulares.

4.3) Resultados y Discusión

Al momento de la realización de este trabajo de tesis, en CUDIM se contaba solamente con la línea celular PC3, cuyo comportamiento *in vitro* ya estaba bien estudiado. Como dicha línea celular no expresa el receptor PSMA, se decidió adquirir dos nuevas líneas celulares de CaP humano que sí lo expresaran. Luego de una extensa revisión bibliográfica, se eligieron las líneas LNCaP (muy utilizada en investigaciones de CaP), y MDA-PCa-2b, por poseer características más tumorogénicas que las anteriores (pensando en la puesta a punto de futuros modelos animales). En el proceso de cultivo y reproducción de estas líneas celulares se presentaron ciertas dificultades. Inicialmente no se lograba la adhesión de las células a la superficie de la caja de cultivo, aunque según las especificaciones del proveedor, se trataba de células adherentes en

ambos casos. Luego de varias semanas y de probar distintos medios de cultivo, variando las concentraciones de suero fetal bovino, incorporando poli-lisina a la superficie de la caja para aumentar su adherencia y demás estrategias ensayadas, se logró obtener cultivos saludables de ambas líneas celulares. Se pudo además, establecer un banco de células, que contiene viales con células de bajo pasaje, de modo de conservar las líneas celulares para su uso en el Centro.

4.3.1) Ensayo de unión e internalización celular de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en cultivos celulares de CaP

En los primeros ensayos de unión e internalización celular de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 que se llevaron a cabo en células LNCaP, se utilizó como bloqueante el propio precursor PSMA-11. Dichos ensayos en su mayoría no fueron satisfactorios, debido a varios factores. Por un lado, no se pudo utilizar un exceso de masa apropiado de bloqueante respecto al radiotrazador, ya que se trata de un precursor muy costoso. Además, surgieron problemas por falta de adherencia de las células durante los ensayos. En varias oportunidades, se pudo constatar el desprendimiento celular durante los enjuagues iniciales. Estas circunstancias determinaron que los resultados de estos ensayos preliminares, si bien fueron prometedores, no pudieron ser promediados. Frente a estos inconvenientes, y disponiendo de 2-PMPA, un inhibidor muy potente de PSMA [60], se trabajó aplicando una capa de poli-lisina sobre la superficie de los pozos previamente a la siembra de las células. Se realizaron entonces 3 ensayos con células LNCaP, en igualdad de condiciones, utilizando como inhibidor el 2-PMPA. En el caso de las células MDA-PCa-2b y PC3, los ensayos se realizaron utilizando el precursor PSMA-11 como inhibidor. Los resultados obtenidos, se detallan a continuación.

En todos los casos, para informar el valor correspondiente a la captación específica, se restaron los valores de captación no específica, determinados con los tubos bloqueados.

Dado el interés de conocer la captación celular de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en función del tiempo, se realizaron ensayos en ambas líneas celulares expresantes de PSMA, incubando las placas con el radiotrazador durante 1, 2 o 3 horas. En la figura 30, se representa el porcentaje de captación celular específica total, calculado sobre el total de actividad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 que se adicionó en las placas (estimada con el promedio de actividad medida en los tubos TOTALES). Se evidenció una mayor

captación total para la línea celular MDA-PCa-2b, en todos los tiempos estudiados. Sin embargo, ambas líneas celulares presentaron a los 60 minutos una captación de radiotrazador muy buena, la cual se mantuvo casi constante hasta las 3 horas de incubación. Como la captación total no disminuyó, se podría asumir que luego de 60 minutos de incubación, existió un equilibrio entre el radiotrazador en solución y el radiotrazador captado por las células. Se determinó entonces, que los ensayos de unión-internalización celular se realizarían con un tiempo de incubación de 60 minutos. Dicho período de tiempo sería suficiente para alcanzar el equilibrio de la unión y el de la internalización del radiotrazador, permitiendo además trabajar con actividades razonables, teniendo en cuenta el $T_{1/2}$ del ^{68}Ga .

Con respecto a la línea celular PC3, no expresante de PSMA, luego de 3 horas de incubación, no hubo captación celular específica del radiotrazador. Los valores de captación total obtenidos en los pozos sin bloquear fueron estadísticamente similares a los obtenidos en los pozos bloqueados ($p > 0.05$, tabla 8). Esto determinó que la captación específica (pozos no bloqueados – pozos bloqueados), fuera nula para todos los tiempos de incubación. Los resultados son concordantes con una captación no específica del radiotrazador, dado que las células PC3 no expresan receptores de PSMA.

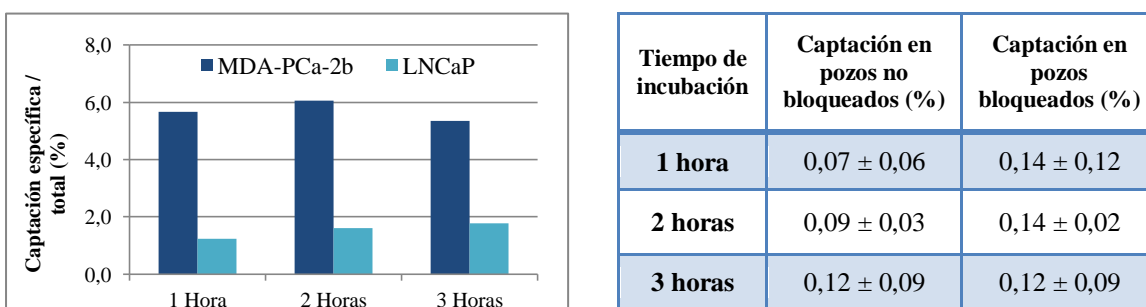


Figura 30- Captación específica total de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en células LNCaP y MDA-PCa-2b, en función del tiempo de incubación.

Tabla 8 - Captación celular de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en células PC3, expresada como porcentaje de la actividad total añadida inicialmente por pozo (300.000 células/pozo). Los datos se presentan como promedio ± DS (n=2).

Habiendo establecido el tiempo de incubación óptimo, se realizaron los ensayos de unión e internalización celular de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en las dos líneas celulares humanas de CaP expresantes de PSMA, a 60 minutos post-incubación. En ambos casos, la actividad unida a la membrana celular de los pozos no bloqueados, fue significativamente mayor a la actividad de los pozos bloqueados ($p < 0.05$), con respecto a la actividad total empleada por pozo (300.000 células/pozo). Los valores

obtenidos fueron: 1.02 ± 0.29 % y 0.13 ± 0.06 % en las células LNCaP y 7.85 ± 3.76 % y 0.04 ± 0.02 % en las células MDA-PCa-2b, para los pozos sin bloqueo y bloqueados respectivamente (figura 31). Estos resultados indican que ambas líneas celulares presentaron unión específica de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ a sus membranas celulares: 0.9 ± 0.3 % y 7.5 ± 3.7 % de la actividad total añadida a las células LNCaP y MDA-PCa-2b respectivamente (n= 3).

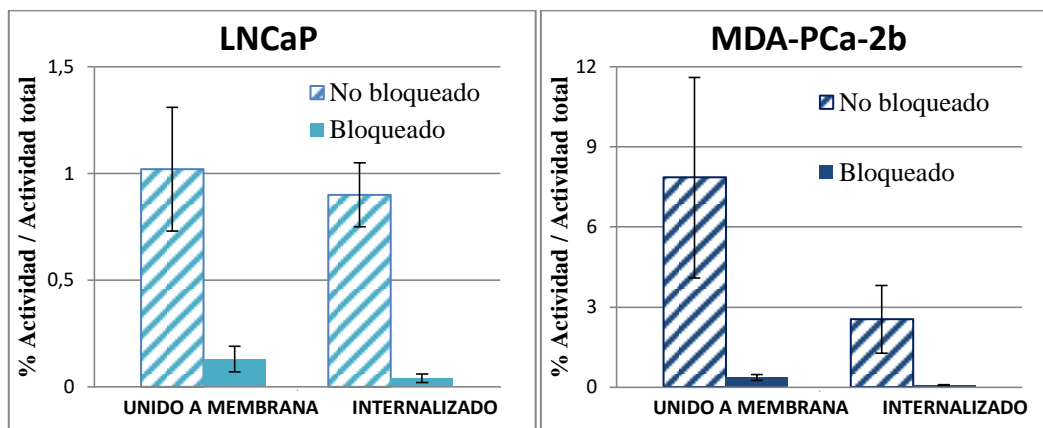


Figura 31- Porcentaje de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ unido a membrana o internalizado por las células LNCaP (izquierda) y MDA-PCa-2b (derecha), en los pozos bloqueados y no bloqueados. Los resultados se expresan en función de la actividad total, como promedio \pm DS de 3 experimentos independientes (n=3).

Además de una mayor unión a membrana, se encontró una mayor internalización del radiotrazador en la línea celular MDA-PCa-2b, respecto a la línea LNCaP. Los valores de actividad internalizada específica fueron: 0.9 ± 0.1 % en las células LNCaP y 2.5 ± 1.3 % en las células MDA-PCa-2b (n = 3). Estos valores de unión e internalización celular, expresados sobre el total de actividad sembrada en el ensayo, no parecen ser muy elevados, sobre todo para las células LNCaP. Teniendo en cuenta que se trata de ensayos realizados en condiciones de exceso de radiotrazador, resulta más significativo informar la relación entre actividad específicamente unida e internalizada, sobre el total del radiotrazador que efectivamente fue captado por las células. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32, en la que se puede observar que hubo internalización celular en ambas líneas de CaP: 50.3 ± 9.8 % y 24.5 ± 2.0 % para las células LNCaP y MDA-PCa-2b respectivamente (n = 3). Esto reafirma la hipótesis de que el PSMA, luego de unirse a su ligando, es endocitado por la célula. [97] La internalización del $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ refleja la alta especificidad de unión del radiotrazador al PSMA, su mecanismo de interacción y posibilita una mejor calidad de la imagen PET, con menor ruido de fondo.

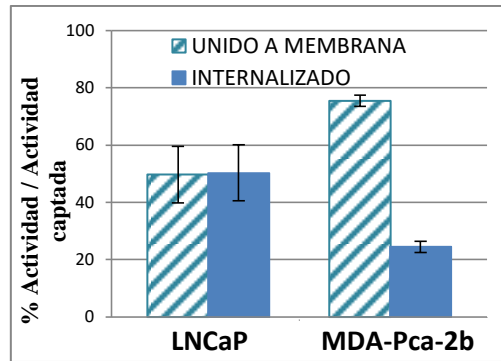


Figura 32- Porcentaje de actividad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, específicamente unida a membrana o la internalizada, en células LNCaP y MDA-PCa-2b. Los resultados se expresan en función de la actividad captada, como promedio \pm DS de 3 experimentos independientes ($n=3$).

4.3.2) Evaluación del comportamiento de los diastereómeros de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en cultivos celulares de CaP

Con el fin de evaluar si la presencia del diastereómero menos estable (D2) de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, tiene una influencia negativa en la captación celular, se planificaron ensayos de unión e internalización en células LNCaP. Para ello, se utilizó el radiotrazador obtenido mediante incubación a T.A, con una relación $D1/D2 = 2.0$. Ante la falta de estabilidad del mismo en buffer fosfato (ya discutida en el punto 3.3.2), se evitó el uso de medio de cultivo (RPMI) y buffer de ensayo, debido a su alto contenido de grupos fosfatos. En su lugar, se utilizó suero fisiológico. En un ensayo previo, se colocaron células LNCaP en placas adherentes, y se incubaron a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en suero fisiológico, durante 3 horas. Las células se observaron al microscopio cada 30 minutos, para evaluar si se mantenían adheridas en la superficie de la placa, o si se desprendían. Como resultado, se evidenció el desprendimiento celular recién a las 2 horas post-incubación. Esta primera observación, permitió planificar la realización de ensayos de unión e internalización celular de la mezcla de diastereómeros, obtenida por incubación a T.A, en células LNCaP a 60 minutos de incubación.

El radiotrazador $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ obtenido, que contenía la mezcla de diastereómeros en relación $D1/D2 = 2.0$, se llevó a $\text{pH} = 7$ con el agregado de NaOH 0.1 M, para frenar la interconversión de D2 en D1. Luego, se realizaron ensayos de unión e internalización celular, para evaluar si una mayor proporción del diastereómero D2, influenciaría o no la especificidad de unión al receptor. Se obtuvo un porcentaje de actividad unida a la membrana celular de 0.50 % para los pozos no bloqueados y de 0.10 % para los pozos con bloqueo, con respecto a la actividad total empleada por pozo

(300.000 células/pozo). Los valores que se obtuvieron con el radiotrazador sintetizado mediante incubación a 100 °C ($D1/D2 = 25$) fueron: $1.02 \pm 0.29 \%$ y $0.13 \pm 0.06 \%$, para los pozos sin bloqueo y bloqueados respectivamente. Según estos datos, hubo menor porcentaje de radiotrazador unido específicamente a la membrana cuando se utilizó el radiotrazador en relación $D1/D2 = 2.0$. Los valores de actividad internalizada específica fueron $0.9 \pm 0.1 \%$ para una relación $D1/D2 = 25$, y 0.77% para la mezcla de diastereómeros en relación $D1/D2 = 2.0$. Al parecer, en ambos casos se logra la internalización. Para comparar mejor los resultados, se presenta la figura 33, en la cual se muestra el porcentaje relativo de unión e internalización celular específica del radiotrazador, teniendo en cuenta solamente la actividad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ captada por las células. Tal como se observa en dicha figura, los porcentajes de unión e internalización celular son algo distintos. Al parecer hubo mayor internalización del radiotrazador en el ensayo realizado con la mezcla de diastereómeros en relación $D1/D2 = 2.0$ obtenida por incubación a T.A (65.4%), en comparación con la mezcla de relación $D1/D2 = 25$ (50.3%). Es decir, que el equilibrio entre la fracción unida a la membrana y la fracción internalizada, se desplazó más hacia la internalización del radiotrazador en el primer caso.

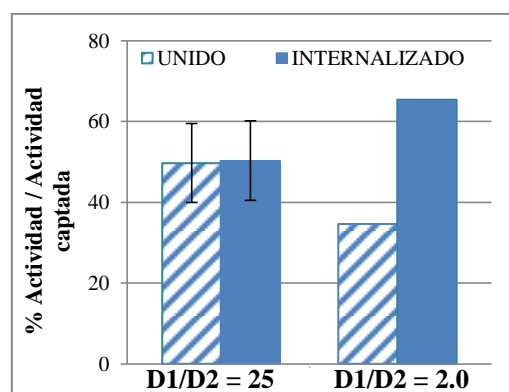


Figura 33- Porcentaje de actividad de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, específicamente unida o internalizada, en células LNCaP. Se muestran los valores obtenidos para dos proporciones distintas de diastereómeros.

Estos datos no son suficientes para sacar mayores conclusiones, ya que solo fue posible realizar un ensayo. En los restantes ensayos, se observó pérdida de acúmulos celulares durante la incubación con el radiotrazador y en la etapa de incubación en buffer glicina, por lo cual serían necesarios más ensayos para obtener datos más significativos. El desprendimiento de las células de la superficie de la placa, podría explicarse por la falta de nutrientes y factores de crecimiento que normalmente proporcionaría el medio de cultivo. Si bien se intentó reemplazar el RPMI por un medio

isotónico, no se incorporó ningún nutriente para las células, por lo cual no se encontraron en óptimas condiciones durante los ensayos.

4.3.3) Determinación de IC₅₀

Por ser el PSMA una enzima que se encuentra en las membranas celulares, para la determinación de los valores de IC₅₀ de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en células LNCaP y MDA-PCa-2b, se utilizaron concentrados de membranas de dichas células, obtenidas mediante centrifugaciones repetidas de las mismas. Las membranas fueron incubadas con una concentración fija de radiotrazador y concentraciones crecientes de ligando frío. Los datos se analizaron mediante una regresión no lineal, utilizando el software Graphpad Prism, que permitió obtener los perfiles que se muestran en la figura 34. Dichas curvas grafican el porcentaje de actividad unida a las membranas, en función de la concentración del precursor, que compite por los mismos sitios de unión. Se puede observar que existe desplazamiento específico del radiotrazador por el competidor, lo cual confirma la afinidad del ligando por el receptor.

El valor de IC₅₀ para el radiotrazador en estudio, obtenido con la línea celular LNCaP, fue de 25.3 ± 1.2 nM ($R^2 = 0.99$). Dicho dato está en concordancia con los hallados en bibliografía: 24.8 ± 1.2 nM [82] y 34.3 ± 4.1 nM [98].

Para la línea celular MDA-PCa-2b, el valor obtenido de IC₅₀ fue 29.0 ± 1.7 nM ($R^2 = 0.83$). Dicho valor es del orden nanomolar, al igual que el obtenido con la línea celular LNCaP. No existen datos bibliográficos para esta línea celular, pero podría concluirse que los valores son consistentes con una muy buena unión del radiotrazador a las membranas celulares, al igual que para la línea LNCaP. Se trata de un ligando con alta afinidad por el PSMA.

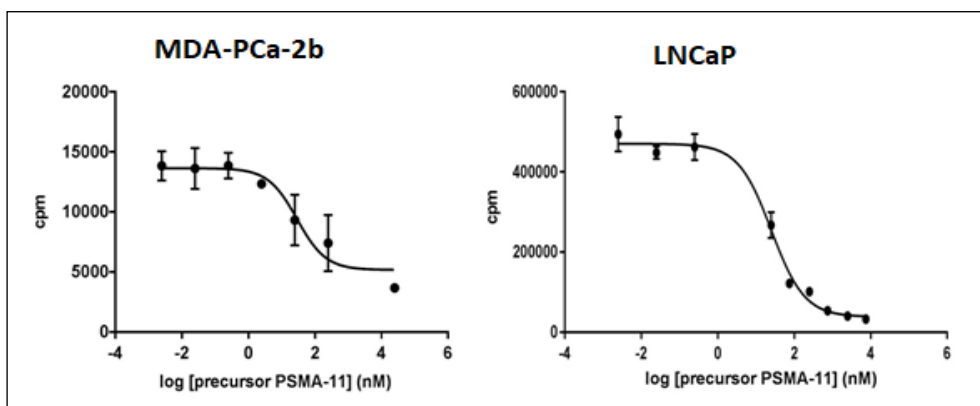


Figura 34- Curvas de actividad de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 unido a membranas celulares en función de la concentración de ligando frío, para células MDA-PCa-2b (izquierda) y LNCaP (derecha).

4.4) Conclusiones

Los ensayos de unión e internalización de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en las líneas celulares LNCaP y MDA-PCa-2b, que expresan el receptor PSMA, dieron como resultado una adecuada unión específica del radiotrazador en ambos casos. A los 60 minutos de incubación, tiempo razonable para la realización de estudios PET con ⁶⁸Ga, la unión específica fue de 0.9 ± 0.3 % en células LNCaP, y más elevada aún para las células MDA-PCa-2b: 7.5 ± 3.7 %. Se demostró captación específica del radiotrazador en dos modelos tumorales de CaP humano andrógeno-dependientes. En ambos modelos se estableció el ingreso del radiotrazador en las células, que resultó mayor para la línea celular LNCaP: aproximadamente un 50 % de la actividad se internalizó a los 60 minutos de incubación. El hecho de que el radiotrazador pueda introducirse en las células mediante un mecanismo receptor-específico, resulta de gran importancia en un enfoque diagnótico-terapéutico.

Si bien no fue posible cuantificar con exactitud la unión e internalización celular del diastereómero menos estable de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (referido como D2), al realizar ensayos en células LNCaP con una mezcla de ellos en relación D1/D2 = 2.0, se obtuvieron resultados preliminares similares a los obtenidos con la mezcla de relación D1/D2 = 25. Se requieren mayor número de ensayos para poder concluir con seguridad, aunque al parecer, un mayor porcentaje del diastereómero D2 no estaría afectando negativamente la unión del radiotrazador a su receptor.

Para cuantificar de manera más general la afinidad del [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 por su receptor, se determinó el valor de IC₅₀ en ambas líneas celulares que expresan el receptor. Dichos valores fueron concordantes con los reportados anteriormente en bibliografía para la línea celular LNCaP, mientras que en el caso de las MDA-PCa-2b, constituye un nuevo aporte.

Se establecieron las líneas celulares LNCaP y MDA-PCa-2b como candidatas para desarrollar modelos tumorales de CaP en animales de experimentación.

5. CAPÍTULO 4: Evaluación *in vivo* de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

5.1) Introducción

5.1.1) Modelos xenográficos de CaP en animales de experimentación

Los modelos animales han sido fundamentales para dilucidar distintos procesos bioquímicos y fisiológicos en oncología. Los animales de experimentación se utilizan como modelos que se asemejan a la oncológica en la evaluación de nuevos medicamentos contra el cáncer, incluidos los radiofármacos. Los estudios en animales pueden proporcionar datos farmacológicos y toxicológicos que ayudan a predecir la eficacia clínica de nuevos compuestos. Además, al trabajar con animales de experimentación, se pueden manipular las condiciones ambientales y genéticas, lo cual resultaría imposible en humanos. En general, para la mayoría de las investigaciones, se elige trabajar con ratones, ya que son pequeños, de fácil manipulación y rápida reproducción, además de compartir al menos un 95% de homología a nivel genómico con los humanos. [99] El pequeño tamaño del ratón tiene implicaciones importantes para los estudios de imagen y terapia con radionucleidos. Una limitación es el volumen máximo a inyectar con seguridad, que en un ratón adulto es de 0,2 mL. Debido a esto, la concentración de actividad y la actividad específica del radiotrazador deberían ser elevadas, especialmente cuando el proceso a estudiar implica la unión a un receptor que puede saturarse.

Existen cepas de ratones modificados genéticamente que presentan un sistema inmune deprimido, en las cuales resulta favorable el desarrollo de tumores, por lo que suelen utilizarse en el estudio de nuevos radiotrazadores para CaP. En vista de su inmunodeficiencia, estos animales son susceptibles a las infecciones y deben alojarse en un entorno libre de microorganismos.

Cabe señalar que existen marcadas diferencias entre la próstata humana y la de los roedores que se utilizan como modelos experimentales. La glándula prostática humana es monolobular y produce grandes cantidades de proteínas, como PSA, PAP y PSMA. Sin embargo, la próstata del ratón es multilobulada y no expresa PSMA. El desarrollo del CaP es común en humanos, pero es raro en otras especies de mamíferos, con la excepción de los perros. [100] Por lo tanto, la próstata del ratón no se puede considerar un buen modelo para el estudio de aquellos aspectos funcionales de la próstata que difieren significativamente en humanos, como la expresión de PSMA. Para ello, la opción más práctica es la obtención de tumores xenográficos, es decir, la

implantación subcutánea de las células tumorales en un sitio específico del animal, por ejemplo, en la zona del músculo deltoides. Que el tumor se encuentre en una zona fácilmente visible, es una buena estrategia a la hora de monitorear la aparición y crecimiento del mismo.

Sin embargo, deben reconocerse una serie de desventajas de los tumores xenográficos, dado que crecen en un sitio no natural. Si bien las células tumorales son humanas (por lo que expresan el homólogo humano de la molécula target), el tumor es irrigado por la neovascularización sanguínea del huésped, que es murino. Por otra parte, al tratarse de un tumor subcutáneo, la enfermedad metastásica (que resulta ser el aspecto más letal del CaP), es muy poco frecuente. [101-102]

5.1.2) Técnicas de evaluación biológica de radiotrazadores

La imagenología molecular PET/CT resulta una herramienta de seguimiento rápido y eficaz de la cinética *in vivo* de nuevos radiotrazadores PET. Para obtener las imágenes PET/CT, luego de que se ha administrado el radiotrazador al animal, se requiere del empleo de una cámara micro PET/CT para pequeños animales. El funcionamiento de esta cámara se basa en el mismo fundamento que la empleada para pacientes, descrita anteriormente. Sin embargo, este equipo cuenta con un anillo detector más pequeño, lo que permite que los cristales detectores sean de menor tamaño y se mejore así la eficiencia de detección geométrica del sistema, dado que también disminuye la distancia entre el cristal y el ratón. El estudio PET/CT con estos equipos proporciona información morfológica y metabólica cuantitativa en modelos animales con alta sensibilidad, especificidad y mayor resolución espacial. La cámara permite realizar estudios estáticos y dinámicos, con capacidad de fusión de imágenes y de cuantificación.

Como complemento a las técnicas imagenológicas, la biodistribución es una técnica *in vivo* que implica el sacrificio del animal luego de un tiempo preestablecido post-administración del radiotrazador. A continuación, se realiza la disección de los órganos y tejidos de interés a fin de medir la actividad acumulada en cada muestra. Los datos de biodistribución permiten definir las principales vías metabólicas y de eliminación del radiotrazador, cuantificar la actividad captada por el tumor y establecer si existe captación inespecífica en otros órganos.

En el presente capítulo se presenta el desarrollo y optimización de dos modelos animales de CaP, generados a partir de la inoculación de las líneas celulares LNCaP y MDA-PCa-2b en ratones Nude. Además, se discuten los estudios de biodistribución de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 realizados en un modelo de ratones sanos y en el modelo de tumor xenográfico LNCaP. Con el fin de evaluar la captación tumoral del radiotrazador, se realizaron estudios de imagenología molecular PET/CT en ambos modelos tumorales. Además, se estudió el efecto de la actividad específica del radiotrazador y de la relación de diastereómeros en la captación tumoral *in vivo*.

5.2) Parte experimental

5.2.1) Materiales y Equipos

Para las marcaciones y el control de calidad de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 se utilizaron los mismos reactivos detallados en el punto 3.2.1. En las mediciones de actividad se emplearon una cámara de ionización (Capintec® CRC 25R) y un espectrómetro de centelleo sólido con cristal de NaI (Tl) de 3 x 3 pulgadas de pozo, acoplado a un sistema analizador multicanal ORTEC®.

Los ratones que se emplearon fueron machos Swiss y Nude N: NIH (S) - Foxn 1^{nu}, provenientes del bioterio del CUDIM. Para el desarrollo de los modelos murinos de tumor xenográfico de CaP humano, se adquirieron las líneas celulares LNCaP (ATCC®CRL-1740TM) y MDA-PCa-2b (ATCC® CRL-2422TM) en American Type Culture Collection Cell. Los estudios de imagenología molecular se realizaron empleando una cámara trimodal PET/SPECT/CT para pequeños animales (TriumphTM, 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).

5.2.2) Métodos

5.2.2.1) Animales de experimentación y líneas celulares

Para los estudios biológicos *in vivo* se utilizaron ratones machos Swiss (cepa base) como modelo de control sano, y Nude, para generar los modelos de tumor xenográfico de CaP. Los animales fueron mantenidos de a pares en racks con aire filtrado, bajo condiciones controladas de humedad (40 – 60 %) y temperatura (24 ± 1

°C). Fueron sometidos a ciclos de luz / oscuridad de 14:10 horas en el bioterio del CUDIM, con comida y agua *ad libitum*.

Las líneas celulares de CaP humano LNCaP y MDA-PCa-2b, se cultivaron y mantuvieron según lo descrito en el punto 4.2.2.1, hasta 80% de confluencia bajo atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ a 37 °C.

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 No. 18.611. A su vez, dichos protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética del CUDIM (No. 15101601 y No. 16102001).

5.2.2.2) Desarrollo de los modelos tumorales

Con el fin de realizar los ensayos biológicos, se desarrollaron dos modelos tumorales murinos de CaP. Para ello, se utilizaron ratones inmunodeprimidos Nude machos, de 8 - 12 semanas de edad, a los cuales se les inocularon 5×10^6 células LNCaP (n = 24) o 4×10^6 células MDA-PCa-2b (n = 4), vía subcutánea en la zona del deltoides izquierdo. Se estimuló el crecimiento tumoral mediante la aplicación tópica diaria de testosterona en gel (Androgel, Servimedica). [105] Los tumores fueron medidos en dos dimensiones empleando un calibre, dos veces por semana. Los volúmenes tumorales se calcularon como: $V = \text{diámetro menor}^2 \times \text{diámetro mayor} \times \pi/6$

5.2.2.3) Estudios de biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en animales sanos y con tumor

Se realizaron estudios de biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en ratones Swiss sanos (grupo control) y en ratones Nude con tumor xenográfico de CaP, generado mediante inoculación de células LNCaP. Para ello, se inyectó una solución del radiotrazador (10.6 ± 2.2 MBq) por vía intravenosa (iv) en el grupo control (13 semanas de edad, 40 ± 7 gramos) y en los ratones portadores de tumor (19 ± 5 semanas de edad, 29 ± 3 gramos), a través de la vena dorsal de la cola. El [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 fue sintetizado según el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.1, y el pH de la solución final se ajustó con buffer fosfato 0.5 M, hasta pH = 6 – 7. Luego, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a los 15, 30 y 60 minutos post-inyección para los animales del grupo control, y a los 30 y 70 minutos en el caso del modelo tumoral.

Diferentes órganos y tejidos fueron extraídos (sangre, hígado, vesícula, corazón, pulmones, bazo, riñones, músculo, hueso, estómago, tracto gastrointestinal, vejiga y orina). En el caso del modelo tumoral, el tumor también fue extirpado. Los mismos fueron pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. Se realizaron las correcciones por geometría y decaimiento y se determinó el porcentaje de actividad total en cada órgano (% DI) y los porcentajes de dosis por gramo de órgano (% DI/g), para establecer el comportamiento del radiotrazador. Además, para los ratones con tumor, se calculó la relación de captación entre tumor y músculo, este último considerado como tejido no tumoral (relación T/NT: Tumor/No Tumor).

5.2.2.4) Estudios *in vivo* de imagenología molecular PET/CT con [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

A los ratones a los cuales se les indujo tumor según lo descrito en el punto 5.2.2.2, se les realizaron estudios de imagenología molecular PET/CT con [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, en la cámara micro PET/SPECT/CT para pequeños animales. Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2 % en flujo de oxígeno (2 L/min) y fueron inyectados con el radiotrazador bajo cámara por vía iv (18.1 ± 6.3 MBq), en la vena dorsal de la cola. El [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 fue sintetizado según el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.1, y el pH de la solución final se ajustó con buffer fosfato 0.5 M, hasta pH = 6 – 7.

La adquisición de imágenes fue realizada en modo dinámico, comenzando a t=0 post-administración del radiotrazador y durante 60 minutos (1 frame × 5 minutos, 1 frame × 15 minutos, 2 frames × 20 minutos). El análisis por CT se realizó durante 1.98 minutos. El procesamiento y análisis semi-cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo con el software PMOD, v.3.4. Los estudios PET fueron co-registrados con el correspondiente CT para asegurar la localización anatómica. Las imágenes se muestran como cortes coronales, sagitales y axiales. Se construyeron Volúmenes de Interés (VOIs) de forma manual sobre las imágenes del tumor y músculo contralateral, a fin de generar curvas actividad / tiempo y calcular la relación T/NT. La concentración de actividad dentro de cada VOI fue expresada como Hot Spot Average 5 (promedio de los 5 puntos más activos en kBq/cc).

5.2.2.5) Evaluación del comportamiento *in vivo* de los diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo animal de CaP

Para estudiar el efecto de los diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en la captación tumoral, se realizaron marcaciones bajo distintas condiciones de incubación, a fin de obtener una relación D1/D2 = 25 o 2, de acuerdo a lo discutido previamente en el punto 3.3.2. El pH de la solución final se ajustó con buffer fosfato 0.5 M, hasta pH = 6 – 7. En el caso del radiotrazador obtenido mediante incubación a T.A (Aesp = 21.4 ± 1.3 MBq/nmol), dicho ajuste se realizó con NaOH 0.1 M. La administración del radiotrazador se realizó como se describe en el punto 5.2.2.4, en los ratones inoculados con células LNCaP. Estos estudios se realizaron en días consecutivos cuando fue posible, de modo que el tamaño tumoral no fuera una variable y los receptores estuvieran disponibles en igual medida. La adquisición y posterior procesamiento de las imágenes se realizó según lo descrito en el punto 5.2.2.4.

5.2.2.6) Evaluación del efecto de la actividad específica de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en estudios imagenológicos PET/CT en un modelo animal de CaP

Con el fin de evaluar el efecto de la actividad específica de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en la captación tumoral, se adquirieron imágenes PET/CT en los ratones inoculados con células LNCaP. Para ello, se realizaron distintas marcaciones, según el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.1, de manera de obtener marcados con elevada actividad específica (153 ± 46 MBq/nmol) y baja actividad específica (18.9 ± 4.0 MBq/nmol). Se adquirieron las imágenes en días consecutivos cuando fue posible, de modo que el tamaño tumoral no fuera una variable y los receptores estuvieran disponibles en igual medida. La adquisición y posterior procesamiento de dichas imágenes se realizó según lo descrito en el punto 5.2.2.4.

5.2.2.7) Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como: promedio ± 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%.

5.3) Resultados y Discusión

5.3.1) Puesta a punto de dos modelos animales de CaP

Como ya se mencionó anteriormente, al momento de comenzar con las etapas preclínicas, no existía experiencia previa en CUDIM en cuanto al desarrollo de tumores con las células LNCaP y MDA-PCa-2b. Por tal motivo, se decidió realizar en primera instancia una prueba piloto, con un bajo número de animales. Se inocularon 6 ratones con células LNCaP, de los cuales dos animales fueron inoculados en ambos deltoides (en total se realizaron 8 inoculaciones, 5×10^6 células / inóculo). A su vez, se realizó la inoculación de 4 ratones con células MDA-PCa-2b, dos de ellos en ambos deltoides (en total se realizaron 6 inoculaciones, 4×10^6 células / inóculo). El motivo de realizar más de una inoculación por ratón, fue el de aumentar las posibilidades de desarrollo tumoral, con un bajo número de animales. Por tal motivo, si bien se adquirieron imágenes PET/CT con el radiotrazador en estudio, éstas sólo se analizaron con el fin de optimizar los tiempos de adquisición de las mismas y evaluar si hubo captación tumoral. De hecho, para calcular la relación T/NT, se evaluó la relación entre el tumor y una zona contralateral no comprometida con la otra inoculación (en los casos en que se había inoculado en ambos lados). En todos los casos, se comprobó un patrón de tejido tumoral mediante anatomía patológica.

Todos los ratones inoculados con células MDA-PCa-2b generaron tumor: se desarrollaron 4 tumores de los 6 posibles (67 % de éxito). Por otro lado, en los ratones inoculados con células LNCaP, solamente se generaron 4 tumores, de los 8 posibles (50 % de éxito). Los tumores en los ratones inoculados con MDA-PCa-2b, aparecieron a las 6 semanas post-inoculación, mientras que los de LNCaP a las 4 semanas. Los dos ratones que no presentaron indicios tumorales se sacrificaron transcurridas 9 semanas desde la inoculación.

Como resultado de esta prueba piloto, se lograron obtener modelos de tumor xenográfico de CaP con ambas líneas celulares. En el caso de las células LNCaP, a pesar de tener menor porcentaje de éxito que con las MDA-PCa-2b, los tumores se desarrollaron en menor tiempo y fueron más homogéneos. Los tumores resultantes en los ratones inoculados con células MDA-PCa-2b, fueron multilobulares y blanquecinos, mientras que los generados con células LNCaP resultaron compactos, muy vascularizados y más homogéneos entre sí. Es por dichos motivos que para continuar con los estudios, se eligió inocular los ratones con células LNCaP, cuyo cultivo y

reproducción, además, es más sencillo y menos costoso que el cultivo de las células MDA-PCa-2b.

A su vez, la realización de esta prueba piloto permitió optimizar los tiempos de adquisición de las imágenes PET y determinar que en los próximos estudios, la administración del radiotrazador a los animales se realizara sin anestesia, de modo de incrementar el éxito en las inyecciones. La administración del radiotrazador a los animales anestesiados bajo cámara, implicó un alto porcentaje de inyecciones infiltradas, lo que repercutió en la calidad de las imágenes, ya que el radiotrazador se biodistribuye más lentamente cuando se infiltra. Por tal motivo, se decidió que en los siguientes estudios, los animales se inyectaran e inmediatamente se anestesiaran y posicionaran en la micro cámara PET/CT. Dicho procedimiento se realizó en menos de 5 minutos, por lo cual, se comenzó la adquisición de las imágenes 5 minutos post-administración del radiotrazador, obteniendo 3 de los 4 frames previstos inicialmente. De todas maneras, el primer frame de 5 minutos, no resulta relevante a los efectos de calcular relaciones T/NT, ya que en dicho tiempo el radiotrazador se encuentra principalmente en sangre.

En una segunda etapa de investigación, se inocularon otros 18 ratones con células LNCaP, a razón de una inoculación por animal. De estos nuevos ratones inoculados, un 67 % generó tumor subcutáneo (12/18), y uno de ellos presentó un tumor interno no visible (6 %). A su vez, en dos de estos ratones (11 %), el tumor creció hasta determinado punto y luego se reabsorbió, por lo cual al momento de la disección, no fue posible extirpar ningún tumor. Los ratones que no generaron tumor, se sacrificaron a las 17-18 semanas post-inoculación.

A los ratones que desarrollaron efectivamente un tumor, se les realizó el seguimiento mediante medida del tamaño tumoral con calibre, además de la imagenología molecular PET/CT con [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. Dichos tumores presentaron diferentes evoluciones entre sí, en cuanto a su velocidad de crecimiento y al momento de aparición, que se determinó mediante observación de una mancha oscura de pequeño tamaño en la zona de inoculación. La mayoría de los tumores se evidenciaron entre las 4 y 7 semanas post-inoculación (75 %), pero hubieron tres tumores de aparición más tardía, entre las 10 y 16 semanas post-inoculación. A su vez, la velocidad de crecimiento de los tumores no fue homogénea, tal como se puede observar en la figura 35, en la que se representa el volumen de los tumores en función de los días de crecimiento de los mismos.

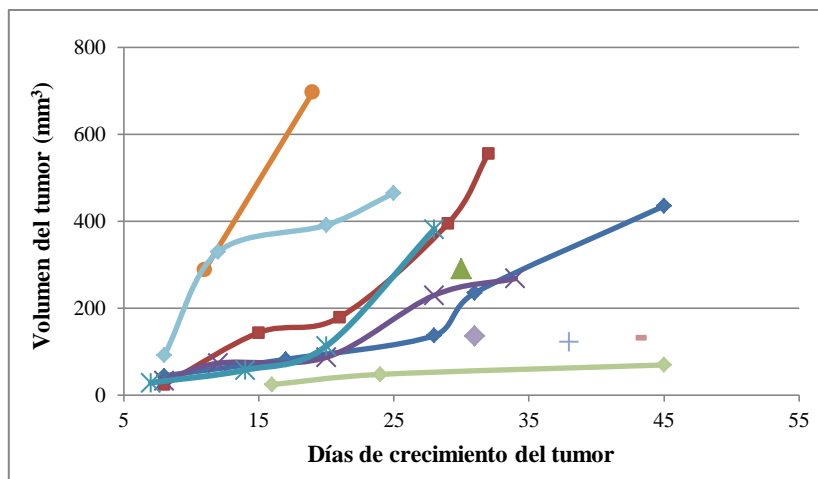


Figura 35- Variación del volumen tumoral en función del tiempo, para el modelo de tumor xenográfico LNCaP.

5.3.2) Estudios de biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en animales sanos

Se realizó una evaluación inicial del radiotrazador en ratones normales, mediante biodistribuciones a distintos tiempos post-administración de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. En la figura 36 se grafican los valores de % DI para los órganos relacionados a las principales vías de eliminación. Se observa que la vía de eliminación principal del radiotrazador es la vía urinaria, dada la alta captación de actividad en riñones y vejiga + orina, que a los 60 minutos post-inyección alcanzan valores de 40.3 ± 7.8 % DI y 43.7 ± 10.4 % DI respectivamente. Cabe aclarar que parte de la captación en riñones podría ser debida a la expresión fisiológica normal de receptores de PSMA en riñones. La acumulación del radiotrazador en vejiga podría llegar a comprometer la calidad de las imágenes, debido a que una alta concentración de actividad en ese órgano puede interferir con el correcto reconocimiento de la captación a nivel de la próstata o sus alrededores. Sin embargo, el radiotrazador presenta una rápida eliminación, por lo cual la realización de adquisiciones tardías y el vaciamiento de la vejiga por parte del paciente, previamente a la adquisición de imágenes, podría constituir una alternativa para subsanar este posible inconveniente.

La captación en hígado e intestino es muy baja, siendo de 0.42 ± 0.05 % DI y 1.21 ± 0.21 % DI respectivamente, a los 60 minutos post-inyección del radiotrazador. Estos valores de captación de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en intestino, difieren de la captación observada en humanos, donde está reportada la captación fisiológica de dicho radiotrazador en intestino delgado. [51]

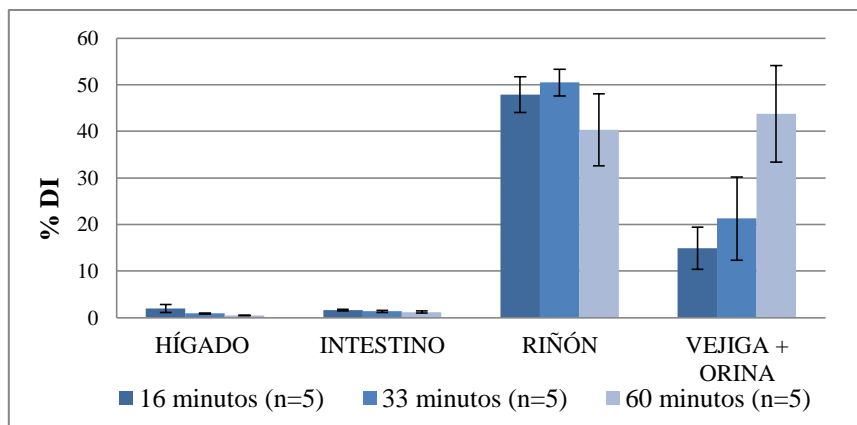


Figura 36- Perfil de eliminación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en ratones normales, basado en estudios de biodistribución

En la tabla 9 se muestra la captación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ como porcentaje de dosis por gramo de órgano, respecto a la dosis total inyectada (% DI/g). Se evidencia una rápida y sostenida depuración sanguínea, siendo bajos los valores de actividad en sangre: 2.65 ± 0.82 % DI/g a los 16 min, 1.48 ± 0.27 % DI/g a los 33 min y 0.95 ± 0.50 % DI/g a los 60 min post-administración del radiotrazador. Estos valores confirman la estabilidad del complejo frente a la posible descomposición debida a radiolisis, formación de especies coloidales o bien, liberación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, ya que el perfil de distribución para el ^{68}Ga libre presenta máxima captación en sangre a los 60 min y una eventual acumulación en órganos tales como hígado, riñón, bazo y hueso, requiere 24 h [13].

Tabla 9- Biodistribución de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en ratones normales

Captación de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ ^[a]			
Órgano o tejido	16 min	33 min	60 min
Sangre	2.65 ± 0.82	1.48 ± 0.27	0.95 ± 0.50
Hígado	1.04 ± 0.40	0.37 ± 0.05	0.21 ± 0.02
Vesícula	5.76 ± 1.87	6.85 ± 4.54	3.16 ± 2.10
Corazón	0.83 ± 0.24	0.29 ± 0.06	0.24 ± 0.10
Pulmón	2.08 ± 0.33	1.31 ± 0.17	0.77 ± 0.19
Bazo	7.59 ± 1.88	5.81 ± 0.89	5.10 ± 0.63
Riñón	83.03 ± 6.23	78.10 ± 8.27	62.57 ± 10.12
Músculo	0.38 ± 0.06	0.20 ± 0.05	0.10 ± 0.02
Hueso	0.43 ± 0.10	0.18 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Estómago	0.71 ± 0.29	0.55 ± 0.31	0.27 ± 0.22
Intestino	0.70 ± 0.09	0.52 ± 0.20	0.43 ± 0.09

^[a] Los resultados se expresaron como el promedio del % DI/g \pm DS

5.3.3) Estudios de biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo animal de CaP

Para evaluar la captación tumoral del radiotrazador en un modelo animal de cáncer de próstata, se realizaron estudios de biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en los ratones con tumor LNCaP. Las biodistribuciones se realizaron a distintos tiempos post-administración del radiotrazador: 30 ± 2 minutos (n = 6) y al finalizar la adquisición de las imágenes PET/CT, 71 ± 6 minutos (n = 4). En este modelo, se observó el mismo patrón de biodistribución que el obtenido en el grupo control. Se obtuvo un perfil de eliminación urinario, al igual que el obtenido en los ratones normales, además de una rápida depuración sanguínea. La mayor captación se detectó a nivel de los riñones, presentando valores que no tuvieron variación con el tiempo: 62.35 ± 6.22 % DI a los 30 minutos post-inyección y 62.08 ± 5.26 % DI a los 71 minutos.

Este comportamiento es favorable para un radiofármaco de diagnóstico, ya que se espera que el mismo permanezca en el cuerpo solamente por el tiempo necesario para realizar el estudio, y que no presente captaciones en órganos no deseados (lo que aseguraría una baja dosis de irradiación). Por otra parte, la baja captación de fondo, permitiría generar una relación T/NT adecuada y una mejor calidad de la imagen PET.

Tabla 10- Biodistribución de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 en modelo xenográfico de CaP (LNCaP)

Captación de [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11 ^[a]		
Órgano o tejido	30 min ^[b]	71 min ^[c]
Sangre	1.72 ± 0.40	2.41 ± 1.28
Hígado	0.56 ± 0.17	0.80 ± 0.31
Vesícula	1.68 ± 0.64	3.47 ± 1.79
Corazón	0.60 ± 0.28	1.08 ± 0.54
Pulmón	2.44 ± 0.53	2.99 ± 0.74
Bazo	15.95 ± 5.60	24.26 ± 7.38
Riñón	109.39 ± 27.93	129.34 ± 20.98
Músculo	0.38 ± 0.16	0.43 ± 0.10
Hueso	0.49 ± 0.30	0.41 ± 0.11
Estómago	0.38 ± 0.16	0.28 ± 0.13
Intestino	0.42 ± 0.15	0.48 ± 0.20
Tumor	5.52 ± 1.62	5.09 ± 1.16

^[a] Los resultados se expresaron como el promedio del % DI/g ± DS; ^[b]n = 6; ^[c]n = 4

Comparando los valores de % DI/g para el tumor y el músculo, tomado como órgano sano de referencia, la acumulación de actividad en el tumor fue significativamente mayor que la captación en músculo, para ambos tiempos analizados ($p < 0.05$) (tabla 10 y figura 37). Con dichos valores, se calculó la relación T/NT (tumor/músculo), que resultó 15.51 ± 5.21 a los 30 minutos y 12.02 ± 2.09 a los 71 minutos post-inyección del radiotrazador. Si se comparan estos valores con los únicos que se disponen para [^{11}C]colina en ratones inoculados con células LNCaP: a $t = 30$ min post-inyección, % DI/g = 1.4 % en tumor y T/NT = 1.2 [103], los valores obtenidos para [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 resultan ser notoriamente superiores.

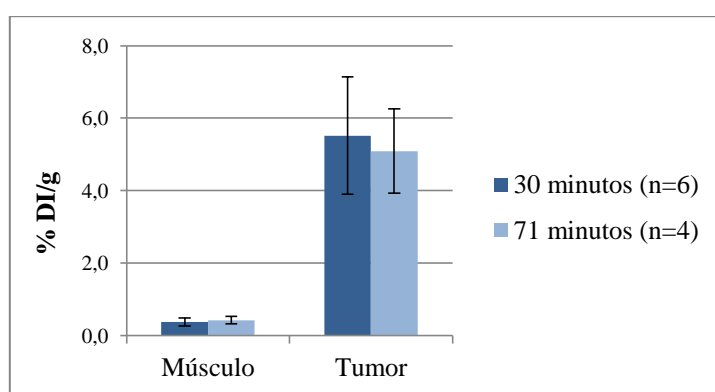


Figura 37- Evolución del % DI/g en función del tiempo post-inyección de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, para músculo y tumor, datos obtenidos de biodistribuciones de ratones con tumor xenográfico LNCaP.

5.3.4) Estudios *in vivo* de imagenología molecular PET/CT con [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en modelo tumoral de CaP

Se realizaron estudios de imagenología molecular PET/CT en los ratones inoculados con células LNCaP, a los que se les administró el radiotrazador [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 vía iv. La captación del radiotrazador en el tumor se comparó con la obtenida a nivel del músculo (tejido de referencia), mediante el cálculo de la relación T/NT, que se realizó utilizando el software PMOD. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

5.3.4.1) Seguimiento del tamaño tumoral

Como se discutió en el punto 5.3.1, los tumores obtenidos en los ratones inoculados con células LNCaP, presentaron diferentes velocidades de crecimiento, por lo cual, resultó interesante el seguimiento semanal de dichos tumores mediante imagenología PET/CT con [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 ($A_{\text{esp}} = 143,3 \pm 39,4$ MBq/nmol). Los

valores de T/NT, calculados a partir del procesamiento de dichas imágenes, en función de las semanas de crecimiento tumoral y a distintos tiempos de adquisición, se representan en la figura 38. En términos generales, se observa un incremento de la relación T/NT en función del tiempo de adquisición (post-inyección del radiotrazador), para todas las etapas de crecimiento tumoral. Dicho aumento de la relación T/NT es debido a un incremento notorio de la concentración de actividad en el tumor, en relación al leve aumento de la captación a nivel del músculo. Si bien este parámetro presenta igual comportamiento para todas las etapas de desarrollo tumoral, en relación a la figura 38, podría concluirse que a medida que el tumor crece, la captación tumoral aumenta, para los tiempos de adquisición estudiados. Los valores de T/NT, van desde 2.80 ± 0.98 hasta 6.31 ± 0.43 , en las semanas 1 y 6 respectivamente, a los 60 min post-inyección de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Se estableció que el tiempo óptimo para la adquisición de imágenes, corresponde a los 60 minutos post-inyección, ya que a dicho tiempo el radiotrazador presenta la máxima acumulación en el tumor, minimizando el ruido de fondo (ver figura 39). Esta diferencia entre la captación tumoral y muscular, es esencial para lograr una detección y localización adecuada de los tejidos neoplásicos en el organismo.

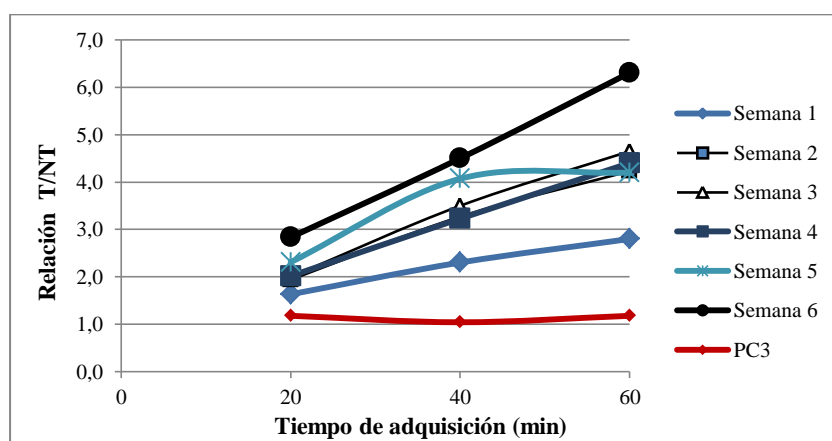


Figura 38- Valores de T/NT obtenidos para [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en función del tiempo de adquisición de la imagen PET y del crecimiento tumoral, para el modelo de tumor xenográfico LNCaP. La línea roja representa los datos obtenidos para un ratón con tumor xenográfico PC3. (n=3)

La elevada captación tumoral evidenciada en estos ensayos *in vivo*, revelan una gran afinidad del [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 por su blanco molecular, ya que la relación tumor/músculo fue muy superior a la unidad, incluso en los primeros 20 minutos de adquisición de las imágenes PET. El modelo de tumor xenográfico de CaP utilizado resultó muy útil para determinar la afinidad del radiotrazador por el tumor, aunque no contempla la eventual captación en las zonas próximas al tumor debida a la

neovasculatura tumoral. No existen reportes acerca de la expresión de PSMA en la neovasculatura de tumores sólidos en roedores, a diferencia de lo que ocurre en humanos. [51,104]

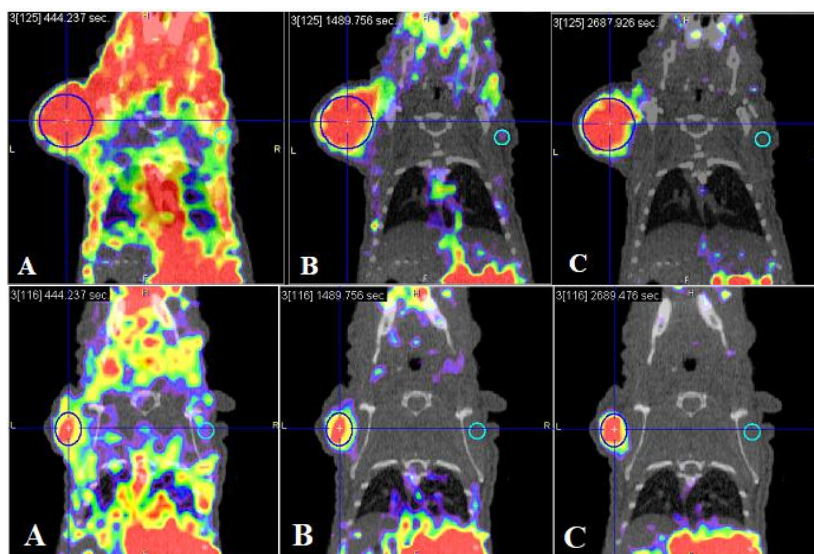


Figura 39- Ejemplo de imágenes PET/CT de ratón portador de tumor LNCaP a los 20 (A), 40 (B) y 60 (C) minutos de adquisición, post-inyección de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, para dos diferentes etapas de crecimiento tumoral. VOIs azules a nivel tumoral, VOIs celestes a nivel del músculo contralateral.

Además, como control negativo, se adquirieron imágenes PET/CT con $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ en un ratón con tumor xenográfico de CaP (cortesía de Florencia Zoppolo), generado en ratones Nude a partir de células PC3, que no expresan el receptor específico. Dichas imágenes fueron adquiridas durante tres semanas, para evaluar el radiotrazador en diferentes etapas del crecimiento tumoral. Los valores de T/NT obtenidos no variaron en función del tamaño del tumor, y fueron en promedio: 1.18 ± 0.20 , 1.04 ± 0.11 y 1.18 ± 0.23 para los 20, 40 y 60 minutos de adquisición respectivamente ($n = 3$). Estos valores son cercanos a la unidad, lo que refiere a la baja acumulación de actividad a nivel tumoral, evidenciando la falta de captación inespecífica de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$.

5.3.4.2) Evaluación del comportamiento *in vivo* de los diastereómeros de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$

Para estudiar si los diastereómeros de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, identificados como D1 y D2, presentan distintas propiedades de interacción *in vivo* con el receptor PSMA, se realizaron estudios imagenológicos con dicho radiotrazador en el modelo animal de CaP desarrollado. Para ello, se realizaron marcaciones del precursor PSMA-11, durante

5 minutos a T.A para obtener la mezcla de relación D1/D2 = 2.0, y a 100°C para obtener mayoritariamente al diastereómero D1 (relación D1/D2 = 25). Para frenar la interconversión de D2 en D1, se ajustó a pH = 7 con NaOH 0.1 M. Se adquirieron imágenes con ambos radiotrazadores y se procesaron de manera análoga al punto 5.3.4.1, para obtener los valores de T/NT en ambos casos. En la figura 40, a modo de ejemplo, se muestran las imágenes PET/CT de un ratón con tumor LNCaP al cual se le realizó el estudio con [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 obtenido mediante marcación a 100°C y a T.A, al día siguiente. En ambos casos, la actividad específica inyectada fue la misma (Aesp = 22 MBq/nmol), y la relación T/NT obtenida a los 60 minutos de adquisición, resultó muy similar: 3.65 y 3.33 respectivamente.

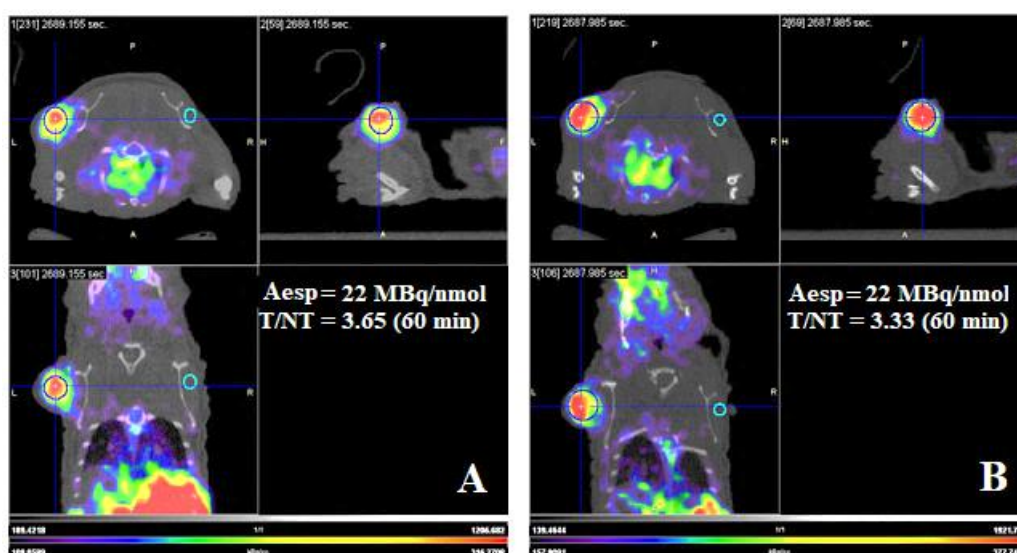


Figura 40- Ejemplo de imagen PET/CT de ratón portador de tumor LNCaP a los 60 minutos de adquisición, post-inyección de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, en relación D1/D2 = 25 (A) y D1/D2 = 2.0 (B). VOIs azules a nivel tumoral, VOIs celestes a nivel del músculo contralateral.

Se realizó la misma comparación en un total de 5 ratones, abarcando dos etapas distintas del crecimiento tumoral. Se evaluó la captación tumoral a los 60 minutos de adquisición, obtenida con el radiotrazador de relación D1/D2 = 25 (Aesp = 19.8 ± 0.3 MBq/nmol), a las 2 y 4 semanas de crecimiento del tumor, con la obtenida para la relación D1/D2 = 2.0 (Aesp = 21.4 ± 1.3 MBq/nmol) (figura 41). Si se observa dicha figura, la relación T/NT es mayor en la semana 4 de crecimiento del tumor que en la semana 2, misma tendencia ya discutida anteriormente. La relación promedio de T/NT obtenida con el radiotrazador sintetizado a 100°C (D1/D2 = 25) fue de 2.67 ± 0.04 y 3.99 ± 0.67, para la semana 2 y 4 respectivamente. En tanto, los valores de T/NT obtenidos con el radiotrazador marcado a T.A (D1/D2 = 2.0) fueron 2.80 ± 0.06 y 4.42 ± 0.26, para las mismas semanas respectivamente. Si se comparan los valores de T/NT

obtenidos dentro de la misma semana, no hay diferencias significativas entre ambas relaciones de diastereómeros ($p > 0.05$). Estos resultados, evidencian que no existe diferencia en la captación tumoral *in vivo* de los diastereómeros de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, por lo cual ambos presentarían la misma afinidad por su receptor específico.

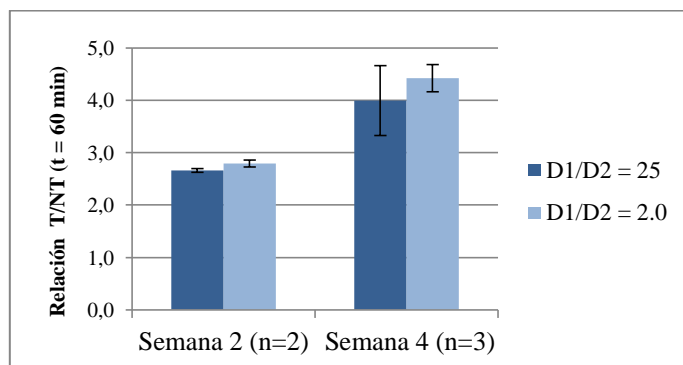


Figura 41- Relación T/NT calculada por imagenología PET/CT con [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, en ratones con tumor xenográfico LNCaP, en función de las semanas de crecimiento tumoral y de la relación de diastereómeros.

5.3.4.3) Evaluación del efecto de la actividad específica de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en estudios imagenológicos PET/CT en un modelo animal de CaP

Con la finalidad de evaluar el efecto de la Aesp en la captación tumoral *in vivo*, se llevaron a cabo estudios imagenológicos PET/CT en el modelo animal de CaP. Se realizaron distintas marcaciones, variando la masa del precursor, de manera de obtener [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 de Aesp elevada (153 ± 46 MBq/nmol) y baja (18.9 ± 4.0 MBq/nmol). Como los tumores presentaron diferente tasa de crecimiento, los estudios realizados se analizaron agrupando los ratones según el volumen de los tumores o bien, según las semanas de crecimiento de los mismos. En la figura 42 se representan los valores de T/NT obtenidos a partir de las imágenes PET/CT adquiridas con el radiotrazador de alta y baja Aesp, en función del volumen del tumor. En términos generales, se observó un incremento de la relación T/NT a medida que el volumen del tumor crece. Aunque la relación T/NT obtenida con el radiotrazador de alta Aesp es mayor a la obtenida con una baja Aesp, no se encontraron diferencias significativas entre las medias en función de los tres grupos estudiados de volumen tumoral ($p < 0.05$).

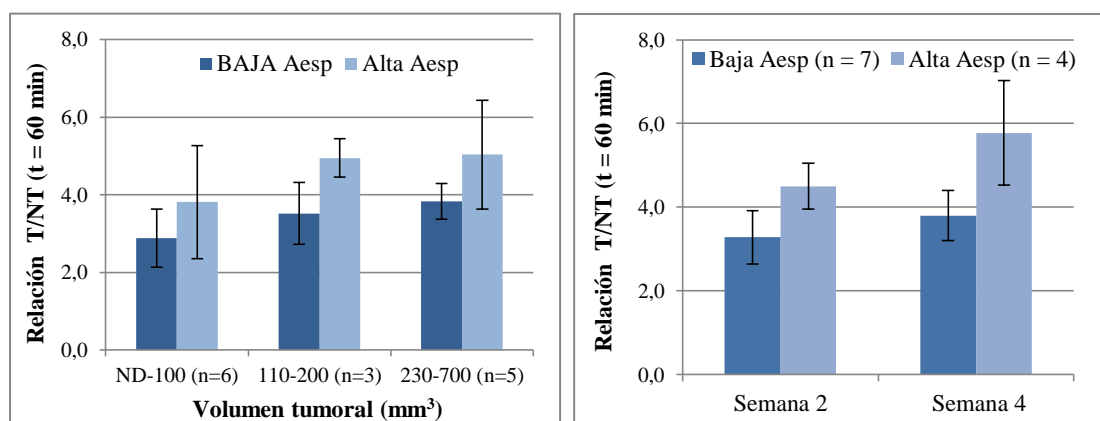


Figura 42- Relación T/NT calculada por imagenología PET/CT con [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 de baja y alta Aesp, en ratones con tumor xenográfico LNCaP, **Izquierda:** según volumen tumoral; **Derecha:** promedios tomados para las semanas 2 y 4 de crecimiento tumoral.

No obstante, se encontró mejor correlación si se observaban los valores de T/NT en función de los días de crecimiento tumoral. Si se analizan los datos para la segunda y cuarta semana de crecimiento, los valores de T/NT son del mismo orden, determinándose las siguientes relaciones T/NT: 3.28 ± 0.64 ($n = 7$) y 3.80 ± 0.59 ($n = 7$) para los marcados de baja Aesp y 4.50 ± 0.55 ($n = 4$) y 5.78 ± 1.24 ($n = 4$), para los marcados de elevada Aesp (semanas 2 y 4 respectivamente) (figura 42). Se encontró diferencia significativa entre las medias de T/NT obtenidos con marcados de baja actividad específica y los obtenidos con alta actividad específica para ambas semanas ($p < 0.05$). Estos resultados resultan muy interesantes y son totalmente novedosos, no habiendo aún publicaciones internacionales al respecto ni en modelos animales ni en pacientes. En la figura 43 se muestra a modo de ejemplo las imágenes PET/CT tomadas en un mismo ratón, en días consecutivos, con el radiotrazador de baja Aesp (22 MBq/nmol) y alta Aesp (138 MBq/nmol), cuyos valores de T/NT fueron 3.65 y 6.00 respectivamente, a los 60 minutos de adquisición.

Desde el marco teórico se postula que, una mayor actividad específica produciría mayor captación e incrementaría la relación T/NT, lo cual permitiría identificar y caracterizar mediante imagenología, metástasis más pequeñas. Los resultados obtenidos apuntan en la misma dirección, aunque se debería ampliar los grupos ensayados, para poder concluir con mayor casuística.

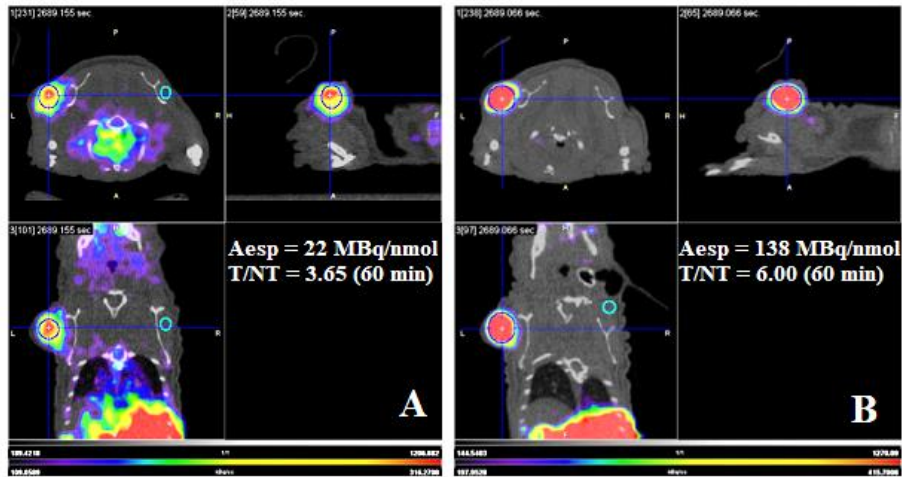


Figura 43- Ejemplo de imagen PET/CT de ratón portador de tumor LNCaP a los 60 minutos de adquisición, post-inyección de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, de Aesp= 22 MBq/nmol (A) y 138 MBq/nmol (B). VOIs azules a nivel tumoral, VOIs celestes a nivel del músculo contralateral.

5.4) Conclusiones

Se lograron desarrollar dos nuevos modelos de tumor xenográfico de CaP en animales de experimentación, ambos fueron evaluados mediante imagenología PET/CT. Para continuar con los estudios *in vivo* del radiotrazador [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, se seleccionó el modelo tumoral que resultó más satisfactorio. Se llevó a cabo la evaluación biológica de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo de ratón sano (grupo control) y en el modelo de tumor xenográfico de CaP humano (LNCaP), mediante estudios de biodistribución e imagenología molecular PET/CT.

En base a los ensayos de biodistribución realizados con el grupo control, se observó mayor captación de actividad a nivel de riñón, vejiga y orina, indicando una alta eliminación del radiotrazador por excreción urinaria. Además, se verificó la estabilidad *in vivo* del radiotrazador y su rápida depuración sanguínea. El mismo perfil de eliminación urinaria y depuración sanguínea se observó en los estudios realizados utilizando el modelo tumoral. Además, este modelo permitió evaluar la captación tumoral de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, que fue significativamente mayor que la obtenida para el músculo, en todos los tiempos analizados.

Los estudios de imagenología PET/CT mostraron una captación tumoral *in vivo* de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 que se incrementa a medida que el tumor crece. Dicha captación también resultó ser muy superior a la del músculo, presentando un máximo a los 60 minutos de administrado el radiotrazador en el modelo tumoral estudiado.

A su vez, la imagenología PET/CT permitió evaluar el comportamiento *in vivo* de los diastereómeros de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, los cuales no presentaron diferencia significativa en la captación tumoral, en dos etapas diferentes de crecimiento del tumor. Al analizar el efecto de la actividad específica del radiotrazador en su captación tumoral *in vivo*, se determinó que existe diferencia significativa entre las medias de T/NT obtenidas con marcados de baja actividad específica y los obtenidos con alta actividad específica. Dichos estudios son novedosos, ya que no se han reportado estudios similares con el radiotrazador en estudio.

Estos resultados sugieren que el radiotrazador [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 presenta características óptimas para su aplicación como agente diagnóstico por imagen para el CaP.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las pruebas de purificación que se realizaron para aumentar la calidad del eluido del generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, permitieron profundizar los conocimientos acerca de la química del ^{68}Ga en solución acuosa, así como adquirir experiencia en este tipo de manipulaciones. Si bien no se logró mejorar sustancialmente la calidad del eluido, se logró una mayor concentración de actividad, que permitió continuar con las marcaciones de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11.

Se lograron optimizar las condiciones de marcación para obtener el radiotrazador [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, con elevado rendimiento, pureza radioquímica y actividad específica muy superior a la reportada por otros investigadores. Dichas condiciones fueron transferidas a un módulo semi-automático de síntesis de radiofármacos de ^{68}Ga . Se desarrollaron métodos de control de calidad fisico-químicos adecuados para evaluar la pureza radioquímica y separar los diastereómeros formados, los cuales se presentaron en distintas proporciones dependiendo de la temperatura y el tiempo de incubación. El radiotrazador obtenido se ajustó a las especificaciones establecidas para el control de calidad y resultó ser estable por períodos de tiempo compatibles con el $T_{1/2}$ del ^{68}Ga (68 min), lo cual permitió realizar los estudios *in vitro* con cultivos celulares e *in vivo* en animales de experimentación.

Los ensayos *in vitro* en líneas celulares tumorales de CaP (LNCaP y MDA-PCa-2b) resultaron muy auspiciosos. Se demostró unión específica del radiotrazador a las células, así como una internalización cercana al 50 %, lo cual abre el abanico de posibilidades hacia una terapia específica basada en trazadores inhibidores de PSMA, marcados con emisores beta, como el ^{177}Lu . A su vez, se determinó que un mayor porcentaje del diastereómero menos estable no afecta la especificidad de unión *in vitro* al receptor.

Se llevó a cabo la evaluación biológica de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en un modelo de ratón sano (grupo control) y en el modelo de tumor xenográfico de CaP humano LNCaP, mediante estudios de biodistribución e imagenología molecular PET/CT. Las biodistribuciones llevadas a cabo en el grupo control, determinaron que el radiotrazador [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 presenta un perfil de eliminación urinaria y una rápida depuración sanguínea, no habiendo captación en órganos no específicos. En los estudios realizados en el modelo tumoral, se observó el mismo perfil de eliminación y una captación tumoral de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 significativamente mayor que la obtenida para el

músculo, tomado como tejido sano de referencia, en todos los tiempos analizados. Se estudió el comportamiento *in vivo* de la mezcla de diastereómeros obtenida por incubación a temperatura ambiente, no evidenciando diferencias significativas respecto a la mezcla que contiene mayoritariamente al diastereómero más estable.

Al analizar el efecto de la actividad específica del radiotrazador en su captación tumoral *in vivo*, se determinó que es un parámetro importante a tener en cuenta al momento de la realización de los estudios PET/CT. Se encontró diferencia significativa entre las medias de T/NT obtenidas con marcados de baja actividad específica y los obtenidos con alta actividad específica, en el modelo tumoral. Si bien del punto de vista teórico es razonable esperar que la relación T/NT se incremente al aumentar la actividad específica, no hay reportes de verificaciones experimentales de tal comportamiento para el [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. Es importante conocer dicha relación, para determinar hasta qué grado vale la pena incrementar la actividad específica, ya que a valores muy elevados podría verse comprometida la estabilidad del radiofármaco, por aumentar la radiolisis.

A modo de continuación de las actividades desarrolladas durante la Maestría, se propone ampliar los estudios en animales de experimentación, con el fin de optimizar la generación del tumor y así aumentar el número de datos, para poder concluir con mayor nivel de certeza. También sería de gran interés realizar la comparación de los datos obtenidos para el [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 con otros inhibidores de PSMA marcados con ⁶⁸Ga, tales como el PSMA-10 (dímero), PSMA-617 y su comparación además con [¹⁸F]F-PSMA-11. Con dicha comparación se buscaría mejorar la captación tumoral y disminuir las captaciones en los demás órganos, apuntando a una posible diagnoterapia con el par [⁶⁸Ga]Ga-PSMA / [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. El ¹⁷⁷Lu es un emisor β⁻ (T_{1/2} = 6.7 días, E_{máx} = 497 keV, penetración máxima en tejidos: 2 mm), que además presenta emisión gamma, la que permite el seguimiento de su aplicación mediante imagenología SPECT, posibilitando la realización de estudios dosimétricos personalizados. La estrategia diagnoterapéutica con este par de radiotrazadores dirigidos al PSMA, tiene el potencial de impactar positivamente en el manejo clínico de pacientes con CaP metastásico y hormono-refractario, aportando a la incorporación de nuevas tecnologías sanitarias en Uruguay. Como objetivo global, siempre se apunta a mejorar la calidad de atención de los pacientes con CaP, desde un enfoque diagnoterapéutico que otorgue seguridad y eficacia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Cancer.org Cáncer de próstata. (internet): <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/acerca/que-es-cancer-de-prostata.html> (Consultada: 25/04/2018).
- [2] Barrios E, Garau M. Epidemiología del cáncer en Uruguay y el mundo. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. **4**(1), 9-47 (2017).
- [3] Barrios, E. et al. V Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay 2009-2013. *Comisión honoraria de lucha contra el cáncer - Registro Nacional de Cáncer*. Montevideo.
- [4] Bravaccini, S. et al. PSMA expression: a potential ally for the pathologist in prostate cancer diagnosis. *Sci Rep*. **8**(1), 4254 (2018).
- [5] Cancer.org. American Cancer Society. What tests can detect prostate cancer early? (internet): <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/early-detection/tests.html>. (Consultada: 26/04/2018).
- [6] Clarke, R. et al. Markers for detection of prostate cancer. *Cancers*. **2**, 1125-1154 (2010).
- [7] Marisa Arriola, “Las Radiaciones Ionizantes y la Salud Humana: Aportes de la Química en el Área del Diagnóstico y del Tratamiento”. 2012. Aportes de la Química a la Salud Humana. Capítulo 7. RIQUIM - Repositorio Institucional de la Facultad de Química, UdelaR.
- [8] Organización Mundial de la Salud (OMS). Buenas prácticas de manufactura establecidas por la OMS para productos farmacéuticos estériles. Serie de Informes Técnicos de la OMS. 2011; No. 961, Anexo 6.
- [9] Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA). Protección radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. Normas de seguridad del OIEA para la protección de las personas y el medio ambiente. Requisitos de Seguridad Generales, Parte 3. Viena, 2016.
- [10] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc. <1823> Positron Emission Tomography Drugs – Information. 2017, Volume 1; pp. 2190-2201.
- [11] European Pharmacopeia 8.0. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Council of Europe. Radiopharmaceutical preparations and starting materials for radiopharmaceutical preparations. 2014, Volume 1; pp.1043-1114.
- [12] Petrik, M. et al. Microbial challenge tests on nonradioactive TiO₂-based ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator columns. *Nucl Med Commun*. **33**(8), 819-823 (2012).
- [13] Velikyan, I. et al. Organ biodistribution of Germanium-68 in rat in the presence and absence of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC for the extrapolation to the human organ and whole-body radiation dosimetry. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. **3**(2), 154-165 (2013).
- [14] Bauwens, M. et al. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of ⁶⁸Ga-DOTATOC for clinical application. *Nucl Med Commun*. **31**(8), 753-758 (2010).
- [15] Kilian, K. ⁶⁸Ga-DOTA and analogs: current status and future perspectives. *Rep Pract Oncol Radiother*. **19**, S13–S21 (2014).

- [16] Apolo, A., Pandit-Taskar, N. & Morris, M. Novel tracers and their development for the imaging of metastatic prostate cancer. *J Nucl Med.* **49**(12), 2031–2041 (2008).
- [17] Jadvar, H. Molecular imaging of prostate cancer with PET. *J Nucl Med.* **54**(10), 1685–1688 (2013).
- [18] Beheshti, M. et al. Evaluation of prostate cancer bone metastases with ^{18}F -NaF and ^{18}F -Fluorocholine PET/CT. *J Nucl Med.* **57**(3), 55S-60S (2016).
- [19] Kwee, SA. et al. Localization of primary prostate cancer with dual-phase ^{18}F -fluorocholine PET. *J Nucl Med.* **47**(2), 262–269 (2006).
- [20] Schuster, DM. et al. Detection of recurrent prostate carcinoma with anti-1-amino-3-18F-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid PET/CT and ^{111}In -capromab pendetide SPECT/CT. *Radiology.* **259**(3), 852–861 (2011).
- [21] Larson, SM. et al. Tumor localization of 16β - ^{18}F -fluoro-5 α -dihydrotestosterone versus ^{18}F -FDG in patients with progressive, metastatic prostate cancer. *J Nucl Med.* **45**(3), 366-373 (2004).
- [22] Giovacchini, G. et al. [^{11}C]-Choline uptake with PET/CT for the initial diagnosis of prostate cancer: relation to PSA levels, tumour stage and anti-androgenic therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **35**(6), 1065–1073 (2008).
- [23] Testa, C., et al. Prostate cancer: sextant localization with MR imaging, MR spectroscopy, and ^{11}C -Choline PET/CT. *Radiology.* **244**(3), 797–806 (2007).
- [24] De Jong, IJ. et al. ^{11}C -choline positron emission tomography for the evaluation after treatment of localized prostate cancer. *Eur Urol.* **44**(1), 32–38 (2003).
- [25] Nanni, C. et al. $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -choline PET or $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -acetate PET in prostate cancer: may a choice be recommended? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **34**(10), 1704–1705 (2007).
- [26] Morris, MJ. & Scher, HI. ^{11}C -acetate PET imaging in prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **34**(2), 181–184 (2007).
- [27] Brogsitter, C., Zöphel, K. & Kotzerke, J. ^{18}F -Choline, ^{11}C -choline and ^{11}C -acetate PET/CT: comparative analysis for imaging prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **40**(1), S18–S27 (2013).
- [28] Zoppolo, F. et al. Automated One-pot Radiosynthesis of [^{11}C]S-adenosyl Methionine. *Curr Radiopharm.* **10**(3), 203-2011 (2017).
- [29] Zoppolo, F. Desarrollo y evaluación de radiotrazadores para el diagnóstico de cáncer de próstata y evaluación de su agresividad y progresión mediante tomografía por emisión de positrones. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 2017.
- [30] Alonso, O. et al. Advanced prostate cancer evaluation by means of ^{68}Ga -DOTATATE PET-CT. *J Nucl Med.* **52**(1), abstract 39 (2011).
- [31] Hara, T., Bansal, A. & DeGrado, TR. Choline transporter as a novel target for molecular imaging of cancer. *Mol Imaging.* **5**(4), 498–509 (2006).
- [32] Roivainen, A. et al. Blood metabolism of [methyl- ^{11}C] choline; implications for *in vivo* imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med.* **27**(1), 25-32 (2000).
- [33] Horoszewicz, JS., Kawinski, E. & Murphy, GP. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res.* **7**(5B), 927-935 (1987).

- [34] Bostwick, DG. et al. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*. **82**(11), 2256–2261 (1998).
- [35] Wright, GL. et al. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic oncology*. **1**(1), 18–28 (1995).
- [36] Mannweiler, S. et al. Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis. *Pathol Oncol Res*. **15**(2), 167–172 (2009).
- [37] De Marzo, AM. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet*. **15**(361), 955–964 (2003).
- [38] Heston, WD. Characterization and glutamyl preferring carboxypeptidase function of prostate specific membrane antigen: a novel folate hydrolase. *Urology*. **49**(3A), 104–112 (1997).
- [39] Sokoloff, R. et al. A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate*. **43**(2), 150–157 (2000).
- [40] Israeli, RS. et al. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer research*. **53**(2), 227–230 (1993).
- [41] Rajasekaran, AK, Anilkumar, G. & Christiansen, JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *Am J Physiol Cell Physiol*. **288**(5), C975–C981 (2005).
- [42] Anilkumar, G. et al. Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity. *Cancer Res*. **63**(10), 2645–2648 (2003).
- [43] Goodman, O. et al. Interaction of prostate specific membrane antigen with clathrin and the adaptor protein complex-2. *Int. J. Oncol*. **31**(5), 1199–1203 (2007).
- [44] Schülke, N. et al. The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**(22), 12590–12595 (2003).
- [45] Mesters, JR. et al. Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *EMBO J*. **25**(6), 1375–1384 (2006).
- [46] Barinka, C. et al. Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Sci*. **13**(6), 1627–1635 (2004).
- [47] Conway, RE. et al. Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction. *Mol Cell Biol*. **26**(14), 5310–5324 (2006).
- [48] Chang, S. et al. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin Cancer Res*. **5**(10), 2674–2681 (1999).
- [49] Silver, DA. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*. **3**(1), 81–85 (1997).
- [50] Wernicke, AG. et al. Prostate-specific membrane antigen as a potential novel vascular target for treatment of glioblastoma multiforme. *Arch Pathol Lab Med*. **135**(11), 1486–1489 (2011).
- [51] Barinka, C. et al. Glutamate carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer. *Curr Med Chem*, **19**(6), 856–870 (2012).

- [52] Pillai, MRA. et al. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. *Nucl Med Biol.* **43**(11), 692–720 (2016).
- [53] Kopka, K. et al. Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J Nucl Med.* **58**(2), 17S-26S (2017).
- [54] Pavlíček, J., Ptáček, J. & Barinka, C. Glutamate carboxypeptidase II: an overview of structural studies and their importance for structure-based drug design and deciphering the reaction mechanism of the enzyme. *Curr Med Chem.* **19**(9), 1300–1309 (2012).
- [55] Barinka, C. et al. Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs. *J. Mol. Biol.* **376**(5), 1438-1450 (2008).
- [56] Taneja, S. ProstaScint® scan: contemporary use in clinical practice. *Rev Urol.* **6**(10), S19–S28 (2004).
- [57] Kularatne, SA. et al. Design, synthesis, and preclinical evaluation of prostate-specific membrane antigen targeted ^{99m}Tc-radioimaging agents. *Mol. Pharm.* **6**(3), 790-800 (2009).
- [58] Bander, N. et al. Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen. *J Urol.* **170**(5), 1717-1721 (2003).
- [59] EMD Millipore. An introduction to inhibitors and their biological applications. (internet): https://www.researchgate.net/publication/280494256_Introduction_to_Inhibitors (consultada: 25/04/2018).
- [60] Jackson, PF. et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. *J Med Chem.* **39**(2), 619-622 (1996).
- [61] Jackson, PF. & Slusher, BS. Design of NAALADase inhibitors: a novel neuroprotective strategy. *Curr Med Chem.* **8**(8), 949–957 (2001).
- [62] Kozikowski, AP. et al. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase). *J Med Chem.* **44**(3), 298–301 (2001).
- [63] Kozikowski, AP. et al. Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. *J Med Chem.* **47**(7), 1729–1738 (2004).
- [64] Barinka, C. et al. Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. *J Med Chem.* **51**(24), 7737-7743 (2008).
- [65] Foss, CA. et al. Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: *in vivo* imaging in experimental models of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **11**(11), 4022–4028 (2005).
- [66] Hillier, SM. et al. Preclinical evaluation of novel glutamate urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. *Cancer Res.* **69**(17), 6932–6940 (2009).

- [67] Maresca, KP. et al. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. *J Med Chem.* **52**(2), 347–357 (2009).
- [68] Liu, T. et al. Pseudoirreversible inhibition of prostate-specific membrane antigen by phosphoramidate peptidomimetics. *Biochemistry.* **47**(48), 12658-12660 (2008).
- [69] Eder, M. et al. ^{68}Ga -complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem.* **23**(4), 688–697 (2012).
- [70] Eder, M. et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for ^{68}Ga -labeled small recombinant antibodies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **35**(10), 1878-1886 (2008).
- [71] Schwenck, J. et al. Comparison of ^{68}Ga -labelled PSMA-11 and ^{11}C -choline in the detection of prostate cancer metastases by PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **44**(1), 92-101 (2017).
- [72] Alonso, O. et al. ^{68}Ga -PSMA and ^{11}C -Choline comparison using a tri-modality PET/CT-MRI (3.0 T) system with a dedicated shuttle. *Eur J Hybrid Imaging.* **2**(9), (2018).
- [73] Afshar-Oromieh, A. et al. Comparison of PET imaging with a ^{68}Ga -labelled PSMA ligand and ^{18}F -choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **41**(1), 11–20 (2014).
- [74] Afshar-Oromieh, A. PET imaging with a [^{68}Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **40**(4), 486–495 (2013).
- [75] Velikyan, I. ^{68}Ga -Based radiopharmaceuticals: production and application relationship. *Molecules.* **20**(7), 12913-12943 (2015).
- [76] Zhernosekov, K. et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J Nuc Med.* **48**(10), 1741-1748 (2007).
- [77] Mueller, D. et al. Simplified NaCl based ^{68}Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of ^{68}Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjugate Chem.* **23**, 1712–1717 (2012).
- [78] Mueller, D. et al. Radiolabeling of DOTA-like conjugated peptides with generator-produced ^{68}Ga and using NaCl-based cationic elution method. *Nat Protoc.* **11**(6), 1057-1066 (2016).
- [79] Eppard, E. et al. Ethanol-based post-processing of generator-derived ^{68}Ga toward kit-type preparation of ^{68}Ga -radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **58**(3), 1023–1028 (2017).
- [80] Schumacher, J. et al. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with ^{67}Ga , ^{111}In and ^{59}Fe . Comparative biodistribution with ^{111}In -DTPA and ^{131}I -labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. *Int J Rad Appl Instrum. B.* **19**(8), 809-824 (1992).
- [81] Schumacher, J. et al. Multistep tumor targeting in nude mice using bispecific antibodies and a gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with positron emission tomography. *Can Res.* **55**, 115-123 (1995).
- [82] Eder, M. et al. Novel preclinical and radiopharmaceutical aspects of [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: a new PET tracer for imaging of prostate cancer. *Pharmaceuticals.* **7**, 779-796 (2014).

- [83] Zoller, M. et al. Establishment and characterization of monoclonal antibodies against an octahedral gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with PET. *J Nucl Med.* **33**(7), 1366-1372 (1992).
- [84] Chain, Y. & Illanes, L. Radiofármacos en medicina nuclear. Fundamentos y aplicación clínica. 1a ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2015.
- [85] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <467> General chapter Residual Solvents; 2017, Volume 1; pp. 369-384.
- [86] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <71> Sterility Tests; 2017, Volume 1; pp. 136-143.
- [87] U.S. Pharmacopeia-National Formulary [USP 40 NF 35], Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2017. <85> Bacterial Endotoxins Test; 2017, Volume 1; pp. 163-169.
- [88] Perdomo, R. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). *Rev Cubana Farm.* **38**(1), 2004.
- [89] Velika, B. & Kron, I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants.* **2**(4), 62-67 (2012).
- [90] Horoszewicz, J. et al. The LNCaP cell line – a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res.* **37**, 115-132 (1980).
- [91] Horoszewicz, J. et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**(4), 1809-1818 (1983).
- [92] Israeli, R. et al. Expression of the Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res.* **54**(7), 1807-1811 (1994).
- [93] Navone, N. et al. Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clin Cancer Res.* **3**(12), 2493–2500 (1997).
- [94] Kaighn, ME. Establishment of a human prostatic cell line (PC-3). *Invest Urol.* **17**(1), 16-23 (1979).
- [95] Bigott-Hennkens, H. et al. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* **52**(3), 245-253 (2008).
- [96] Vasilskis, E. et al. Comparative in vitro study of ¹¹C-Methionine and ¹¹C-Deuterodeprenyl uptake in three human glioma cell lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals.* **32**(9), 344-350 (2017).
- [97] Rajasekaran, S. et al. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. *Mol Biol Cell.* **14**(12), 4835-4845 (2003).
- [98] Young, J. et al. ⁶⁸Ga-THP-PSMA: a PET imaging agent for prostate cancer offering rapid, room-temperature, one-step kit-based radiolabeling. *J Nucl Med.* **58**(8), 1270-1277 (2017).
- [99] De Jong, M & Maina, T. et al. Of mice and humans: are they the same? Implications in cancer translational research. *J Nucl Med.* **51**(4), 501-504 (2010).
- [100] O'Keefe, D. et al. A perspective on the evolving story of PSMA biology, PSMA-based imaging and endoradiotherapeutic strategies. *J Nucl Med.* **59**(7), 1007-1013 (2018).
- [101] Wu, X. et al. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr. Relat. Cancer.* **20**(4), R155-170 (2013).

- [102] Sausville, E. & Burger, A. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* **66**(7), 3351-3354 (2006).
- [103] Zheng, Q-H. et al. [¹¹C]Choline as a PET biomarker for assessment of prostate cancer tumor models. *Bioorganic & medicinal chemistry.* **12**(11), 2887-93 (2004).
- [104] Aggarwal, S. et al. Comparative study of PSMA expression in the prostate of mouse, dog, monkey and human. *Prostate.* **66**(9), 903-910 (2006).
- [105] Hara, T. et al. Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* **68**(4), 1128-1135 (2008).
- [106] DDEP (Decay Data Evaluation Project Data), 2015. (internet): http://www.nucleide.org/DDEP_WG/DDEPdata.htm (consultada: 03/05/2018).
- [107] Hacht, B. Gallium(III) ion hydrolysis under physiological conditions. *Bull Korean Chem Soc.* **29**(2), 372-376 (2008).
- [108] Velikyan, I. et al. Microwave-supported preparation of ⁶⁸Ga bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjugate Chem.* **15**, 554–560 (2004).
- [109] Evans, J. et al. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *Br J Pharmacol.* **173**(21), 3041-3079 (2016).

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) por permitir realizar este trabajo en sus instalaciones, brindando los materiales y equipamientos necesarios.

A la Dra. Henia Balter por realizar la tutoría de esta tesis y a la Dra. Ana Rey por realizar la tutoría académica, asimismo al Dr. Henry Engler por su rol como asesor científico.

A PEDECIBA-Química por el apoyo económico y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de Maestría otorgada (POS_FMV_2015_1_1005287).

A la Lic. Quim. Victoria Trindade, con quien desarrollé gran parte de la investigación química de este trabajo. Gracias por darme las primeras armas para desarrollarme profesionalmente y por tus sabios consejos de siempre.

A la Lic. Bq. Elena Vasilskis, quien fue fundamental para el desarrollo de los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Gracias por incorporarme al “mundo de las células” y “los ratoncitos”, por estar siempre dispuesta a colaborar e innovar. Gracias también por esas interminables jornadas cambiando cajas dentro del LEA y por cuidar de ellos en mi ausencia.

A Laura y Andrea por su ayuda en la realización de las biodistribuciones y en la adquisición de las imágenes PET/CT.

Gracias a todos mis compañeros de CUDIM, en especial a Stefanía, Omar, Inés, Florencia, Ingrid, Tania, Andrea, Pablo y Kevin.

Un agradecimiento especial a mis padres y hermanos por la paciencia de estos años y por estar siempre. Gracias a ellos soy quien soy, su felicidad es mi mayor impulso para seguir adelante.

ANEXO

Instancias de divulgación de resultados

- En el período de desarrollo de la tesis, participé del Congreso SNMMI 2017 (Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging), realizado del 10 al 14 de Junio de 2017 en Denver (USA). En dicha oportunidad, realicé la presentación oral de un trabajo vinculado a la misma, basado en la optimización de la marcación y el control de calidad de dos radiofármacos: [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, objeto de esta tesis y [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, un radiofármaco terapéutico, también inhibidor de PSMA (estrechamente relacionado a esta investigación). Además, el trabajo fue publicado como resumen en el Journal of Nuclear Medicine, Volumen 58 – suplemento 1, Mayo de 2017.

Título del trabajo: “ ^{68}Ga -PSMA and ^{177}Lu -PSMA of high specific activity for targeted diagnosis and therapy of prostate cancer in patients”.

Autores: Natalí Bentancor, Victoria Trindade, Elena Vasilskis, Inés Sanz, Henia Balter, Henry Engler.

Link del abstract:

http://jnm.snmjournals.org/content/58/supplement_1/686.abstract?sid=e2325faa-ecc4-4f25-b0a5-9205e93faa03

- A su vez, participé del 5° Encuentro Nacional de Química (ENAUQUI 5), llevado a cabo del 18 al 20 de octubre de 2017 en Montevideo. En esta oportunidad, realicé la presentación de un trabajo en formato póster, que resume parte de los resultados presentados en este informe. Dicho trabajo fue premiado como mejor póster.

Título del póster: Inhibidores de PSMA radiomarcados con ^{68}Ga en el diagnóstico de cáncer de próstata.

Autores: Natalí Bentancor, Victoria Trindade, Elena Vasilskis, Henia Balter, Henry Engler.