



**Síntesis de nuevos derivados de [1,2,4,5]tetrazina con
aplicación en imagen molecular**

Lic. Gonzalo Andrés Rodríguez López

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de
Magister en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Marzo 2023

Síntesis de nuevos derivados de [1,2,4,5]tetrazina con aplicación en imagen molecular

Tribunal

Dr. Eduardo Savio

Dra. María Laura Lavaggi

Dr. Javier Giglio

Dr. Hugo Cerecetto Director

Dra. María Fernanda García, Directora

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a las Instituciones que formaron parte de este proyecto, a la Facultad de Ciencias, en particular al Área de Radiofarmacia del Centro de Investigaciones Nucleares y al Grupo de Química Orgánica Medicinal, del Instituto de Química Biológica por brindarme el espacio para realizar los experimentos.

A la Dra. María Moreno por su asistencia en los estudios de citometría de flujo.

Agradecer también a las instituciones financiadoras, ANII por otorgarme la beca de Maestría y CSIC por la beca de finalización de la Maestría y proyecto CSIC Ini 2019 y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

A mi familia y amigos.

A todos los compañeros de trabajo y tutores.

Síntesis de nuevos derivados de [1,2,4,5]tetrazina con aplicación en imagen molecular

Gonzalo Andrés Rodríguez López

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTORES: Dr. Hugo Cerecetto, Dra. María Fernanda García

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Resumen

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMO) radiomarcados en el diagnóstico de cáncer se encuentra limitado por su lenta depuración sanguínea. La estrategia pre-dirigida, que evade la etapa de lenta depuración del AcMo radiomarcado, consiste típicamente en dos pasos. Primero la molécula vector, el anticuerpo, es modificado con un grupo funcional reactivo y es introducido en el sistema biológico para su distribución, metabolización y acumulación en el tejido a detectar. En un segundo paso, se administra el segundo componente portador del radionucleido, con mejores propiedades farmacocinéticas (usualmente de baja masa molecular) que el AcMo, y que reaccionará, *in vivo*, de forma específica (en un proceso bioortogonal) con la molécula vector.

La cicloadición de derivados [1,2,4,5]tetrazina (Tz, diazadienos) y *trans*-cicloocteno (TCO) es una herramienta que ha crecido en los últimos años para realizar reacciones bioortogonales. Este tipo de reacciones, no presentan equivalencia en sistemas biológicos (bioortogonales) por lo que son altamente selectivas y reaccionan en entornos acuosos con velocidades altas sin necesidad de catálisis. Estas características permiten su uso en entornos biológicos en los procesos de diagnóstico pre-dirigidos.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el potencial de la reacción bioortogonal entre pequeños nuevos derivados de Tz marcados con ^{99m}Tc y AcMo portadores de un fragmento derivado de TCO.

Por un lado, explorando la modulación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de Tz, estudiadas en trabajos previos, desarrollando en este trabajo nuevos derivados de Tz portadores de los fragmentos coordinantes 1,4,8,11-tetrazaciclotetradecanilo (derivado de 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, cyclam) y dietilaminopentaacetilo (derivado del ácido dietilaminopentaacético, DTPA).

Por otra parte, se exploraron nuevos modelos para el diagnóstico de melanoma utilizando, en un enfoque pre-dirigido, la expresión del sistema ligando de muerte programada 1 (PD-L1)/proteína de muerte programada 1 (PD-1). Se utilizó el AcMo atezolizumab y se estudió *in vitro* e *in vivo* en un modelo tumoral murino.

Synthesis of [1,2,4,5]tetrazine derivatives for molecular imaging applications

Gonzalo Andrés Rodríguez López

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

ADVISORS: Dr. Hugo Cerecetto, Dra. María Fernanda García

Área de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Abstract

Radiolabeled antibodies used in cancer diagnosis are limited by slow blood clearance. Pre-targeted imaging strategy for cancer diagnosis optimizes antibodies clearance, working generally in two steps. Firstly, the vector-molecule is tagged with a specific functional group and administered in the subject allowing distribution, metabolism and accumulation on the target tissue of the molecule. Secondly, a radiolabelled-entity, usually with lower molecular weight and better clearance than the AcMo, is administered and it reacts specifically, in a bioorthogonal process, with the vector-molecule.

Cycloaddition between [1,2,4,5]tetrazine (Tz, diazadienes) and *trans*-cyclooctene (TCO) is a tool to achieve bioorthogonal reactions. These kinds of reactions do not have biological equivalence; therefore they are highly selective and react in aqueous media with high reaction rate without a catalyst. These characteristics constitute ideal attributes for its use in biological environments in the pre-targeted diagnostic procedures.

The aim of the current work was to study the potential application of the reaction between new small Tz derivatives radiolabelled with ^{99m}Tc and a TCO-framework containing AcMo.

On the one hand, exploring the physicochemical and biological properties modulation of previous studied Tz described by us, working with new derivatives porting moieties that coordinate metals like 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecanyl (derived from 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, cyclam) and diethylaminopentaacetyl (derived from diethylaminopentaacetic acid, DTPA).

On the other hand, new models to explore melanoma diagnosis using in a pre-targeted approach the expression of the programmed death-ligand 1 (PD-L1)/programmed cell death protein (PD-1) were studied. It was used the AcMo atezolizumab in *in vitro* and *in vivo* murine tumoral model.

Indice

Agradecimientos	III
Indice.....	IX
Lista de tablas	XII
Lista de figuras	XIII
Abreviaturas.....	XVIII
Introducción.....	1
Cáncer	1
Diagnóstico de cáncer por imagen molecular	1
Técnicas de imagenología nuclear (SPECT y PET)	2
Radiofármacos de diagnóstico.....	3
Tecnecio-99m.....	3
Radiofármacos de Tecnecio-99m	5
Agentes bifuncionales quelantes de ^{99m} Tc	6
Anticuerpos monoclonales (AcMo)	8
Radioinmunoconjugados	11
Estrategias de marcación pre-dirigida	12
Reacciones bioortogonales – <i>Click chemistry</i>	15
Acoplamiento utilizando tetrazinas	18
Aplicaciones de química bioortogonal utilizando tetrazinas y TCO	22
Objetivo General.....	26
Capítulo I.....	27
Objetivos específicos	27
Antecedentes y Fundamentos	28
Materiales y Métodos.....	30

Química	31
Marcación con ^{99m} Tc	39
Estudios de estabilidad	41
Síntesis de bevacizumab-TCO	41
Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	43
Estudios estadísticos	44
Resultados y Discusión.....	45
Síntesis orgánica	45
Marcación con ^{99m} Tc	61
Lipofilia (LogD)	67
Estudios de estabilidad	68
Conjugación con TCO	68
Estudio de la cicloadición con los derivados sintetizados	69
Estudios <i>in vitro</i> de bioactividad en células B16-F10.....	70
Estudios <i>in vivo</i>	71
Conclusiones	75
Capítulo II	76
Objetivos específicos	76
Antecedentes y justificación	77
Materiales y Métodos.....	79
Química	79
Marcación con ^{99m} Tc	79
Anticuerpo	80
Estudios <i>in vitro</i>	81
Estudios <i>in vivo</i>	84
Resultados y discusión	85

Química	85
Marcación con ^{99m} Tc de CH ₃ -Tz-Hy	86
Anticuerpo	87
Estudios <i>in vitro</i>	89
Estudios <i>in vivo</i>	94
Conclusiones	100
Bibliografía	101

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de reacción ensayadas para obtener el compuesto GRTz05	47
Tabla 2. Condiciones de reacción de GRTz07	50
Tabla 3. Condiciones de reacción para la obtención de GRTz10	54
Tabla 4. Condiciones de marcación de GRTz06	62
Tabla 5. Valores de LogD _{7.4} obtenidos para los complejos desarrollados en este trabajo y de los complejos antecedentes de este trabajo	67
Tabla 6. Estudios de estabilidad de los derivados radiomarcados GRTz06 y GRTz10	68
Tabla 7. Comparación de los valores de LogD _{7.4} con respecto al %ID/g de los principales órganos de interés obtenidos a partir de biodistribución en ratones normales	73
Tabla 8. Comparación de la relación % ID/g Tumor/músculo para los sistemas utilizados en el estudio de la reacción bioortogonal entre ^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-Hyy atezolizumab-TCO. (*). Diferencia significativa (p <0.05), ANOVA una via con corrección de Bonferroni)	97

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	4
Figura 2. Ecuación química de la reducción del ion TcO_4^- a un posible estado de oxidación +4	5
Figura 3. Estructuras de algunos quelantes de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizados como bifuncionales.....	8
Figura 4. Estrategia de marcación directa de anticuerpos monoclonales.....	8
Figura 5. Estructura de una IgG.....	9
Figura 6. Producción de anticuerpos monoclonales utilizando la técnica del hibridoma.....	10
Figura 7. Estrategia pre dirigida utilizando el par biotina-avidina.....	13
Figura 8. Estrategia de marcación pre-dirigida utilizando anticuerpos biespecíficos.....	14
Figura 9. Estrategia de marcación pre-dirigida utilizando oligonucleótidos complementarios	15
Figura 10. Arriba, reacción de Staudinger entre azidas y fosfinas. Abajo, modificación a la reacción de Staudinger.....	17
Figura 11. Reacción de cicloadición entre azidas y alquinos.....	17
Figura 12. Reacción de cicloadición entre azidas y alquinos tensionados.....	18
Figura 13. Reacción general entre tetrazinas y trans-cicloocteno.....	19
Figura 14. Principales derivados de tetrazina utilizados en reacciones bioortogonales ordenadas según reactividad (de mayor a menor, de izquierda a derecha).....	20
Figura 15. Diferentes dienófilos utilizados para reaccionar con tetrazinas.....	21
Figura 16. Estereoisómeros del trans-cicloocteno-OR.....	21
Figura 17. Arriba, esquema de la reacción bioortogonal utilizada por Rossin et al. Abajo, Derivado de tetrazina quelante de ^{111}In utilizado.....	22
Figura 18. Derivado de tetrazina quelante de ^{64}Cu desarrollado por Lewis et al. para PET....	23
Figura 19. Primeros derivados de tetrazina quelantes de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	24
Figura 20. Derivados de tetrazina-HYNIC sintetizados en la tesis doctoral de Dra. M ^a . Fernanda García.....	24
Figura 21. Derivados de tetrazina quelantes de Tecnecio-99m (I).....	25
Figura 22. Esquema del objetivo de síntesis planteado.....	45
Figura 23. Estructura de GRTz04 (tesis doctoral Dra. Ma. Fernanda García).....	45
Figura 24. Ruta de síntesis de GRTz03.....	46

Figura 25. Esquema de la síntesis de GRTz06	47
Figura 26. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de GRTz05 y GRTz07	48
Figura 27. Esquema de síntesis de los compuestos desprotegidos GRTz06 y GRTz08.....	50
Figura 28. Cromatogramas de HPLC correspondiente a la reacción de desprotección de GRTz07. Arriba: Reacción a t = 0. Medio: Reacción a t = 60 min. Abajo: Reacción a t = 90 min	51
Figura 29. Bis-anhídrido de DTPA	52
Figura 30. Full scan MS del sólido blanco obtenido en el intento de síntesis del bis-anhídrido de DTPA.....	52
Figura 31. Esquema de síntesis de GRTz10.....	53
Figura 32. Cromatogramas de HPLC de la síntesis de GRTz10. Arriba, tetrazina reactivo. Abajo, crudo de reacción.	54
Figura 33. Experimento heteronuclear HSQC para GRTz10 en D ₂ O (la numeración utilizada es arbitraria)	55
Figura 34. Experimento heteronuclear HSQC para GRTz10 en D ₂ O. Se muestra únicamente la región ampliada de ¹ H aromáticos	56
Figura 35. Experimento heteronuclear HMBC para GRTz10 en D ₂ O. Se muestra únicamente la región ampliada de ¹ H alifáticos. Se señalan con flechas algunas correlaciones	57
Figura 36. Espectro de ¹ H-RMN de GRTz10 con las señales asignadas	58
Figura 37. Arriba, Cromatograma de HPLC de GRTz10 purificada por C18 SepPack, tiempo de retención 13.9 min. Abajo, MS- full scan del pico correspondiente a GRTz10.	58
Figura 38. Esquema de síntesis de GRTz11.....	59
Figura 39. Cromatograma de HPLC para mezcla de reacción de GRTz11 luego de 24 h. Arriba: Canal 280 nm, Abajo: Canal 510 nm.	59
Figura 40. Cromatograma de HPLC para una fracción aislada por cartucho de C18 de GRTz11. Arriba: Canal 280 nm, Abajo: Canal 510 nm	60
Figura 41. Cromatograma de HPLC para del compuesto purificado por HPLC se observa un pico mayoritario que se corresponde con GRTz11. Arriba: Canal 280 nm, Abajo: Canal 510 nm	60
Figura 42. Estructura propuesta para el complejo ^{99m} Tc-GRTz06	61

Figura 43. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz06 con ^{99m}Tc . Arriba: Canal UV 510nm. Abajo: Canal gamma. Se observa el pico correspondiente a ^{99m}Tc -GRTz06 en 17.1 min.	63
Figura 44. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz08 con ^{99m}Tc señalado en verde el producto de interés. Arriba: Canal 280 nm, Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma..	64
Figura 45. Cromatograma de HPLC para ^{99m}Tc -GRTz08 luego de 2 horas de marcado. Arriba: Canal 280 nm. Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma.	65
Figura 46. Posible estructura del complejo ^{99m}Tc -GRTz10	66
Figura 47. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz10 con ^{99m}Tc , tiempo de retención 9.9 min. Arriba: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma.	66
Figura 48. Cromatograma de HPLC en donde se muestra el resultado de una condición de marcación con ^{99m}Tc para GRTz11 luego de 30 minutos, en el rectángulo verde se muestra el tiempo de retención esperado. Se observa descomposición del material de partida luego de 30 min. Arriba: Canal 280 nm. Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma	67
Figura 49. Izq. Gel SDS-poliacrilamida, detección por fluorescencia 540/600 nm (izquierda, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 bevacizumab-TCO, carriles 3,4,5 y 5 bevacizumab-TCO con distintos equivalentes de Tz-Cy3, carril 8 bevacizumab sin TCO y TzCy3, carril 9 Tz-Cy3). Der. Gráfico de cuantificación de la señal de las bandas de bevacizumab-TCO+Tz-Cy3.....	69
Figura 50. Resultados del ensayo de bioactividad in vitro en células B16-F10. (*) Diferencia significativa ($p < 0.05$), ANOVA de una vía	70
Figura 51. Biodistribución de ^{99m}Tc -GRTz06 en ratones normales C57BL/6	71
Figura 52. Biodistribución de ^{99m}Tc -GRTz10 en ratones normales C57BL/6	72
Figura 53. Relaciones entre $\text{LogD}_{7.4}$ y %ID/g en el hígado (izq), Intestinos (centro), y riñones (der) luego de 1 h post inyección para los radiomarcados analizados en la tabla 7.....	74
Figura 54. Esquema de la síntesis de $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$	86
Figura 55. Marcación de $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$ utilizando el método 2. Arriba: Canal 260nm. Medio: Canal 515 nm. Abajo: Canal gamma.	87
Figura 56. Cuentas por minuto para cada fracción obtenida por PD-10 de la reacción de cicloadición entre atezolizumab-TCO y ^{99m}Tc - $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$	88

Figura 57. Cromatograma de HPLC para las reacciones de cicloadición entre atezolizumab-TCO y las tetrazinas acopladas a fluoróforo, Cy3-CH ₃ -Tz (arriba y Cy5-CH ₃ -Tz (abajo), detección canal 515 nm.	88
Figura 58. Resultados de la citometría de flujo para evaluar la expresión de PD-L1 en B16F1, B16F10 Y Tm1MT utilizando anticuerpo comercial (□ unst (sin tinción), □ PDL1, □ PDL1 IFN-γ). Los histogramas con los isotipos y los unst de las distintas condiciones son comparables (resultados no mostrados).....	89
Figura 59. Resultados de la citometría de flujo utilizando atezolizumab-TCO-Cy5-CH ₃ -Tz-Hy en la línea celular Tm1MT. A la izquierda se muestra la estrategia de gating y en la derecha el histograma de la intensidad de fluorescencia en la línea Tm1MT en presencia y ausencia de IFN-γ ((□ unst (sin tinción), □ PDL1, □ PDL1 IFN-γ). Estudio de unión de ^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-Hy en células Tm1MT y de bloqueo.....	90
Figura 60. Resultados del experimento de unión y bloqueo de ^{99m} Tc-atezolizumab-CH ₃ -Tz-Hy en células B16F10. (*) Diferencia significativa en el total (p <0.05), t-student).....	91
Figura 61. Resultados del experimento de unión y bloqueo de ^{99m} Tc-atezolizumab-CH ₃ -Tz-Hy en células Tm1MT. (*) Diferencia significativa en el total (p <0.05), t-student).....	92
Figura 62. Resultados del experimento de determinación de la fracción inmunorreactiva en la línea celular Tm1MT, para ^{99m} Tc-atezolizumab-TCO-CH ₃ -Tz-Hy.....	93
Figura 63. Resultados del experimento de inhibición IC ₅₀ en la línea celular Tm1MT, para atezolizumab- ^{99m} Tc-TCO-CH ₃ -Tz-Hy.....	94
Figura 64. Esquema de la metodología utilizada en los ensayos in vivo para el estudio de la reacción bioortogonal entre GRTz10 y atezolizumab-TCO.....	96
Figura 65. Arriba: Esquema de la metodología de los estudios in vivo para. Abajo: Resultados de la biodistribución de la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-Hy y sus respectivos controles	96
Figura 66. Resultados de la biodistribución de la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-Hy, utilizando dos concentraciones diferentes	97
Figura 67. Imágenes obtenidas por SPECT/CT para la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m} Tc-Tz-Hy. De izquierda a derecha se muestra un corte transversal, corte frontal y corte sagital en la zona donde la captación en el tumor es alta. Arriba: control negativo. Abajo: reacción bioortogonal	98

Abreviaturas

(Boc) ₂ O	di- <i>tert</i> -butildicarbonato
AcMo	anticuerpo monoclonal
ACN	acetonitrilo
AE	acetato de etilo
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine serum albumin</i>)
CC	cromatografía en columna
CCF	cromatografía en capa fina
CDR	Región determinante de la complementariedad (del inglés, <i>complementarity determining región</i>)
CEUA	Comisión de Ética en el uso de Animales
COSY	espectroscopía de correlación (del inglés, <i>correlation spectroscopy</i>)
CT	tomografía computada (del inglés, <i>computed tomography</i>)
CuAAC	cicloaddición de azida-alquino catalizada por cobre
cyclam	1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
DCM	diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DTPA	ácido <i>N,N</i> -bis[2-amino- <i>N',N'</i> -bis(carboximetil)etil]aminoacético
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EP	éter de petróleo (fracción de PEb entre 60 y 65 °C)
eq	equivalentes
ESI	ionización por electrospray (del inglés, <i>electrospray ionization</i>)
Et ₃ N	triethylamina
EtOH	etanol
HMBC:	correlación de enlace múltiple heteronuclear (del inglés, <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HOBT	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
HPLC:	cromatografía líquida de alta performance (del inglés, <i>high performance liquid chromatography</i>)

HSQC	correlación de enlace simple heteronuclear (del inglés, <i>heteronuclear single quantum correlation</i>)
HYNIC	ácido 6-hidrazinonicotínico
IEDDA	reacción de Diels Alder de demanda inversa (del inglés, <i>inverse electron demand Diels-Alder</i>)
ITLC-SG	cromatografía en capa fina instantánea en sílica gel
MAG3	<i>N</i> -(2-mercaptoacetil)triglicina
MeOH	metanol
MS	espectrometría de masas (del inglés, <i>mass spectroscopy</i>)
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
PBS	amortiguador de fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	proteína de muerte programada 1
PDL-1	proteína ligando de la proteína de muerte programada1
PEG	Fragmentos repetitivos etiloxi
PET	tomografía de emisión de positrones (del inglés, <i>positron emission tomography - computed tomography</i>)
PRQ	pureza radioquímica
RMN	resonancia magnética nuclear
SFB	suero fetal bovino
SPAAC	cicloadición promovida por ciclos tensionados (del inglés <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
SPECT-CT	tomografía computada de emisión de fotón único (del inglés, <i>single photon emission-computed tomography</i>).
T. Amb	temperatura ambiente
TCO	<i>trans</i> -cicloocteno
TCO-NHS	<i>O</i> -(<i>trans</i> -ciclooct-4-enil)- <i>O</i> -(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)carbonato
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Tz, tetrazina	[1,2,4,5]tetrazina
UV:	ultravioleta

Introducción

Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, sumando casi 10.000.000 de muertes en el 2020. [1] Se trata de una enfermedad muy diversa a nivel de tejidos lo que conlleva a un desafío tanto en la detección como en los tratamientos empleados. En general la enfermedad se describe como una serie de sucesivas mutaciones genéticas de tal manera que cambian la función celular normal. A partir de ello se distorsiona el ciclo celular y conduce a la proliferación anormal e incontrolada de células. [2]–[4]

En las últimas décadas, específicamente en Uruguay, ha existido un sostenido aumento en el control de las enfermedades infecciosas y un aumento en la calidad de vida de las personas, lo que repercute en una mayor expectativa de vida. Esto está estrechamente relacionado a la probabilidad de contraer algunos tipos de cáncer por lo que los casos aumentan año a año. En el último informe publicado por el Instituto Nacional del Cáncer, en mayo de 2022, sitúa a la mortalidad por cáncer en el 25 % del total de las defunciones. El tipo de cáncer tiene una marcada diferencia en cuanto a los géneros. En hombres, los tipos de mayor prevalencia son el cáncer de próstata, colo-recto y pulmón, siendo este último el que mayor mortalidad posee. En mujeres, el cáncer de mama es el que mayor incidencia y mortalidad tiene, seguido del colo-recto y cérvico uterino. [5], [6]

Diagnóstico de cáncer por imagen molecular

La imagenología tiene un rol importante en todas las fases de la enfermedad: diagnóstico, pronóstico, planeamiento y seguimiento del tratamiento, y recurrencia. [7]

Una de las claves para aumentar la expectativa de vida en pacientes ha sido el progreso en diagnóstico de cáncer, esto es debido a que un diagnóstico temprano mejorará los resultados de los tratamientos. [8] Existen muchas herramientas que se pueden emplear para diagnosticar el cáncer, estas van desde las pruebas de laboratorio, que se basan en la detección de determinado marcador tumoral en un análisis de sangre, orina, otro fluido corporal o biopsia, hasta análisis que utilizan la imagenología como principal herramienta.

Las técnicas más básicas para el diagnóstico por imagenología aportan únicamente información estructural, dentro de las más comunes se encuentran la tomografía computarizada por rayos X (CT), la resonancia magnética nuclear (MRI), las ecografías o los rayos X. Con la aparición de nuevas metodologías como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) aparece el término imagenología molecular, el cual se define como la visualización, caracterización o cuantificación de procesos biológicos a nivel celular y molecular en organismos vivos. [9] El objetivo es el estudio no invasivo de procesos biológicos en células, tejidos u órganos, para mejorar la detección temprana de enfermedades. [10]

Técnicas de imagenología nuclear (SPECT y PET)

Tanto el SPECT como el PET son técnicas de imagenología nuclear que utilizan radiofármacos que deben ser acumulados selectivamente en tumores y de esta forma obtener una imagen. Principalmente, se diferencian entre ellos por el tipo de emisión de los radionucleidos utilizados y la cámara empleada para la adquisición de imágenes. Usualmente los sistemas de SPECT o PET se suelen acoplar a sistemas de adquisición de tomografías computadas para obtener dos imágenes que al ser fusionadas aportan información funcional y estructural en simultáneo, de ahí los nombres SPECT-CT o PET-CT.

El SPECT, utiliza radionucleidos emisores γ siendo los más utilizados ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{67}Ga y ^{111}In , entre otros. Una de las ventajas que tiene esta técnica es el menor costo y el empleo de radioisótopos con periodos de semidesintegración que resultan adecuados para un estudio de imagen. En cambio, PET utiliza radionucleidos emisores de positrones o β^+ , por ejemplo: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu que poseen periodos de semidesintegración cortos y usualmente requieren de centros médicos asociados a la instalación productora del radionucleido. Si bien los estudios de PET-CT tienen ventajas en cuanto a su resolución, precisión y velocidad, que permite un análisis cuantitativo, los costos actuales siguen siendo superiores con relación a SPECT-CT. [11]–[13]

Además del tipo de emisión, varias características deben ser tenidas en cuenta a la hora de seleccionar un radionucleido. Una característica importante es el periodo de semidesintegración ($t_{1/2}$), que es el tiempo que se necesita para que se desintegren la mitad de los núcleos radioactivos iniciales de una muestra. Idealmente, este debe ser lo

suficientemente breve para que el paciente no se irradie más allá del estudio, pero lo suficientemente largo para poder preparar, administrar y realizar el estudio. Otra característica importante es la disponibilidad del radiofármaco, la mayoría de los radionucleidos para PET se producen en un ciclotrón y debido a su corto periodo de semidesintegración, requiere que el ciclotrón se encuentre cerca de donde se realizará el estudio aumentando los costos y complejidad para disponer de ellos. Para SPECT, el ^{99m}Tc es el radionucleido más difundido, el cual se obtiene a partir de un generador de Molibdeno-99 ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) esto lo hace más accesible para los servicios de medicina nuclear. [14] Uruguay cuenta con los dos tipos de equipos, SPECT-CT desde 1982 y PET-CT desde el año 2010.

Radiofármacos de diagnóstico

Los radiofármacos son moléculas que contienen átomos radioactivos en su estructura. El tipo de radionucleido a utilizar depende principalmente del fin, diagnóstico o terapia. Así los emisores α y β^- son utilizados para terapia, mientras que los β^+ y γ son utilizados para diagnóstico. La estructura química varía desde moléculas pequeñas a macromoléculas. También se pueden diferenciar según sus características de biodistribución, donde algunos únicamente se valen de sus propiedades químicas y físicas mientras que en otros el perfil de biodistribución es determinado por la capacidad de unirse a un receptor o por cierta interacción biológica. [15]

Con el aumento de tecnología de detección por equipos de SPECT y PET, surge el interés en desarrollar nuevos agentes de imagen. Los radiofármacos de diagnóstico no pretenden generar un efecto farmacológico, la función de estos es brindar información fisiológica y anatómica mediante la acumulación diferencial en tejidos de interés. Requieren tener una alta pureza radioquímica (PRQ), mayor a 90 %, para que no exista una mezcla de diferentes derivados del radionucleido que aumenten las señales no específicas y se utilizan en concentraciones bajas (10^{-6} a 10^{-8} M). [15]

Tecnecio-99m

El 80 % de los radiofármacos de diagnóstico se valen de las propiedades del ^{99m}Tc , este radionucleido tiene un decaimiento por transición isomérica mediante la emisión de un fotón gamma de 142 keV a ^{99}Tc con un periodo de semidesintegración de 6.01 h lo que lo

hace óptimo para la preparación del radiofármaco, administración y toma de imágenes. Posee varios estados de oxidación entre -1 y +7 donde los más estables son +7 (TcO_4^-) y +4 (TcO_2) que permiten generar diversos radiofármacos. [15]–[17]

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se obtiene, a partir del decaimiento espontáneo del ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66 \text{ h}$), en un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. La purificación se basa en la adsorción diferencial donde el ^{99}Mo es retenido en una columna de alúmina, eluyendo el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ generado, en su forma de TcO_4^- que es soluble en agua y por lo tanto es posible retirarlo de la columna utilizando una disolución de NaCl bajo la forma de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ y si las condiciones son las adecuadas se obtiene en una disolución estéril (Figura 1). [16]

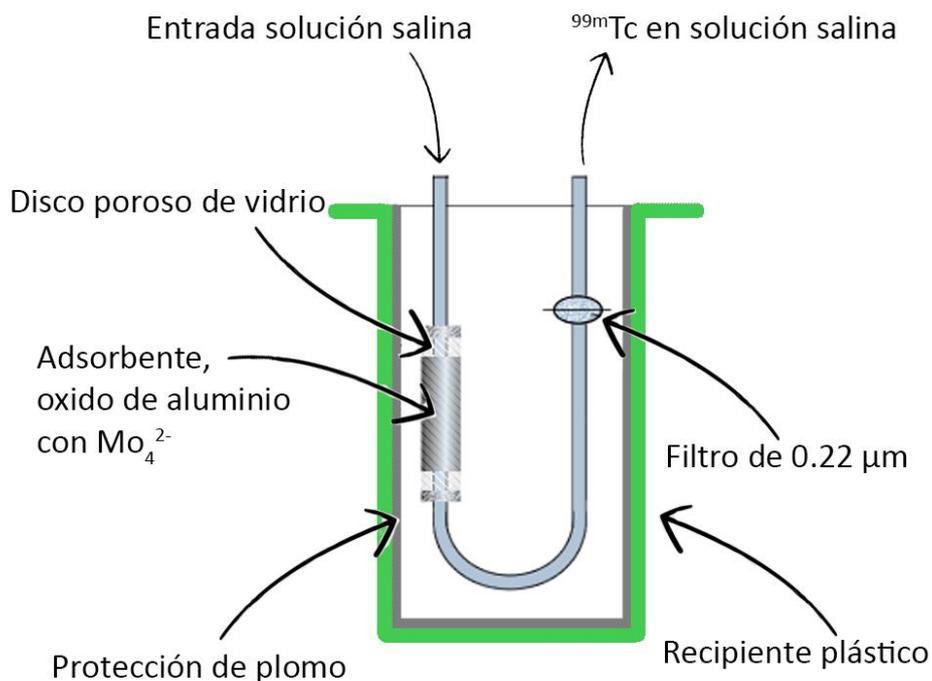


Figura 1. Esquema de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

El $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ bajo la forma de pertechnetato (+7) no forma complejos, para ello se debe reducir el estado de oxidación, comúnmente utilizando sales de Sn (Figura 2). Una vez reducido, este estado de oxidación es fácilmente reversible, por lo que debe formarse un complejo con un agente quelante para evitar estados de oxidación no deseados. [18] Otra

posibilidad es que el Tc reducido (+4) se hidrolice para generar dióxido de tecnecio hidratado ($TcO_2 \cdot H_2O$), siendo esta una impureza que puede disminuir el rendimiento del marcado, junto al Tc no reducido.

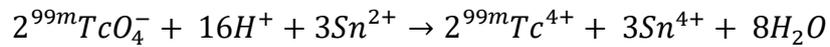


Figura 2. Ecuación química de la reducción del ion TcO_4^- a un posible estado de oxidación +4

Radiofármacos de Tecnecio-99m

En 1961 se utilizó por primera vez el ^{99m}Tc como un radionucleido útil en el diagnóstico de enfermedades. Su primera aplicación fue para medir el flujo sanguíneo y luego para el diagnóstico de cáncer de tiroides. A partir de las décadas de 70 y 80 su uso vio un crecimiento exponencial con el surgimiento de los generadores de $^{99}Mo/^{99m}Tc$. [19]

Tradicionalmente los radiofármacos de ^{99m}Tc se clasifican como de primera, segunda o tercera generación de acuerdo a su complejidad. Los de primera generación se basan únicamente en sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción particular sin que exista un proceso de interacción específico. Los más comunes son $^{99m}TcO_4^-$ en estudios de tiroides, ^{99m}Tc -coloide en estudios hepáticos, o ^{99m}Tc -fosfatos en hueso. [20]

Los radiofármacos de segunda generación, son aquellos que tienen cierta relación estructura-actividad en su diseño utilizando diferentes ligandos para formar complejos con ^{99m}Tc y son el resultado del estudio biológico de los diferentes complejos. A partir de estos estudios se desarrollan los radiofármacos basándose en sus propiedades moleculares, como tamaño, carga y lipofilia. Entre ellos se puede destacar ^{99m}Tc -MIBI en estudios de corazón, ^{99m}Tc -HMPAO en cerebro, ^{99m}Tc -MAG3 en riñón y ^{99m}Tc -mebrofenina en sistema hepato-biliar. [21]–[24]

Los de tercera generación, se valen del uso de moléculas que sirven de vector para la biodistribución *in vivo* del radiofármaco. Esto implica el diseño sofisticado para realizar el acoplamiento del radionucleido a la molécula vector, sin distorsionar las propiedades por la cual fue seleccionada. En esta etapa surgen los agentes quelantes bifuncionales, que poseen la capacidad, por un lado, de formar complejo con ^{99m}Tc y, por otro lado, acoplarse a una molécula vector. Por ejemplo ^{99m}Tc -(ácido etilendiamino-*N,N'*-

diacético/hydrazinonicotinamide)-conjugated a Tyr3-octreotida (^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-TOC) en estudios de receptores de somatostatina y ^{99m}Tc -[4-[2exo-[[[(1R)[3exo-(4-clorofenil)-8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]-oct-2-il]metil]-1,10-ditia-4,7-diazadecano($^{3-}$)]oxo (^{99m}Tc -TRODAT-1) en cerebro. [25], [26]. En la actualidad el ^{99m}Tc se utiliza para la detección de ganglio centinela, cáncer de tiroides, tumores neuroendocrinos, metástasis de huesos, cáncer de próstata, entre otros, además de otras aplicaciones no oncológicas. [27]

Agentes bifuncionales quelantes de ^{99m}Tc

Los agentes bifuncionales son moléculas capaces quelar un radiometal y de unirse covalentemente a una molécula vector directamente o a través de un conector que altere lo menos posible las propiedades fisicoquímicas de la molécula vector. La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza del radiometal, para formar un complejo estable en el entorno biológico. Existen numerosos agentes bifuncionales capaces de generar complejos con ^{99m}Tc y acoplarlo a una molécula vector.

Entre ellos el ácido *N,N*-bis[2-amino-*N',N'*-bis(carboximetil)etil]aminoacético o DTPA (Figura 3) fue desarrollado por Sundberg y colaboradores en 1974. [28] Principalmente se describe como un quelante para lantánidos e iones metálicos de transición como el Mn(II) e In(III). También tiene capacidad de actuar como ligando para ^{99m}Tc y distintos radioisótopos de Re, aunque de manera no tan eficiente.[29] El ^{99m}Tc -DTPA se ha utilizado como un radiofármaco de segunda generación, pero existen varias aplicaciones en donde se utiliza como un agente bifuncional. Una de las estrategias de acople a la molécula vector es la reacción *in situ* con una carbodiimida como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), pero la más común es la utilización del dianhídrido (a nivel de los carboximetilos) del DTPA. [30] Principalmente utilizando metales trivalentes como ^{111}In o ^{90}Y . [31], [32]

Otro quelante muy utilizado es la *N*-(2-mercaptoacetyl)triglicina (MAG3, Figura 3), utilizado tradicionalmente para estudios funcionales renales. Debido a sus buenas propiedades para quelar ^{99m}Tc , se ha utilizado el derivado de MAG3 *O*-hidroxisuccinimidil-*S*-acetilo (*S*-acetil-NHS-MAG3) como quelante bifuncional para ser acoplado a aminas. [33]

El ácido 6-hidrazinopridina-3-carboxílico (HYNIC) (Figura 3 en su forma *N*-protegida) ha sido utilizado extensamente para marcar ^{99m}Tc convirtiéndose en uno de los ligandos más

populares. Estrictamente el HYNIC no es un quelante ya que la interacción con el metal se da a través de un doble enlace diazenido, generando un complejo estable. Debido a que ocupa solo una o dos de las posiciones de coordinación posibles de la esfera de coordinación del Tc, es necesario el uso de coligandos. [34], [35] Su popularidad radica en la eficiencia del marcado en condiciones moderadas y a menudo no se requiere purificación. Además, al requerir el uso de coligandos, se puede seleccionar estos para modular la hidrofiliidad y farmacocinética del radiofármaco. [36]

Otro quelante que se ha utilizado es el 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (cyclam) (Figura 3), es un ligando que pertenece al grupo de las poliaminas macrocíclicas, esta familia de moléculas tiene la capacidad de formar complejos con varios metales de transición, en ocasiones más estables en relación a moléculas similares no lineales. El cyclam es lo suficientemente flexible y permite quelar varios metales diferentes de manera no selectiva. El uso principal de derivados del cyclam en el desarrollo de radiofármacos radica en su empleo como como quelantes bifuncionales, por lo general formando complejos altamente estables con $^{64/67}\text{Cu}$. [37], [38] Murugesan et al. sintetizaron un derivado de cyclam y porfirina el cual se marcó con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con una pureza radioquímica de 95 %. El mismo fue estable *in vivo* lo que permitió obtener relaciones tumor/músculo que duplican a radiofármacos como $^{99\text{m}}\text{Tc(V)-DMSA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-citrato}$ y $^{201}\text{TlCl}$ en la detección de gliomas y tumores de mama inducidos en ratas. Otro radiofármaco derivado de $^{99\text{m}}\text{Tc-cyclam}$ fue desarrollado por el mismo grupo con el objetivo de generar un agente de imagen para detectar tejidos hipóxicos demostrando una acumulación sitio-específica y buenas propiedades fisicoquímicas. También se han descrito derivados de péptidos o proteínas que utilizan al cyclam como quelante bifuncional, pero sin obtener buenos resultados en la eficiencia del radiomarcado de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. [39]

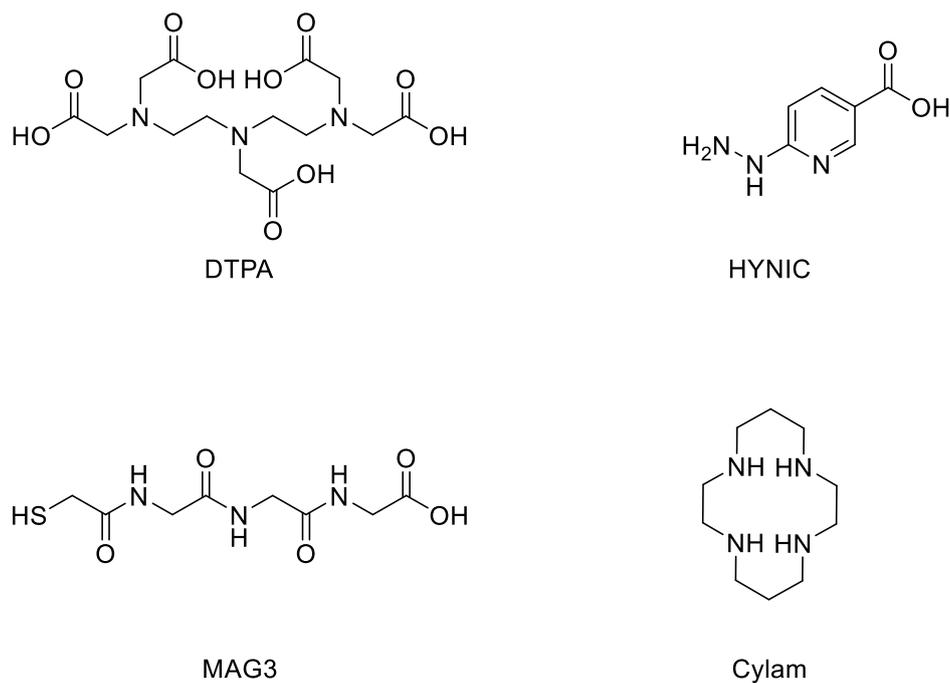


Figura 3. Estructuras de algunos quelantes de ^{99m}Tc utilizados como bifuncionales

Anticuerpos monoclonales (AcMo)

Dentro de los agentes de diagnóstico de tercera generación, la marcación directa de anticuerpos ha sido un área de estudio muy importante, además de su importancia como agentes de terapia (Figura 4). [40]

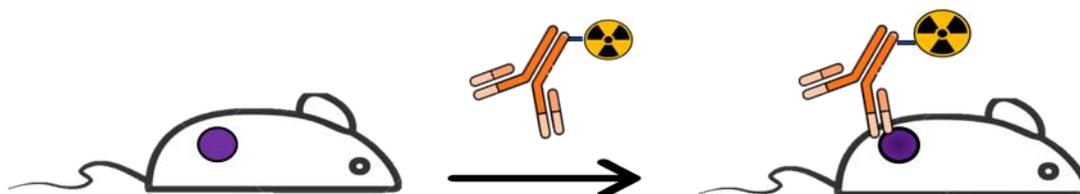


Figura 4. Estrategia de marcación directa de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son un tipo de glucoproteínas que tienen un reconocimiento específico por un sustrato, denominado antígeno. Los anticuerpos están constituidos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que conforman la unidad. Si bien todos los anticuerpos en su mayoría están compuestos con una estructura similar, se diferencian en una región llamada región determinante de la complementariedad (CDR del inglés *complementarity determining region*) que reconoce a un antígeno específico.

En roedores y humanos existen cinco isotipos de anticuerpos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), que difieren en su estructura, contenido de glúcidos y las propiedades de su cadena pesada. A su vez pueden formar dímeros, o pentámeros con otras unidades. [41]

El principal isotipo de anticuerpo son las inmunoglobulinas G (IgG), estructuralmente están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas en una forma que recuerda la letra “Y” unidas por puentes de disulfuro (Figura 5). Cada molécula tiene dos sitios iguales de reconocimiento del antígeno en cada uno de sus extremos. Desde el punto de vista funcional, se puede dividir el anticuerpo en dos regiones, la región constante (Fc, del inglés cristalizable fragment) que tiene como función la interacción con otros elementos del sistema inmune. La región variable, situada en el ápice antígeno (Fab, del inglés antigen binding fragment), es la encargada del reconocimiento del antígeno. [42]

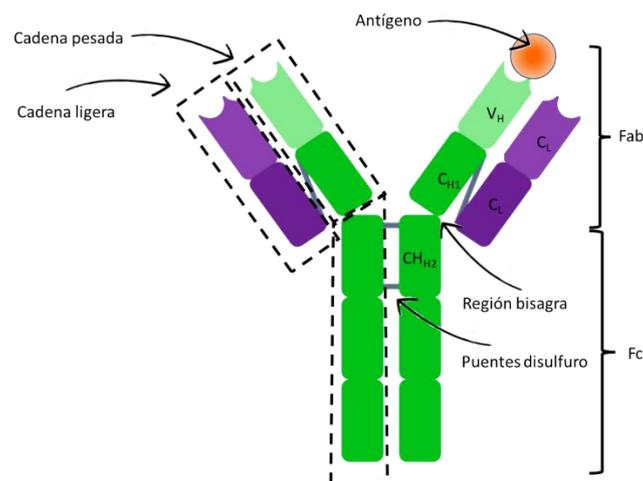


Figura 5. Estructura de una IgG

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas modificadas, diseñadas específicamente para actuar frente a dianas concretas. La expansión en su utilización se dio luego de que Khöler y Milstein en 1975 descubrieron la tecnología de la hibridoma para su producción(

Figura 6). Esto permitió obtener inmunoglobulinas específicas capaces de reconocer un único epítipo y producirlos con relativa facilidad. Brevemente, el proceso se inicia con la inmunización de un ratón con el antígeno deseado, luego de la respuesta inmune del animal, se extraen los linfocitos B y se fusionan individualmente con células de mieloma

(linfocitos B tumorales). De esta fusión surge una hibridoma, que tiene la característica de producir grandes cantidades de un único anticuerpo, y por otro lado la capacidad de multiplicarse indefinidamente. Luego de obtener diversos hibridomas, se seleccionan y se propagan los clones a partir de una única célula. La principal desventaja de esta técnica es que los anticuerpos murinos en muchos casos generan reacciones inmunogénicas adversas. [43]

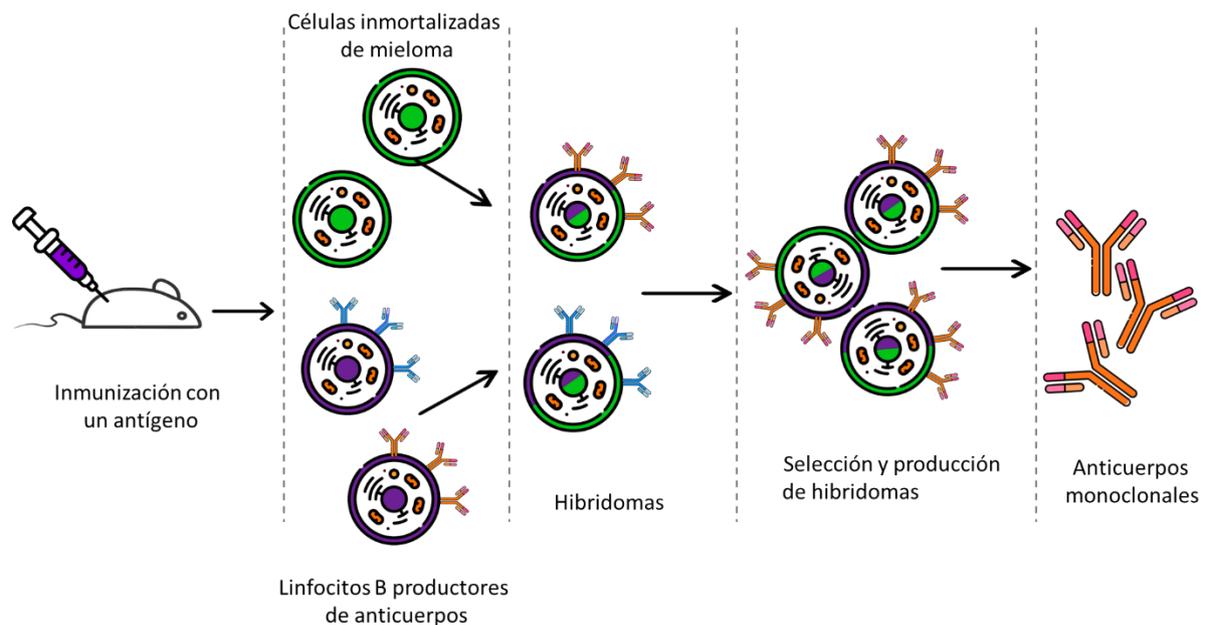


Figura 6. Producción de anticuerpos monoclonales utilizando la técnica del hibridoma

A partir de estas técnicas se han desarrollado diferentes modificaciones para evitar la inmunogenicidad, a través de la creación de anticuerpos quiméricos, humanizados o utilización de fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos quiméricos la porción variable es de origen murino y es combinada con la región constante de una inmunoglobulina humana. En cambio, en los anticuerpos humanizados es aún más limitado, solo la región CDR es de origen murino. [44]

Una de las maneras para crear anticuerpos humanizados es el uso de animales transgénicos donde se reemplazan los genes de IgG del animal con copias de genes IgG humanos. Además tiene como ventaja la maduración *in vivo* de los anticuerpos, lo que permite obtenerlos con mayor afinidad y especificidad. [45]

También es posible producir anticuerpos utilizando phage display, en este caso, se cultivan linfocitos B humanos, se aísla su mRNA y se convierte en cADN para luego amplificar las

secuencias. Estos segmentos pueden ser clonados en un vector próximos a una secuencia de un bacteriófago y son utilizados para infectar *E. coli*. Usualmente se construyen librerías de más de 1000 células, las *E. coli* secretan el bacteriófago unido a las regiones variables de los anticuerpos y se seleccionan para re inocular células de *E. coli* y así producir los fragmentos de anticuerpos deseados. [46]

En 1986 surge el primer anticuerpo monoclonal terapéutico Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®) anti CD3 de los linfocitos T en humanos, administrado para disminuir la respuesta inmune en algunos tipos de trasplante. [47] Desde ese entonces hasta la fecha, 113 anticuerpos monoclonales han sido aprobados por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) y 22 se encuentran en proceso de revisión, para el tratamiento de diversas enfermedades. [48] De todas maneras, el uso de anticuerpos en tratamiento del cáncer aún no ha logrado generar ningún medicamento revolucionario, principalmente debido al alto costo de los tratamientos y que en ninguno de los casos se ha logrado un medicamento capaz de curar la enfermedad, por ejemplo, bevacizumab extiende la vida media del paciente un 30 %. [49] Debido a esto, en la actualidad se emplean diferentes técnicas para implementar el potencial que poseen los anticuerpos como se mencionará más adelante.

Radioinmunoconjugados

Las primeras aproximaciones en la utilización de AcMo se basaron en el bloqueo de cierta actividad biológica por unión a sus blancos, por ejemplo, tirosina quinasa u otros receptores de membrana involucrados en el desarrollo neoplásico. En las últimas décadas los principales resultados se han logrado con el desarrollo de AcMo conjugados a diferentes entidades químicas. Entre ellos, el acople a radionucleidos es una de las posibles estrategias para generar agentes de terapia o diagnóstico. [50] Los primeros radioinmunoconjugados se obtuvieron en 1974 cuando se acopló ¹³¹I a anticuerpos policlonales contra el antígeno carcinoembrionario para la detección de cáncer. [51] Recién dos décadas después, en 1996 se aprueba el uso del AcMo murino, ¹¹¹In-capromab pendetide para ser usado en diagnóstico de cáncer de próstata. Recién en el 2002 la FDA aprueba el ibritumomab tiuxetan (Zevalin; Biogen Idec Inc). El primer anticuerpo radiomarcado con un emisor beta, ⁹⁰Y, para tratamiento de cáncer, un anticuerpo quimérico anti-CD20. [52]–[54]

La principal característica farmacocinética que poseen los anticuerpos es su larga vida media, alcanzando su máxima concentración en plasma entre 3 a 7 días con una biodisponibilidad de 50 a 90 %, esto se debe a que el mecanismo de eliminación radica en el catabolismo celular para fragmentar los anticuerpos a aminoácidos. [55], [56] Esto tiene especial relevancia en el caso de anticuerpos conjugados a radionucleidos para diagnóstico, o aún peor, para terapia, donde se busca que los órganos no blancos reciban una dosis lo más baja posible. [57] Para ello existen estrategias para reducir los tiempos de circulación, como por ejemplo alterar el receptor neonatal de Fc que es responsable por los niveles de IgG en sangre, esto acelera la eliminación rápida de la sangre, pero reduce la recirculación del Ac, lo que lleva a una menor acumulación en el tumor. [58]–[60] Otra alternativa es el uso de fragmentos de anticuerpo de entre 15 y 110 kDa, la rápida eliminación que poseen permite utilizar radionucleidos de vida más corta en relación a los típicamente utilizados con anticuerpos completos reduciendo la dosis empleada. De todas maneras, esta rápida farmacocinética, tiene la desventaja de una baja acumulación en el tumor y una alta dosis en los riñones debido a la eliminación renal. [61]

Estos diferentes tipos de aproximaciones logran generar un anticuerpo que puede tener buenas características para ser utilizado como agente de terapia, pero no de diagnóstico. En la práctica, la utilización de anticuerpos monoclonales para únicamente confirmar la ubicación de los tumores no es habitual, sino que el principal interés de estos es la estimación de la dosimetría para el uso de tratamientos o para asegurar que el anticuerpo no tenga una biodistribución alterada. Para este objetivo el radioinmuno-conjugado utilizado para diagnóstico tiene que tener similar distribución y eliminación que el utilizado para terapia. [62]

Estrategias de marcación pre-dirigida

Como una alternativa para resolver los problemas relacionados a la farmacocinética de los anticuerpos distintos autores como Reardan et al., Goodwin et al. y Hnatowich et al. plantearon las primeras aproximaciones en el uso de una marcación pre-dirigida, esto es, administrar por un lado el anticuerpo, permitir que circule, se acumule en el tumor y se elimine, y luego administrar el radiomarcado para que éste se una al anticuerpo en un segundo paso. Este radiomarcado generalmente tiene una eficiencia de marcado superior y

tiempos de circulación más rápidos en relación al anticuerpo. De esta manera se logra que el radionucleido escape del sistema vascular rápidamente y se elimine de cuerpo, pero también sea capturado dentro del tumor por los anticuerpos pre-localizados, esto permite aumentar la relación tumor/señal de fondo y disminuir la dosis no específica. [63]–[65]

Se han desarrollado cuatro enfoques principales para lograr la marcación pre-dirigida, Hnatowich et al. describió un sistema que utiliza avidina-biotina (Figura 7). [63] La estrategia consiste en inyectar un conjugado de avidina-IgG o estreptavidina-IgG para que luego se administre biotina radiomarcada. Alternativamente se utilizó tanto el IgG como el radiomarcado acoplado a biotina, y estos son unidos a través de avidina o estreptoavidina. [49],[64],[65] Una de las limitaciones, es que la avidina y estreptoavidina son proteínas no humanas, y por lo tanto pueden llevar a respuestas inmunes adversas. [58]

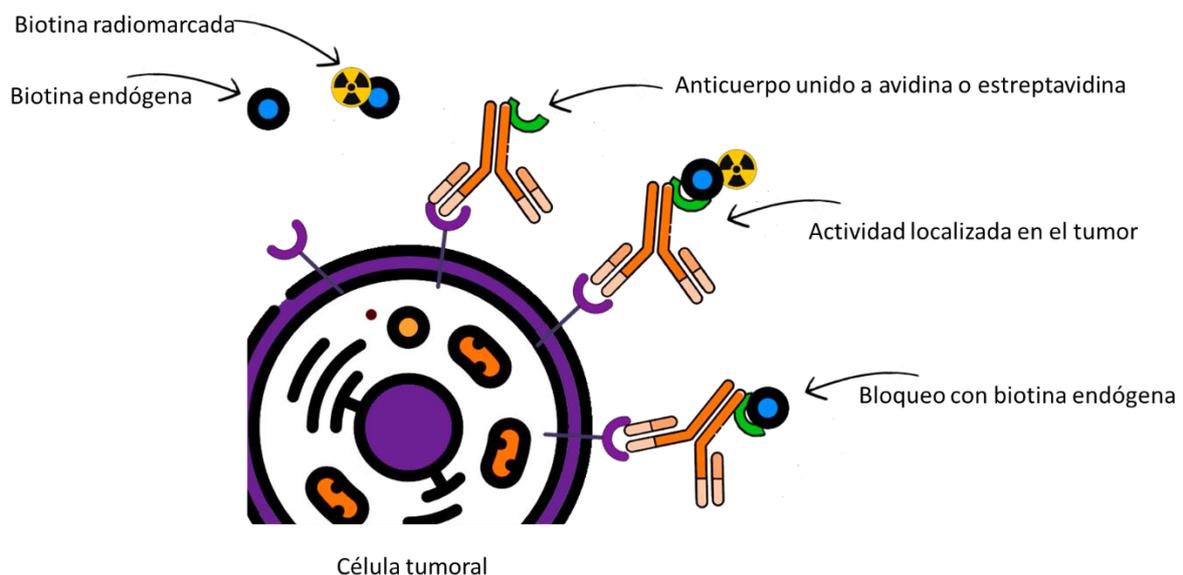


Figura 7. Estrategia pre dirigida utilizando el par biotina-avidina

Otra aproximación es la utilización de anticuerpos biespecíficos, los cuales tienen afinidad por un antígeno tumoral y también por un hapteno radiomarcado (Figura 8).

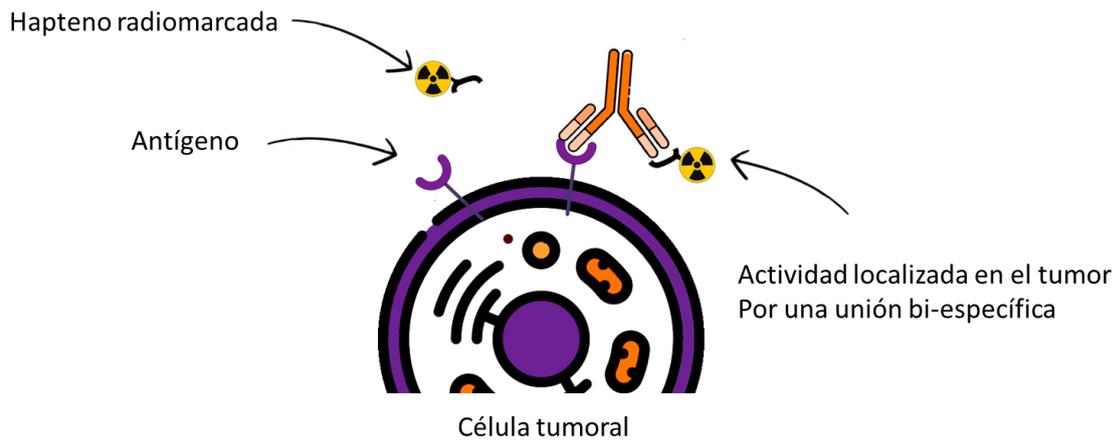


Figura 8. Estrategia de marcación pre-dirigida utilizando anticuerpos biespecíficos

La tercera estrategia es la utilización de oligonucleótidos complementarios, uno en el AcMo y otro en el quelante bifuncional, al administrarlos se unen entre sí de manera específica y selectiva (Figura 9). Por último, la utilización de reacciones del tipo *click chemistry* en donde el anticuerpo y el quelante tienen dos entidades químicas que reaccionan covalentemente entre sí, en una reacción química rápida y selectiva. [68] Este tipo de procesos será discutido en la siguiente sección.

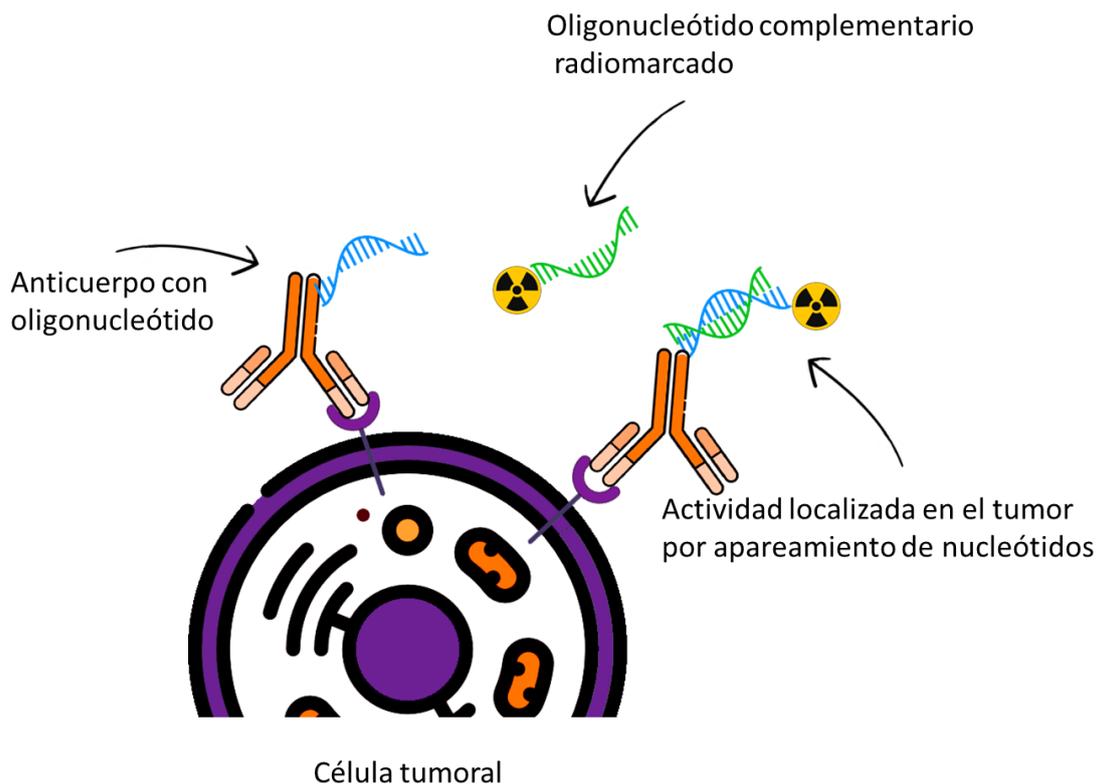


Figura 9. Estrategia de marcación pre-dirigida utilizando oligonucleótidos complementarios

Reacciones bioortogonales – *Click chemistry*

La química bioortogonal involucra diferentes tipos de reacción que tienen lugar en entornos biológicos sin afectar o interferir con otras biomoléculas presentes.

Gran parte de las reacciones bioortogonales se basan en el concepto de “*click chemistry*”, el cual fue postulado inicialmente por Sharpless en el 2001, se trata de una operativa química en la que dos entidades moleculares sencillas reaccionan en forma rápida y específica, sin importar el entorno donde suceda la reacción, para generar estructuras más complejas.

El término *click chemistry* se define como reacciones modulares de alto rendimiento, fáciles de realizar, que pueden, o no, incluir reacciones con grupos funcionales comúnmente hallados en biomoléculas, como por ejemplo alquilaciones y adiciones de conjugación a cisteínas que han sido métodos clásicos de modificación selectiva de proteínas. [69]

El concepto de química bioortogonal fue definido, posteriormente a la definición de Sharpless, por Bertozzi et al. en 2004 quienes plantean el desafío de realizar reacciones

químicas dentro de los organismos vivos implicando reacciones cuyos componentes reaccionen selectivamente entre sí, siendo inertes a las funcionalidades químicas presentes en entornos biológicos. Además, las mismas deben transcurrir de forma eficiente, en un medio acuoso y muchas veces en ausencia de catalizadores, obteniéndose un producto de reacción que suele ser estable y no citotóxico. [68], [69]

Un reactivo bioortogonal consiste en una entidad que se incorporará a la molécula en estudio para que reaccione de forma muy selectiva, formando un enlace covalente con otro grupo funcional complementario contenido, en el caso de diagnóstico, en una sonda, radioactiva o fluorescente. El reactivo bioortogonal y este segundo grupo funcional complementario no deben reaccionar con grupos funcionales biológicos no deseados. Estas características son compatibles con la estrategia pre-dirigida ya que se conserva el concepto del proceso en dos etapas. Tanto el reactivo bioortogonal unido a la molécula vector como el grupo funcional contenido en la sonda de imagen deben disponer de estabilidad metabólica, reaccionar entre sí rápidamente y en ausencia de catalizadores, en un medio acuoso, a pH y a temperatura fisiológicos. Adicionalmente, es deseable que los grupos funcionales generen mínimos cambios estereoelectrónicos de forma que puedan ser unidos a biomoléculas, de forma química o biosintética, causando la mínima perturbación estructural de las mismas.

El factor más importante para la aplicación de una reacción bioortogonal es la cinética. La mayoría de las reacciones utilizadas presentan una cinética de segundo orden, por lo que la velocidad depende de la concentración de ambos reactivos. Esto es contraproducente ya que la concentración de las biomoléculas *in vivo* es muy baja, por ejemplo, los anticuerpos tienen constantes de afinidad por sus antígenos en el orden de 10^{-9} M^{-1} , por lo que se los utiliza a bajas concentraciones. Por otra parte, la mayoría de las reacciones bioortogonales descritas hasta el momento presentan constantes de segundo orden entre 10^{-4} y $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que implica que el segundo reactivo bioortogonal deberá ser usado a una concentración en el orden de 10^{-3} a 10^{-6} M y a estas concentraciones la solubilidad y la toxicidad de las moléculas comienzan a ser influyente. [72]

La primera reacción bioortogonal utilizada fue la reacción de Staudinger entre azidas y fosfinas dando lugar a la formación de aminas y óxidos de fosfinas a través de un intermedio de iminofosforano (Figura 10). Los azidas son un grupo funcional pequeño, bioortogonal y

biocompatible que es fácilmente acoplado a biomoléculas y reaccionan con buena selectividad con las fosfinas. A partir de esta reacción, el grupo de Bertozzi la modificó para poder ser utilizado en la unión de dos moléculas, incorporando una trampa electrofílica en la fosfina. Debido a la proximidad entre estas, el iminofosforano reacciona con la trampa para generar la unión amida que conecta a los dos reactivos. Si bien el descubrimiento significó un muy significativo aporte, que le debió a Carolyn Bertozzi el premio Nobel en Química en 2022, el mayor inconveniente que tienen estos tipos de reacciones es su cinética lenta. [73]–[75]

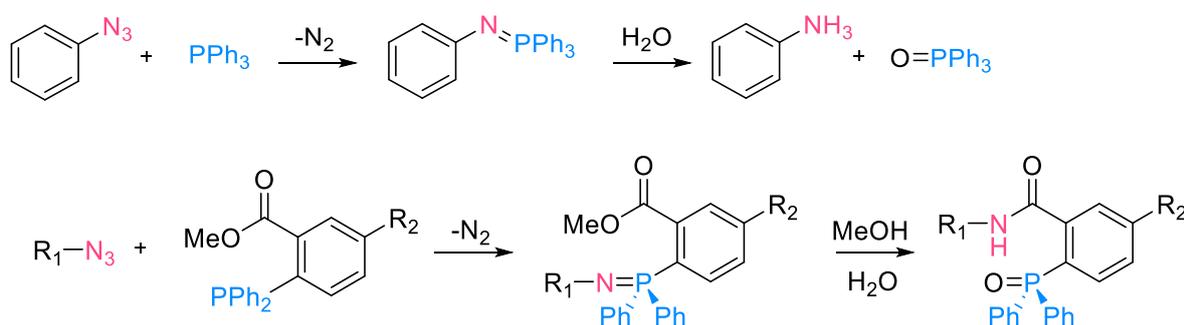


Figura 10. Arriba, reacción de Staudinger entre azidas y fosfinas. Abajo, modificación a la reacción de Staudinger

Otro tipo de reacciones bioortogonales son las cicloadiciones entre azidas y alquinos para producir un [1,2,3]triazol propuestas por A. Michael y estudiadas por Huisgen. Estas reacciones sin presencia de un catalizador tienen una baja velocidad a temperatura y condiciones fisiológicas. Sharpless y Meldal describieron que la adición de cobre (I) como catalizador incrementa altamente la velocidad y regioselectividad de la reacción (CuAAC). De todas maneras, el uso de cobre en sistemas biológicos no es trivial, por un lado, el Cu (II) utilizado causa estrés oxidativo en las células mientras que el Cu (I), necesario para la reacción, se oxida rápidamente lo que requiere el agregado de agentes reductores como el ascorbato, lo que también influye en la citotoxicidad de la reacción (Figura 11).

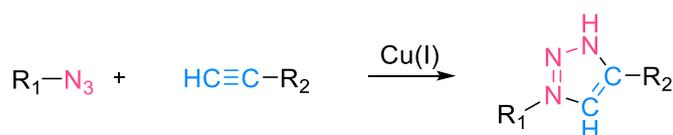


Figura 11. Reacción de cicloadición entre azidas y alquinos

A partir de la búsqueda de nuevas reacciones independientes de catalizadores de cobre, los alquinos terminales se reemplazaron por alquinos cíclicos, por lo general un ciclooctino. Estos alquinos están altamente tensionados porque los orbitales *sp*, que deberían estar orientados a 180°, se encuentran ligeramente en ángulo, para formar el anillo que los contiene. Esta tensión hace que se incremente la reactividad. Las reacciones no lograron ser tan rápidas como las CuAAC, por lo que se ensayaron varios sustituyentes en el ciclooctino (Figura 12). Si bien se logró aumentar la velocidad en las reacciones, las moléculas ahora formadas eran más voluminosas, lo que limitó su aplicación para ser utilizadas en biomoléculas.

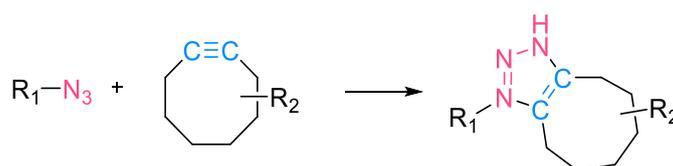


Figura 12. Reacción de cicloadición entre azidas y alquinos tensionados

Acoplamiento utilizando tetrazinas

Hace décadas que se conoce la rápida velocidad con la que el *trans*-cicloocteno reacciona con [1,2,4,5]tetrazinas (Tz), esta es entre 1 y 3 órdenes de magnitud superior en comparación a otros dienófilos derivados del norborneno, ciclopropeno, ciclooctino. En cambio, el *cis*-cicloocteno es 7 órdenes menos reactivo. [74], [75]

Los primeros en describir la reacción como herramienta de estrategia bioortogonal fueron Blackman, et al. Se trata de una reacción entre una [1,2,4,5]tetrazina y un dienófilo, seguida de una eliminación de nitrógeno gaseoso a través de un mecanismo de reacción de Diels-Alder de demanda inversa [4+2] (IEDDA, por sus siglas en inglés, *inverse electron demand Diels-Alder*) seguido de una reacción de retro-Diels-Alder para formar una dihidropiridazina. Esta reacción transcurre a altas velocidades, $k = 2000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 13). [76], [77]

La rápida cinética de esta reacción hace que sean posibles las aplicaciones *in vivo*, de todas maneras, no todas las tetrazinas desarrolladas son estables en disoluciones acuosas o en presencia de tioles, donde las más reactivas son las menos estables. Algunas tetrazinas sustituidas como la monometil[1,2,4,5]tetrazina, mostraron tener buena estabilidad sin comprometer demasiado la velocidad de reacción IEDDA.

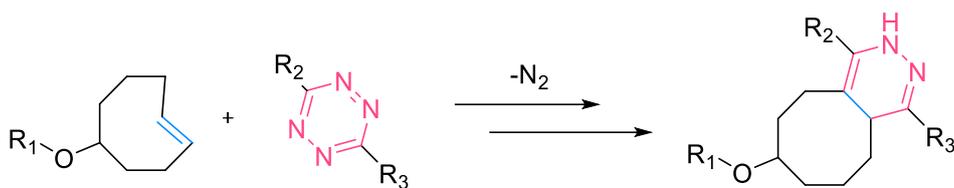


Figura 13. Reacción general entre tetrazinas y trans-cicloocteno

En la búsqueda de tetrazinas a utilizar en la reacción bioortogonal, se han explorado diversas funcionalizaciones que pueden variar la velocidad de reacción hasta 10 órdenes. Por ejemplo, [1,2,4,5]tetrazina-3,6-dicarboxilato de dimetilo y 3,6-bis(trifluorometil)[1,2,4,5]tetrazina (Figura 14) demostraron tener constantes de reacción superiores a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sin embargo esta alta reactividad está acompañada con la imposibilidad de utilizarlas en buffers o en medios biológicos debido a que son altamente deficientes en electrones lo que las convierte en demasiado reactivas. De todas maneras, varias tetrazinas se han probado en condiciones fisiológicas (Figura 14), entre ellas las más reactivas son las heteroaril-sustituidas. [78], [79] De velocidad más lenta las alquil-aril tetrazinas muestran constantes en el orden entre 10 y $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en comparación a las tetrazinas mono-sustituidas son ligeramente más reactivas debido a que tienen menor impedimento estérico observando valores entre 10^2 y $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. [82]–[84] Por último las tetrazinas sustituidas con dos cadenas alquílicas son las que menor reactividad presentan debido a que el efecto electrón dador resulta en un LUMO más elevado. [83], [84] Como se mencionó, una cinética alta no es sinónimo de éxito, generalmente un incremento en la reactividad está asociado con una disminución en la estabilidad, volviéndose susceptibles a la degradación en condiciones fisiológicas y siendo reactivas con cisteínas. [87]

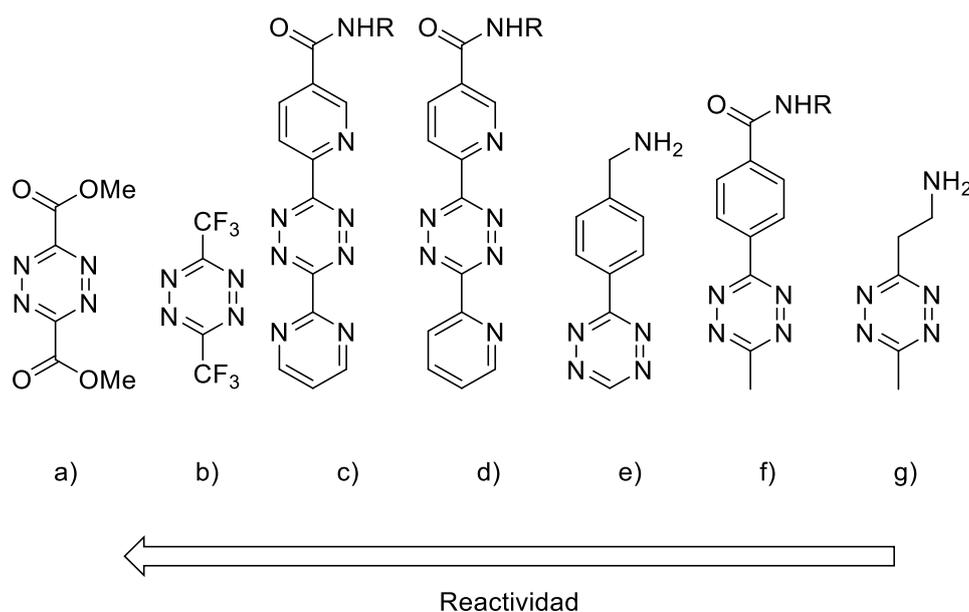


Figura 14. Principales derivados de tetrazina utilizados en reacciones bioortogonales ordenadas según reactividad (de mayor a menor, de izquierda a derecha)

Por otra parte, se debe tener en cuenta los parámetros fisicoquímicos de la tetrazina, los primeros estudios que exploraron la relación entre las propiedades fisicoquímicas y los resultados en estrategias pre-dirigidas fueron realizados por Keinänen et al. En su trabajo propusieron que una tetrazina de baja lipofilia y rápida eliminación sería beneficiosa para obtener buenos resultados. Esto fue confirmado con tetrazinas glicosiladas radiomarcadas con ^{18}F , demostrando que incorporar espaciadores polares favorecía la estrategia. [86], [87] Finalmente el tema fue estudiado por Zeglis et al. describiendo los principales parámetros a tener en cuenta para los estudios pre-dirigidos *in vivo*. En el trabajo de Zeglis et al. se sintetizaron 25 tetrazinas con el objetivo de identificar cuáles de los parámetros eran claves para lograr un buen perfil farmacocinético *in vivo*. Observaron que la carga de los radiofármacos derivados de Tz tenía una influencia importante en la biodistribución, donde cargas netas altas (positivas o negativas) reducían, como era de esperar, las lipofilias y por ende los tiempos de circulación en sangre, compuestos con carga neutra mostraban alta absorción en hígado e intestinos. Por otro lado, el uso de residuos aminoacídicos como espaciadores tiene mejor capacidad moduladora que fragmentos repetitivos etiloxi (que llamaremos PEG en este trabajo), en especial la incorporación de aminoácidos de lisina fomenta la eliminación renal de la molécula. Por último, afirman que la captación tumoral está principalmente determinada por el tiempo de vida media en plasma del radioligando, este tiene que ser lo suficientemente alto (mayor a 10 min) para permitir la acumulación en

el tumor. De todas maneras sus resultados no son concluyentes y plantean que el objetivo es encontrar un punto medio en donde se module la vía de excreción, con la acumulación en el tumor y el tiempo de vida media en el plasma. [90]

En cuanto a la cinética de la reacción, la elección del dienófilo también es crucial para obtener una reacción de cinética elevada. Para ello, la tensión del anillo es el parámetro crítico que modula la reactividad, el dienófilo sintetizado que presenta mayor velocidad es el *trans*-cicloocteno (Figura 15) fusionado con un anillo que es capaz de reaccionar con una constante de 10^5 a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la principal limitante que presenta es que rápidamente se isomeriza a la forma *cis* disminuyendo la tensión del anillo. [91] El más utilizado de es el *trans*-cicloocteno (TCO), que, por ejemplo, reacciona con dipiridiniltetrazinas con una constante entre 10^4 a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y presenta una buena estabilidad en medios biológicos. [78] Cuando el TCO es funcionalizado puede variar su reactividad, siendo 10 veces menos reactivo si la funcionalización, responsable de la reacción con la molécula-vector, se encuentra preferencialmente en posición ecuatorial (Figura 16). [92]

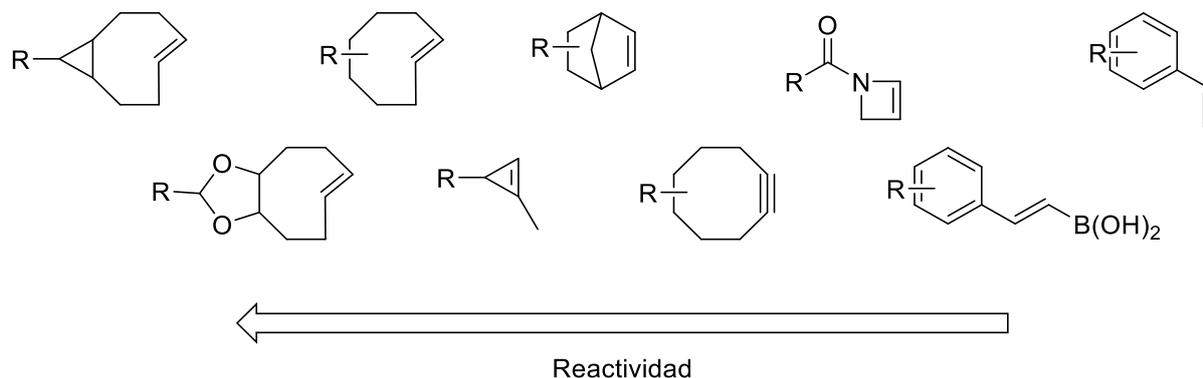


Figura 15. Diferentes dienófilos utilizados para reaccionar con tetrazinas

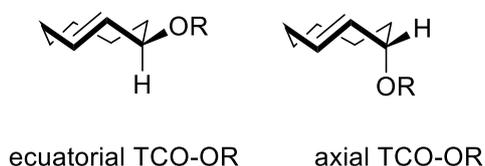


Figura 16. Estereoisómeros del *trans*-cicloocteno-OR

Aplicaciones de química bioortogonal utilizando tetrazinas y TCO

Después del descubrimiento de las reacciones entre tetrazinas y TCO la primera prueba de concepto realizada fue en 2010 [93] utilizando el anticuerpo CC49 modificado con TCO (CC49-TCO). Para ello a ratones portadores de tumores LS174T se le administró el anticuerpo CC49-TCO y luego de 24 h se administró una tetrazina radiomarcada con ^{111}In que presenta una constante de velocidad de $27.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ cuando reacciona con el TCO en PBS a 37°C (Figura 17). Se realizó un SPECT/CT, resultando en una estrategia que fue altamente efectiva, obteniendo un 4.2 % DI/g de tumor y una relación tumor/músculo de 13.1. A partir de ello surgieron muchos trabajos utilizando diferentes sistemas de quelantes, radionucleidos, derivados tetrazinas, o vectores modificados con TCO.

Si bien sólo alguno de los sistemas mostró la eficiencia suficiente como para trasladarlo a la clínica, en todos se ve que sucede la reacción TCO-Tz confirmando que esta estrategia tiene un potencial como herramienta para una marcación pre-dirigida. En 2022, Carolyn Bertozzi junto a Morten Meldal y Barry Sharpless obtuvieron premio nobel de la química por sus trabajos en *click chemistry* y la química bioortogonal.

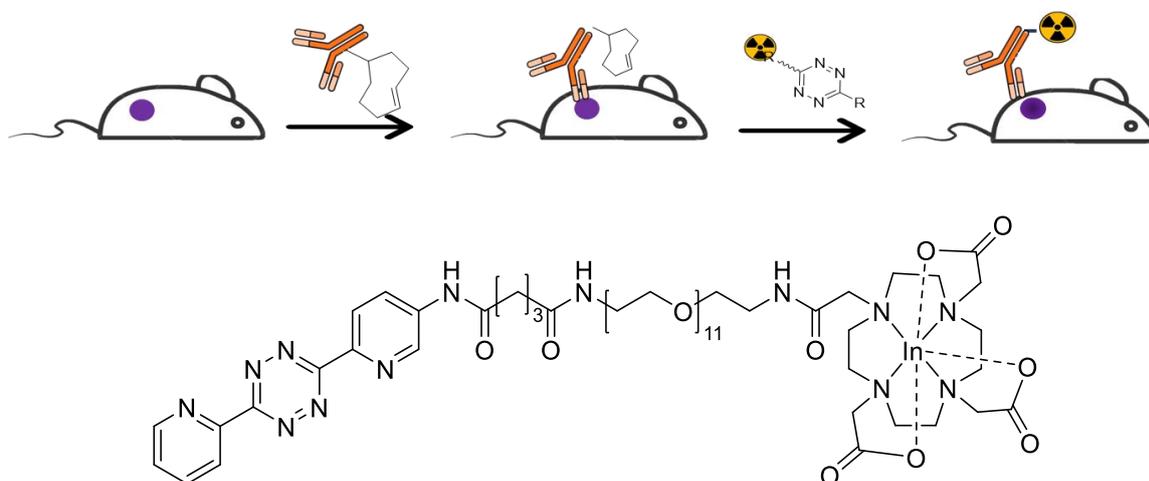


Figura 17. Arriba, esquema de la reacción bioortogonal utilizada por Rossin et al. Abajo, Derivado de tetrazina quelante de ^{111}In utilizado.

Uno de los primeros trabajos en explorar la estrategia de bioconjugación en estudios PET fue el de Weisleder en 2012 donde se utilizó el anticuerpo humanizado A33 acoplado a TCO (A33-TCO) para identificar el antígeno A33 presente en el 95 % de cánceres colorrectales. Se administró A33-TCO para permitir su circulación por 24 horas, pasado dicho tiempo se administró polímeros derivados de dextranos acoplados a tetrazinas, marcadas con ^{18}F o

con fluoróforos, confirmando que la reacción ocurre a nivel celular y sistémico. [94] Casi en simultáneo se publica una estrategia similar, utilizando ^{64}Cu -NOTA-Tz (Figura 18) y el mismo anticuerpo modificado, realizando estudios de biodistribución y PET. Se obtuvieron imágenes en donde se identificaban los sitios con tumores. En comparación con la utilización directa de A33, la estrategia pre-dirigida mostró mejor actividad en el tumor y si bien la dosis obtenida en el tumor fue menor también lo fue en los tejidos no específicos. [95]

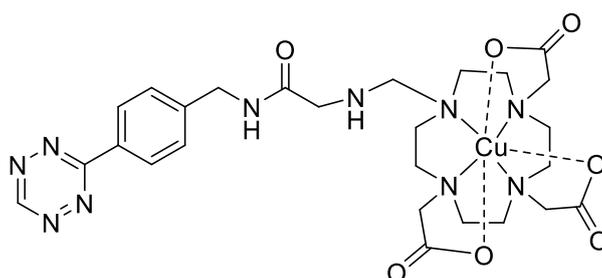


Figura 18. Derivado de tetrazina quelante de ^{64}Cu desarrollado por Lewis et al. para PET

Rápidamente, en búsqueda de explorar las posibles aplicaciones, se estudió la utilización de una tetrazina marcada con ^{177}Lu para ser aplicada en radioterapia, donde luego de la optimización de la tetrazina con características adecuadas se observó un efecto terapéutico dependiente de la dosis inyectada de tetrazina radiomarcada. [90], [94]

En nuestro grupo de trabajo se realizó una de las primeras publicaciones en donde se utilizó $^{99\text{m}}\text{Tc}$ acoplado a una tetrazina para una estrategia pre-dirigida a ser utilizada como método de diagnóstico de cáncer. Para ello se sintetizó una tetrazina acoplada a HYNIC y se radiomarcó con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CH₃-Tz-Hy en la Figura 19 se muestra el agente coordinante, molécula a) y para la reacción bioortogonal se utilizó el AcMo CC49-TCO. Si bien se pudo confirmar la reacción *in vivo* y se pudo identificar el tumor, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CH₃-Tz-Hy mostró tener alta captación en intestinos, riñón e hígado. [97] Casi en simultáneo Valliant et al. estudiaron regiones con alto metabolismo de calcio, utilizando bifosfonato acoplado a TCO, o vancomicina-TCO para realizar imágenes de infecciones con *Staphylococcus aureus*, utilizando un derivado de tetrazina similar (HYNIC-Tz-H, Figura 19, molécula b). [96], [97]

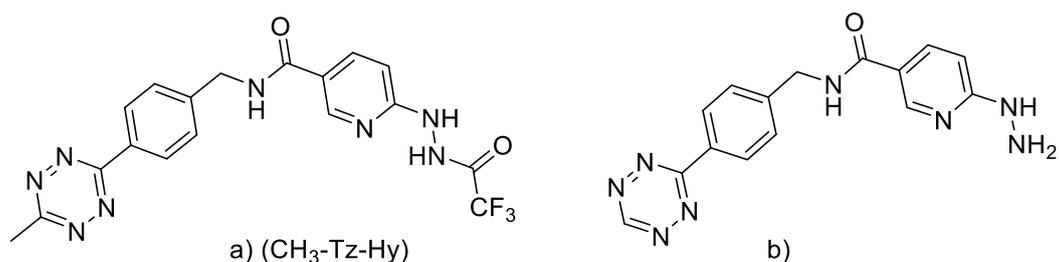


Figura 19. Primeros derivados de tetrazina quelantes de ^{99m}Tc.

A partir de los resultados obtenidos en nuestro grupo con el derivado ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy, se propuso como objetivo aumentar hidrofiliía del derivado de Tz para fomentar la eliminación por vía renal, disminuyendo la alta captación en intestinos, riñón e hígado, por lo que se sintetizaron dos derivados. Uno de ellos contiene un fragmento de cuatro unidades de etiloxi (Figura 20, molécula a) entre el fragmento de tetrazina y el de HYNIC. El otro derivado incluyó el agregado de un fragmento polipeptídico constituido por aminoácidos hidrofílicos (Gly-Arg-Glu-Arg-Glu-Lys) (Figura 20, molécula b). Además, este último compuesto poseía la tetrazina sin el metilo en la posición 6, para mejorar la reactividad en la reacción IEDDA. [100] Los radiomarcados generados con estos ligandos presentaron ciertas desventajas, como conservar la acumulación en órganos no-blaco para el derivado de PEG o la alta acumulación renal para el derivado polipeptídico.

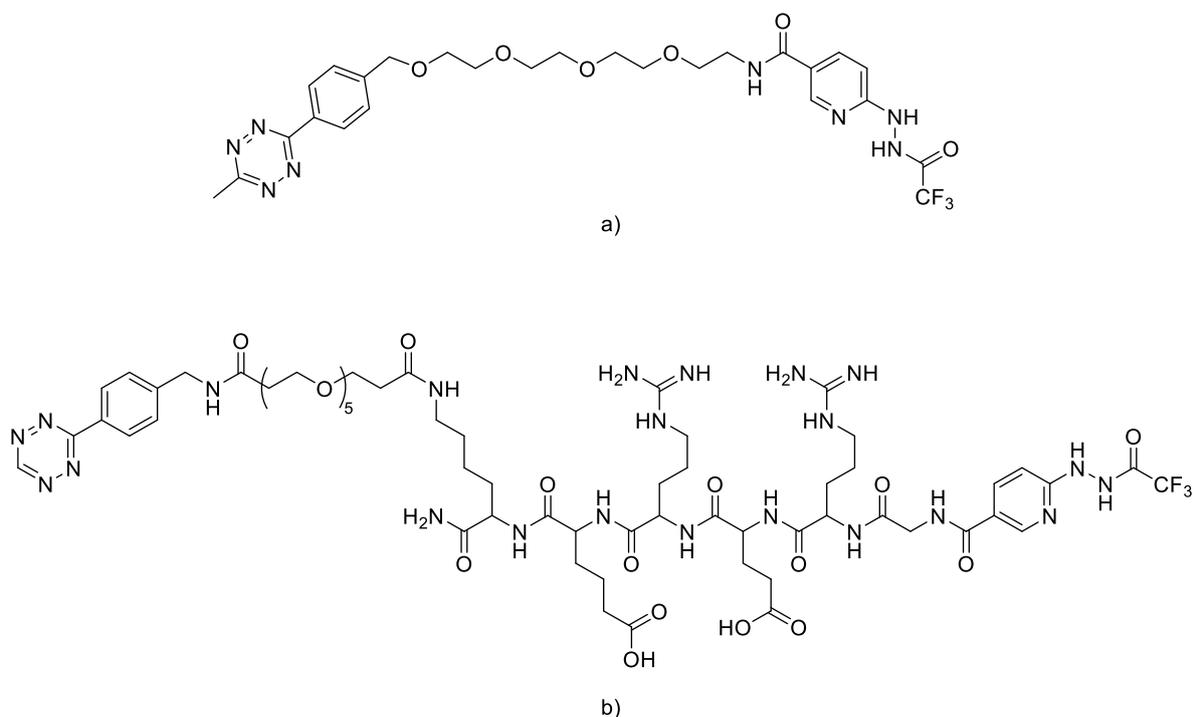


Figura 20. Derivados de tetrazina-HYNIC sintetizados en la tesis doctoral de Dra. M^o. Fernanda García

A la fecha, se han explorado otras estrategias con el objetivo de desarrollar derivados de Tz para diagnóstico de cáncer por procesos bioortogonales. Por ejemplo, el uso de Tecnecio-99m en estado de oxidación (I) utilizando derivados de tetrazina acoplados a bipyridina o imidazol (Figura 21). [97], [99], [100]

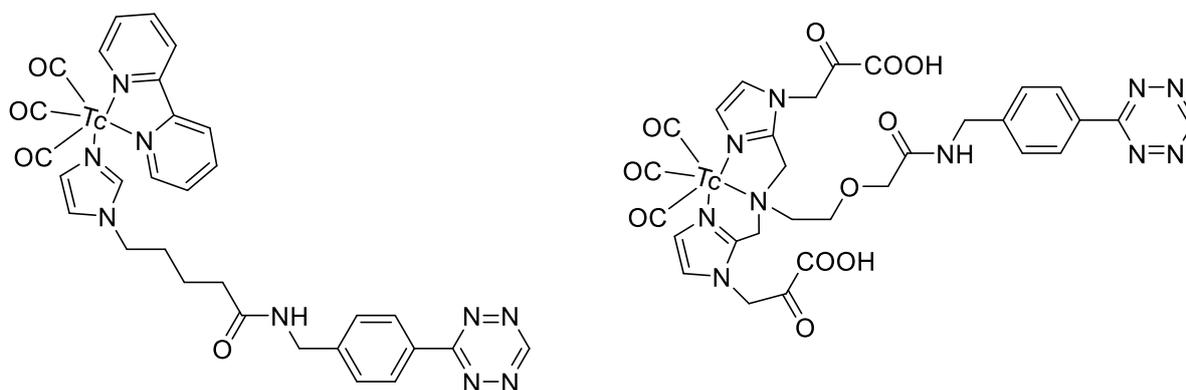


Figura 21. Derivados de tetrazina quelantes de Tecnecio-99m (I)

Recientemente la FDA ha aprobado el primer ensayo clínico de Fase I basado en profármacos contra el cáncer, los cuales son activados mediante una reacción basada en la cicloadición de tetrazina-TCO. [103] Si bien el objetivo de esta estrategia no es estrictamente el mismo que las estrategias de diagnóstico en las que se centra esta tesis, es un hito prometedor para el desarrollo de estrategias contra el cáncer que se valen de una reacción bioortogonal.

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis de Maestría es la búsqueda de nuevas estrategias de marcación con ^{99m}Tc para el desarrollo de agentes de imagen molecular con aplicación en Medicina Nuclear, explorando en el campo de las reacciones bioortogonales utilizando fragmentos estructurales derivados de Tz y TCO

Capítulo I

Agentes de imagen derivados de cyclam y de DTPA

Objetivos específicos

En el Capítulo I se describen las estrategias exploradas para sintetizar derivados de tetrazina utilizando los quelantes cyclam y DTPA, para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y sintetizar derivados de Tz con un perfil adecuado para su uso en estrategias de diagnóstico por reacciones bioortogonales.
- Establecer condiciones de marcación con ^{99m}Tc para los derivados sintetizados.
- Estudiar las principales propiedades fisicoquímicas, tales como estabilidad y coeficiente de reparto de los radiomarcados.
- Estudiar la reacción de cicloadición *in vitro* utilizando bevacizumab como modelo de AcMo.
- Estudiar la biodistribución *in vivo* de los radiomarcados y comparar los resultados obtenidos con los correspondientes complejos de otros derivados de Tz sintetizados previamente.

Antecedentes y Fundamentos

En la tesis doctoral de la Dra. María Fernanda García se estudió, por primera vez en Uruguay, una estrategia pre-dirigida utilizando el par Tz/TCO con fines de diagnóstico de cáncer. En ella, se estudiaron los primeros sistemas probando diferentes biomoléculas conjugadas a TCO. Como contraparte bioortogonal, se sintetizaron tres derivados de tetrazinas que en su estructura contienen el quelante de ^{99m}Tc , HYNIC (Figura 20). Estos fueron marcados de manera eficiente y se comprobó que reaccionaban de forma selectiva con las moléculas de TCO acopladas a un anticuerpo, para estas moléculas se realizaron estudios de biodistribución, estudios de reacción bioortogonal *in vivo* e imágenes de SPECT-CT de ratones con modelos tumorales. [97], [100], [104]

Las moléculas sintetizadas fueron diseñadas siguiendo como guía los resultados biológicos. En principio se obtuvo el derivado (a) de la Figura 20 que sirvió como prueba de concepto en donde se pudo observar la localización del tumor en un estudio de SPECT-CT. A pesar de los buenos resultados, se observó acumulación no específica gastrointestinal y hepática, lo que elevaba los niveles de señal de fondo y disminuía la relación tumor/señal de fondo. Esto llevó a pensar que la incorporación de conectores hidrofílicos entre el fragmento de tetrazina y el de HYNIC daría lugar a una eliminación renal más rápida, mejorando las propiedades farmacocinéticas de la molécula radiomarcada. Para ello se seleccionaron dos conectores, uno que incorpora un fragmento PEG y el otro con un fragmento polipeptídico constituido por argininas y glutaminas acopladas a la Tz a través de un fragmento derivado de PEG (Figura 20). Entre ellos, este último demostró tener mejores propiedades para ser utilizado en un segundo paso de una estrategia bioortogonal. [104], [105]

A partir de la confirmación que un derivado más hidrofílico provoca mejoras en la visualización tumoral en las imágenes obtenidas, en la presente tesis se planteó obtener derivados con un diseño más sencillo, es decir Tz pequeñas que sean hidrofílicas. Para ello, de los muchos quelantes que existen en la literatura, se seleccionaron como quelantes de ^{99m}Tc el sistema 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano presente en cyclam y el sistema *N,N',N''*-tris(carboximetil)-1,4,7-triazaheptano presente en DTPA.

En cuanto a la elección del anticuerpo, se eligió trabajar con bevacizumab, un anticuerpo recombinante monoclonal humanizado el cual reconoce al factor de crecimiento del

endotelio vascular (VGEF por sus siglas en inglés). VGEF se localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos, ya que es un factor clave en la angiogénesis por lo que se ve sobreexpresado en el tejido tumoral. Bevacizumab se une al VEGF soluble previniendo la unión con su receptor e inhibiendo la proliferación celular y la vascularización tumoral. Actualmente está aprobado para el tratamiento de diferentes cánceres (colon, mama, riñón, melanoma, entre otros) siendo utilizado solo o en combinación con otros fármacos. En nuestro antecedente previo, se estudiaron las tetrazinas mencionadas anteriormente (Figuras 19a y 20) utilizando este anticuerpo en un modelo de melanoma, por lo que se decidió continuar con esta metodología para poder comparar los resultados obtenidos reduciendo las variables. [100]

Materiales y Métodos

Se describen los materiales utilizados, los cuales abarcan ambos capítulos de la presente Tesis de Maestría.

Los disolventes utilizados fueron destilados previamente a su uso. De ser necesario fueron secados mediante procedimientos preestablecidos o adquiridos comercialmente. Los reactivos fueron obtenidos de Janssen, Fluka, SIGMA-ALDRICH, BAKER ANALYZED, Merck. El reactivo HYNIC fue sintetizado por las metodologías previamente descritas. [106]

Todas las reacciones que requerían condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera de N₂ gaseoso utilizando un matraz de Shlenck para la eliminación del aire.

El avance de las reacciones y pureza de los productos se controlaron empleando cromatografía en capa fina (CCF) en placas de poliéster recubiertas con sílica o alúmina y se revelaron con luz ultravioleta de 254 nm o vapores de yodo. Las fases móviles que se han utilizado consisten en mezclas de distintas proporciones de éter de petróleo (EP, fracción de PEb entre 60 y 65 °C) y acetato de etilo (AE) o diclorometano (DCM) y metanol (MeOH).

Los productos fueron purificados por cromatografía en columna (CC) utilizando sílica o alúmina como fase móvil.

Los espectros de ¹H-RMN se realizaron en un equipo BRUKER Ascend (400 MHz), empleando los disolventes deuterados indicados con cada caso y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt) y señal ancha (sa). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Para obtener los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC y HMBC se utilizan las secuencias de pulso disponibles en el software del equipo.

La espectrometría de masas (MS) se realiza en un espectrómetro de masas TSQ Fortis™ Triple Quadrupole, acoplado a un HPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000, asociado al software Chromeleon. La ionización de las muestras se realiza por electrospray en modo positivo (ESI⁺).

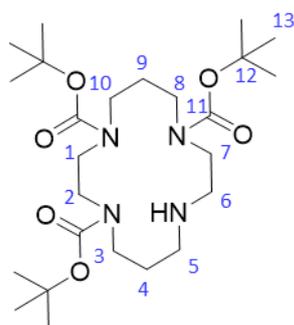
Los estudios de HPLC fueron realizados en un equipo Agilent Serie Infinity.

Las medidas de los órganos para las biodistribuciones se tomaron en un espectrómetro gamma con detector de germanio 189 hiperpuro (Canberra).

Química

Síntesis de 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxilato de tri-tert-butilo (GRTz01)

En un balón conteniendo cyclam (0.2 g, $1,00 \times 10^{-3}$ mol) en DCM seco (2 mL, 0,03 mol), se agrega una disolución de di-*tert*-butildicarbonato (Boc_2O) (0.5 g, $2,30 \times 10^{-3}$ mol) en 6 mL, 0,1 mol de DCM seco. La reacción se deja en agitación durante 2 h a T. Amb. El exceso de disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica por CC (sílica flash, DCM:MeOH, 95:5) como fase móvil. El intermedio GRTz01 se obtiene como un sólido incoloro (144 mg, 29 %).



Nota: las numeraciones utilizadas en todo este documento son arbitrarias

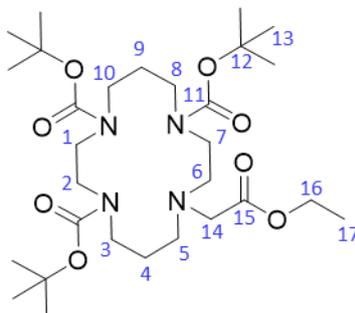
$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.30 - 3.41 (m, 12 H, 1,2,3,7,8,10), 2.82-2.74 (m, 2H, 6), 2.62 (sa, 2H, 5), 1.94 (m, 2H, 9), 1.72 (m, 2H, 4), 1.47 (m, 27H, 13).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.47 (11), 79.48 (12), 50.52 (6), 49.97-46.77 (1,2,3,7,8,10), 45.86 (5), 29.71 (9), 28.78 (4), 28.49 (13).

Síntesis de 11-(etoxicarbonilmetil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxilato de tri-tert-butilo (GRTz02)

Se disuelve el compuesto GRTz01 (420 mg, 8.39×10^{-4} mol) en dimetilformamida (DMF) (4 mL, 0.05 mol) en un balón con atmósfera de N_2 . Seguidamente se adicionan 2-bromoacetato de etilo (189 μL , 0,9 eq) y K_2CO_3 (129 mg, 1.26×10^{-3} mol). Se deja reaccionar toda la noche en agitación a 80 °C y luego de transcurrido el tiempo, el disolvente se remueve a presión

reducida co-distilando con tolueno/éter de petróleo. El compuesto se purifica por CC (sílica, DCM:MeOH, 95:5) como fase móvil. El compuesto GRTz02 se obtiene como un sólido blanco (407 mg, 80 %).

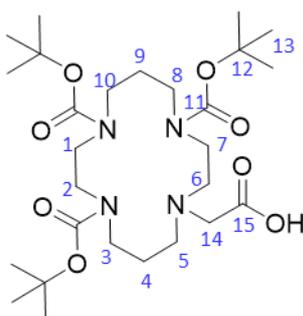


¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.15 (q, $J_{16-17} = 7.0$ Hz, 2H, 16), 3.35-3.27 (m, 14H, 1,2,3,7,8,10,14), 2.83 (s, 2H, 6), 2.65 (s, 2H, 5), 1.90 (m, 2H, 9), 1.68 (m, 2H, 4), 1.46 (m, 27H, 13), 1.27 (t, $J_{16-17} = 7.1$ Hz, 3H, 17).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.06 (15), 155.75 (11), 79.38 (12), 60.26 (16), 55.44 (14), 51.83 (6), 51.77 (5), 49.50-45.26 (1,2,3,7,8,10), 26.94 (9), 28.20 (4), 28.49 (13), 14.30 (17).

Síntesis de ácido 2-(4,8,11-tri(tert-butoxicarbonil)-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1-il)acético (GRTz03).

Se disuelve GRTz02 (400 mg, 6.81×10^{-4} mol) en MeOH (3 mL, 7.41×10^{-4} mol) y se adiciona 1.5 mL de una disolución acuosa de NaOH (1 M). Se deja en agitación durante de 2 h a T. Amb y se elimina el MeOH a presión reducida. Se realizan extracciones con AE (4 × 30 mL) a la fase acuosa previamente acidificada a pH 6,0 con disolución acuosa de HCl (1 M). Por último, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose el compuesto GRTz03 (297 mg, R = 81 %) sin purificación adicional.

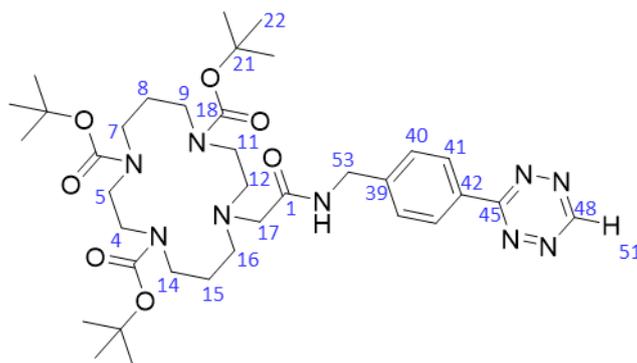


¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.36-3.27 (m, 14 H, 1,2,3,7,8,10,14), 2.83 (s, 2H, 6), 2.69 (s, 2H, 5), 1.86 (m, 2H, 9), 1.74 (m, 2H, 4), 1.46 (m, 27H, 13).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.06 (11), 155.58 (15), 79.98 (12), 55.44 (14), 53.91 (6), 52.50 (5), 46.20 (1,2,3,7,8,10,), 28.97 (9), 26.94 (4), 28.40 (13).

Síntesis de 11-[[4-([1,2,4,5]tetrazin-3-il)encilamino]carbonilmetil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxilato de tri-tert-butilo (GRTz04)

Se disuelve hidrocloreto de 4-([1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetanamina (30 mg, 1.21 x 10⁻⁴ mol) en una mezcla tolueno/DMF (2mL / 0.2 mL, 2.12 x 10⁻² mol) y Et₃N (2 eq, 2.43 x 10⁻⁴ mol) en atmosfera de N₂. Se deja en agitación por 1 h y posteriormente se adiciona el compuesto GRTz03 (101 mg, 1.82 x 10⁻⁴ mol) disuelto en DMF (0.3 mL). A la mezcla de reacción se le adiciona 1-etil-3-(3-dimetilaminopropiol)carbodiimida (EDC, 69 mg, 3.64 x 10⁻⁴ mol) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 41 mg, 3.64 x 10⁻⁴ mol) y se deja reaccionar en oscuridad durante 24 h. Los disolventes se remueven a presión reducida codestilando con éter de petróleo, el crudo de reacción se resuspende en DCM y se lava con una disolución acuosa de NaCl saturado. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo obtenido se purifica por CCF preparativa (alúmina, AE:EP, 7:3). El compuesto GRTz04 se obtiene como un sólido fucsia (5 mg, 5 %).

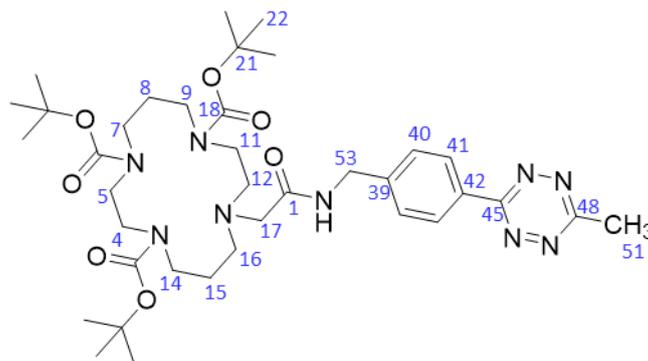


¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.14 (s, 1H, 51), 8.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 41), 7.48 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 40), 4.51 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 53), 3.25 (sa, 12H, 4,5,7,9,11,14,17), 2.75 (t, J = 2.2 Hz, 2H, 12), 2.64 (d, J = 5.8 Hz, 2H, 16), 1.62 (m, 4H, 8), 1.44 (s, 27H, 22).

^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.06 (1), 166.30 (48), 157.7 (18), 155.49 (45), 144.10 (39), 129.80 (41), 128.53 (40), 80.13 (21) 59.44 (17), 55.02 (12), 53.26 (16), 46.58 (4,5,7,9,11,14), 42.82 (53), 28.42 (8), 26.91 (15), 28.46 (22).

Síntesis de 11-[[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)encilamino]carbonilmetil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxilato de tri-tert-butilo (CH_3 -tetrazina-Cyclam- BoC_3 , GRTz05)

En un balón de dos bocas en atmósfera de N_2 se disuelve GRTz03 (35 mg, 6.25×10^{-5} mol) en 2 mL de DMF (2.58×10^{-2} mol), cada 10 minutos y en agitación se agregan los siguientes reactivos en el siguiente orden: *N*-hidroxibenzotriazol (HOBT, 10 mg, 7.53×10^{-5} mol), hidrocioruro de 4-([1,2,4,5]tetrazin-3-metil)fenilmetanamina (15 mg, 6.27×10^{-5} mol), trietilamina (Et_3N , 11 μL , 1.57×10^{-4} mol) y EDC (14 mg, 7.53×10^{-5} mol). La reacción se deja en agitación por 24 h a T. Amb. El disolvente se co-destila con éter de petróleo/tolueno a presión reducida, el crudo se disuelve en AE y se realizaron tres extracciones con H_2O . La fase orgánica se seca y se destila a presión reducida. La mezcla se purifica por cromatografía en columna (sílica, AE:EP, 1:1). El compuesto GRTz05 se obtiene como un sólido fucsia (15.8 mg, R = 34 %).

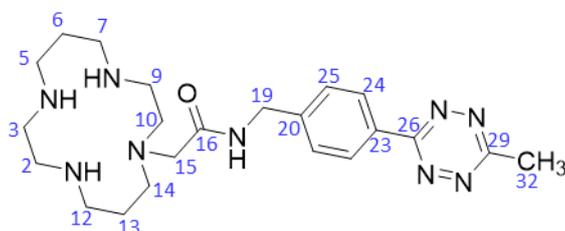


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 41), 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 40), 4.57 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 53), 3.41 – 3.28 (m, 12H, 4,5,7,9,11,14), 3.19 (s, 2H, 17), 3.09 (s, 3H, 51), 2.66 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 12), 2.53 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, 16), 1.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 8), 1.70 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, 15), 1.43 (s, 27H, 22).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.34 (1), 167.21 (48), 163.90 (45), 143.52 (42), 130.85 (39), 128.56 (41), 128.23 (40), 80.14 (21), 59.63 (17), 54.88 (12), 53.43 (16), 46.76 (4,5,7,9,11,14), 42.86 (53), 29.70 (8), 28.40 (22), 26.92 (15), 21.16 (51).

Síntesis de N-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)bencil]-2-(1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1-il)acetamida (CH₃-tetrazina-Cyclam, GRTz06)

En un balón de fondo redondo, se disuelve GRTz05 (10 mg, 1.79 x 10⁻⁵ mol, en una mezcla de DCM:ácido trifluoroacético (TFA, 1:1, 1.67 x 10⁻² mol). La reacción se deja en agitación por 2 h a T. Amb en oscuridad. El disolvente y el TFA se evaporan a presión reducida para obtener el producto final como un sólido rosado (5.5 mg, R = 93 %)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 24), 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 25), 4.45 (d, J = 31.8 Hz, 2H, 19), 3.29 - 1.84 (s, 24H, 2,4,5,6,7,9,10,12,13,14,15), 3.10 (s, 3H, 32),

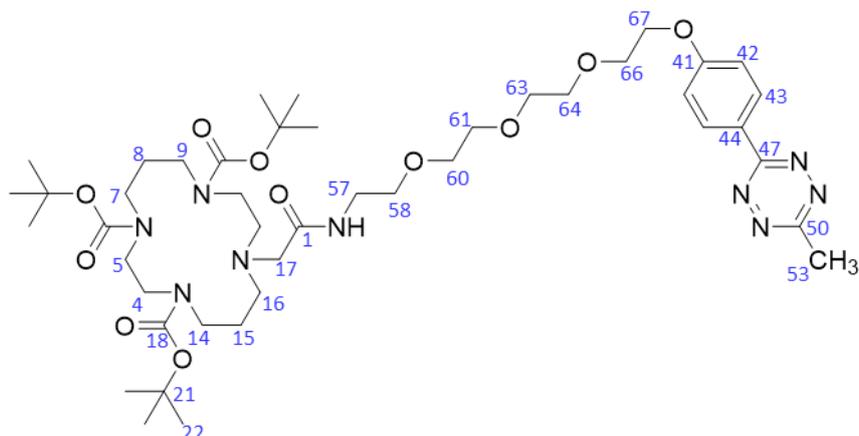
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.57 (16), 167.39 (29), 163.79 (26), 143.30 (23), 130.95 (20), 128.60 (24), 128.08 (25), 57.38 - 45.64 (2,3,5,7,9,10,14), 43.64 (19), 24.67 (13), 22.94 (6), 21.16 (32).

MS (ESI): *m/z* = 442 [M+H]⁺

Síntesis de 11-{2-[2-(2-(2-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)feniloxietiloxi]etiloxi)etiloxi)etilamino]carbonilmetil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8-tricarboxilato de tri-tert-butilo (CH₃-tetrazina-PEG4-Cyclam-Boc₃, GRTz07)

En un balón de dos bocas en atmósfera de N₂ se disuelve GRTz03 (28 mg, 5,02 x 10⁻⁵ mol) en DMF (2 mL, 2.58 x 10⁻² mol), cada 10 minutos en agitación se agregaron los siguientes reactivos en el siguiente orden: HOBT (8.1 mg, 6.02 x 10⁻⁵ mol), hidrocloreuro de 2-(2-(2-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)feniloxietiloxi]etiloxi)etiloxi)etilamina (20 mg, 5.52 x 10⁻⁵ mol), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 19 mg, 1.05 x 10⁻⁴ mol y EDC (8.5 mg, 5,02 x 10⁻⁵ mol). La reacción se deja en agitación por 48 h a T. Amb. El disolvente se co-destila con éter de petróleo/tolueno a presión reducida, el crudo se disuelve en AE y se realizan tres

extracciones con H₂O. La fase orgánica se seca y se destila a presión reducida. La mezcla se purifica por cromatografía en placa (sílica, DCM:MeOH, 95:5). El compuesto GRTz07 se obtiene como un aceite fucsia (9.9 mg, R = 22 %).

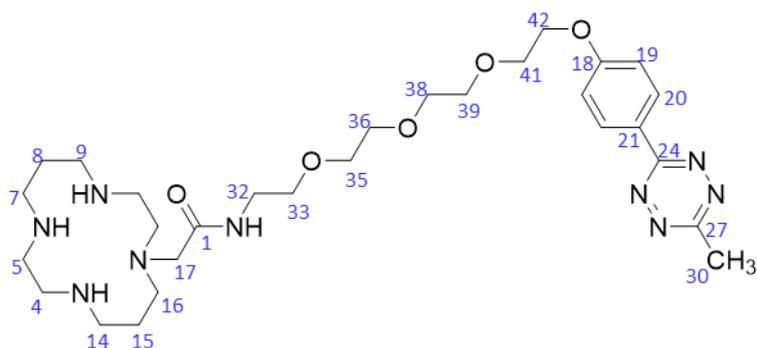


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 43), 7.10 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 42), 4.24 (t, J = 4.8 Hz, 2H, 67), 3.91 (t, J = 4.8 Hz, 2H, 66), 3.75 – 3.60 (m, 8H, 60,61,63,64), 3.57 (t, J = 5.2 Hz, 2H, 58), 3.47 (t, J = 5.4 Hz, 2H, 57), 3.41 – 3.25 (m, 12H, 4,5,7,9,11,14), 3.08 (s, 2H, 17), 3.06 (s, 3H, 53), 2.65 (t, J = 6.4 Hz, 2H, 12), 2.51 (t, J = 6.3 Hz, 2H, 16), 1.86 (t, 2H, 8), 1.73 (t, J = 7.0 Hz, 2H, 15), 1.46 (s, 27H, 22).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.91 (1), 166.59 (50), 163.74 (44), 162.47 (41), 155.53 (18), 129.68 (43), 124.33 (47), 115.25 (42), 79.89 (21), 71.05 – 70.08 (60,61,63,64), 69.90 (58), 69,59 (66), 67.64 (67), 59.33 (17), 52.93 (12,16), 48.82 – 44.94 (4, 5, 7, 9, 11, 14), 38.80 (57), 28.47 (8,15,22), 21.06 (53).

Síntesis de N-{2-[2-(2-(2-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)]feniloxietiloxi]etiloxi)etiloxi)etil]-2-(1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1-il)acetamida (CH₃-tetrazina-PEG4-Cyclam, GRTz08)

Una disolución de GRTz07 (10 mg, 1.11 x 10⁻⁵ mol) en DCM:TFA (1:1, 1mL, 1.67 x 10⁻² mol), se hace reaccionar 2 h en agitación a T. Amb. El exceso de disolvente se evapora a presión reducida. El producto GRTz08 se obtiene como un sólido rosado (6.5 mg, R = 90 %).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 20), 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 19), 5.30 (s, 1H), 4.25 (dd, *J* = 5.6, 3.6 Hz, 2H, 42), 3.91 (t, 2H, 41), 3.79 – 3.61 (m, 8H, 35,36,38,39), 3.56 (m, 4H, 17, 33), 3.43 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, 32), 3.32-2.86 (m, 12H, 4,5,7,9,11,14), 3.06 (s, 3H, 30), 2.73 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, 12), 2.50 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H, 16), 1.83 (m, 4H, 8, 15).

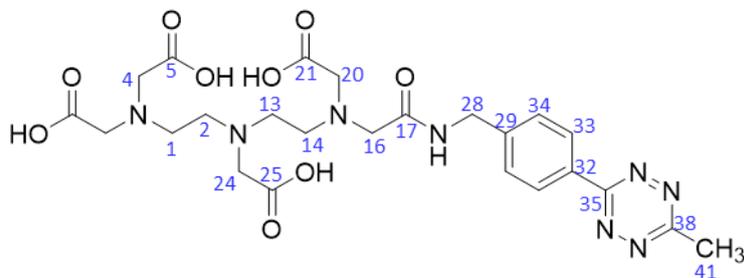
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.07 (1), 166.68 (27), 163.70 (21), 162.32 (18), 129.73 (20), 124.51 (24), 115.27 (19), 71.28 – 67.76 (33,35,36,38,39,41,42), 57.70 – 44.39 (4,5,7,9,11,12,14,16), 39.41 (32),24.95 (15), 22.89 (8), 21.02 (30).

MS (ESI): *m/z* = 753 [M+2MeO+ACN+H₂CO₂]⁺

Síntesis de N-[2-amino-N'-carboximetil-N'-(2-amino-N''-carboximetil-N''-(4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)bencilaminocarbonilmetil)]etil]-N-carboximetilaminoacético (CH₃-tetrazina-DTPA, GRTz10)

A una disolución de dianhídrido del ácido *N,N*-bis[2-amino-*N'*,*N'*-bis(carboximetil)etil]aminoacético (35 mg, 9,8 x 10⁻⁵ mol) en DMF o tolueno anhidro se adiciona Et₃N (19.8 μL, 4,9 x 10⁻⁵ mol) y tamiz molecular de 3 Å activado (100 mg), la temperatura se aumenta a 60 °C y se agrega lentamente una disolución de hidrocloreuro de 4-([1,2,4,5]tetrazin-3-metil)fenilmetanamina (10 mg, 4,9 x 10⁻⁵ mol) y Et₃N (19.8 μL, 4,9 x 10⁻⁵ mol) en DMF (1 mL, 1,29 x 10⁻² mol). La reacción se continúa por 24 h. El producto final se purifica por cartucho C18 SEP-PAK utilizando un gradiente de etanol/H₂O. Las fracciones que contienen el producto se evaporan a presión reducida y finalmente se liofilizan. El producto se obtiene como un sólido rosado parcialmente puro con 85 % de pureza controlada por HPLC (3 mg, R = 26 %). Para ciertos experimentos, se purifica por HPLC (*método 2*, ver más adelante).

Variación a la técnica: Luego del agregado de los reactivos, la mezcla se calienta y se sonica por 30 minutos a la mínima potencia.



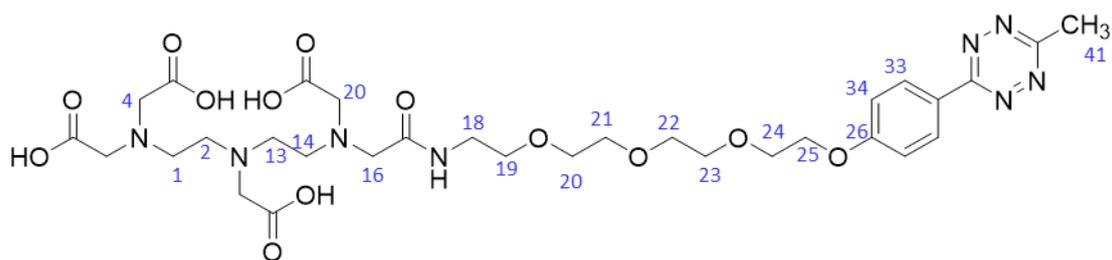
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.36 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 33), 7.58 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 31), 4.57 (s, 2H, 28), 4.06 (s, 2H, 16), 3.84 (s, 4H, 4), 3.81 (s, 2H, 20), 3.64 (s, 2H, 24), 3.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 2), 3.41 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, 14), 3.27 (t, *J* = 3.48 Hz, 2H, 1), 3.27 (t, *J* = 5.89 Hz, 2H, 13), 3.07 (s, 3H, 41).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 172.83 (25), 171.70 (21), 170.34 (9,5), 168.12 (17), 167.19 (38), 163.88 (38), 142.61 (29), 130.40 (32), 128.26 (33,34), 57.04 (4), 56.73 (16,20), 54.32 (24), 52.22 (14), 51.94 (2), 50.69 (13), 49.86 (1), 42.91 (28), 20.05 (41).

MS (ESI): *m/z* = 577.26 [M+H]⁺

Síntesis de N-[2-amino-N'-carboximetil-N'-[2-amino-N''-carboximetil-N''-({2-[2-(2-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)feniloxietiloxi]etiloxi)etiloxi]etil]aminocarbonilmetil)]etil]-N-carboximetilaminoacético (CH₃-tetrazina-PEG4-DTPA, GRTz11)

A una disolución de dianhídrido del ácido *N,N*-bis[2-amino-*N'*,*N'*-bis(carboximetil)etil]aminoacético (30 mg, 8.40 x 10⁻⁵ mol) en DMF se adiciona Et₃N (16.9 μL, 4.20 x 10⁻⁵ mol) y tamiz molecular de 3 Å activado (100 mg), la temperatura se aumenta a 60 °C y se agrega lentamente una disolución de hidrócloruro de 2-(2-(2-[4-(6-metil[1,2,4,5]tetrazin-3-il)feniloxietiloxi]etiloxi)etiloxi)etilamina (15.5 mg, 4.20 x 10⁻⁵ mol) y Et₃N (16.9 μL, 4.20 x 10⁻⁵ mol) en DMF (1 mL, 1,9 x 10⁻² mol). La reacción se continúa por 24 h. El producto final se purifica por cartucho C18 SEP-PAK utilizando un gradiente de etanol/H₂O. Las fracciones que contienen el producto se evaporan a presión reducida el etanol y finalmente se liofilizan. El producto se obtiene como un sólido rosado (2 mg, R = 8 %)



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 33), 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 34), 4.02 (dd, $J = 7.0, 6.9$ Hz, 2H, metileno PEG), 3.75-3.68 (m, 12H, metilenos del DTPA+metileno PEG), 3.65 – 3.45 (m, 16H, metilenos PEG+metileno DTPA), 3.43 (m, 2H, metileno DTPA), 3.38 (m, 2H, metileno DTPA), 3.32 (m, 2H, metileno DTPA), 2.93 (s, 3H, 41).

Marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Generalidades

Todos los procedimientos implicaron trabajo con material radioactivo fueron realizados bajo normas y medidas de protección radiológicas.

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se obtiene de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ bajo la forma de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ en disolución acuosa de NaCl (0.9 %), fue cedido por el Centro de Imagenología, de Médica Uruguaya.

En las mediciones de actividad se emplea una cámara de ionización Capintec CRC-55t. También se utilizan espectrómetros de centelleo sólido con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas de pozo acoplado a una tarjeta multicanal ORTEC y con cristal de NaI(Tl) de 3x3 pulgadas plano acoplado a un sistema analizador monocanal ORTEC.

Para las marcaciones con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se utiliza como agente reductor SnCl_2 o SnF_2 . Todos los disolventes empleados fueron previamente purgados con N_2 . Las purzas radioquímicas se determinaron por HPLC (*método 1*) y en CCF.

El control de los radiomarcados se realiza en CCF o en un HPLC Agilent Infinity 1200 equipado con detector GABI y una columna de fase reversa C18 (250 mm x 4.6 μm) Restek®. Los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC, previamente filtrados por filtro de 0.22 μm , el detector UV se estableció en 280 nm y 515 nm, utilizando los *métodos 1* o *2*.

Método 1: gradiente lineal agua/TFA (0.05 %) (A) y MeOH (B), 0-18 min 0-100 % B, 18-20 min 100-0 % B.

Método 2: gradiente lineal agua/TFA (0.05%) (A) y ACN (B), 0-18 min 0-100% B, 18-20 min 100-0% B

La CCF se realizó utilizando:

- ITLC-SG con disolución acuosa de cloruro de sodio (0.1 M) como fase móvil para determinar $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$), ^{99m}Tc -coligando ($R_f = 1$) y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$).
- W1 en acetona para determinar $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$), ^{99m}Tc -coligando ($R_f = 0$) y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$).
- ITLC-SG-BSA en EtOH:hidróxido de amonio:H₂O (2:1:5) para determinar ^{99m}Tc -anticuerpo ($R_f = 1$).

Procedimiento general de marcación con ^{99m}Tc para GRTz06 y GRTz08

Se describe el procedimiento general para la marcación de los derivados de cyclam, las variaciones y condiciones detalladas del procedimiento se presentan en la sección resultados (Tabla 4).

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan el correspondiente buffer o agua (50-500 μL), 20-120 μg de GRTz06 o GRTz08 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), disolución acuosa de SnCl_2 (1 mg/mL, 20-100 μL) recién preparada y $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (hasta 200 μL , 111-150 MBq). Se controla el pH (entre 5.5 y 10.5) y se incuba. Las purzas radioquímicas se determinaron por HPLC (*método 1*) y en CCF.

Procedimiento general de marcación con ^{99m}Tc para GRTz10

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan agua desionizada (100 μL), GRTz10 (50 μg), disolución etanólica de SnCl_2 (1 mg/mL, 50 μL) recién preparada y $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (hasta 200 μL , 70-150 MBq). Se controla y ajusta el pH a 5 y se incuba 20 minutos a T. Amb. Las purzas radioquímicas se determinaron por HPLC (*método 2*) y en CCF.

Coefficiente de reparto n-octanol/fase acuosa y cálculo de LogD

Los valores del LogD se determinan por triplicado de la siguiente manera: una cantidad apropiada del radiomarcado (5 MBq/ μg) se disuelve en PBS pH=7.4 para obtener una concentración final de 0.05 MBq/mL. Una mezcla de 500 μL de *n*-octanol y 500 μL de las

disoluciones respectivas de los radiomarcados en PBS se agitan vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugan a 14000 rpm durante 10 minutos. Se recogen tres fracciones de 100 μ L de ambas fases de cada tubo y se cuenta la radioactividad en un contador de pozos de NaI. El LogD se obtiene aplicando la siguiente Ecuación 1

$$\text{LogD} = \log_{10} \left(\frac{\text{cpm de } n - \text{octanol}}{\text{cpm de fase acuosa}} \right)$$

Ecuación 1. Cálculo de LogD

Estudios de estabilidad

Para el estudio de la estabilidad de los radiomarcados de los derivados GRTz06 y GRTz10. Se toma una alícuota de cada radiomarcado purificado y se diluye en PBS (pH=7.4). Las muestras se incubaron por 24 h a 37 °C. Se controla por ITLC y W1 en acetona. a 1, 6 y 24 h calculando el porcentaje de la actividad que se corresponde con el compuesto marcado.

Síntesis de bevacizumab-TCO

Purificación de bevacizumab

Con una jeringa estéril se toma bevacizumab (Avastin®) (25 mg/mL, 0.3 mL) y se purifica utilizando tubos Amicon® con una membrana de 30 kDa, se centrifuga a 13000 rpm por 10 min, se lava con PBS y se centrifuga nuevamente. Luego el anticuerpo se resuspende en PBS (500 μ L) y se separa del tubo. La concentración de anticuerpo se determina mediante absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 1.4 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ mL}^{-1}$).

Conjugación de TCO a bevacizumab

A una disolución de anticuerpo en PBS (3 mg, 13 nmol), se añade el buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (1 M, pH = 9.5, 40 μ L). El pH de la disolución resultante se controla con tiras de pH (Merck®). Seguidamente se adicionan *O*-(*trans*-ciclooct-4-enil)-*O*-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)carbonato (TCO-NHS, Click Chemistry Tools, 5 mg/mL en DMSO seco, 10 eq, 5 μ L), con un volumen de reacción final ajustado a 0.5 mL con PBS. La mezcla de reacción se protege de la luz y se deja a T. Amb durante 30 min con agitación lenta. El AcMo conjugado se purificó por PD-10 en PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar). La concentración del AcMo-TCO purificado se determina midiendo la absorbancia a 280 nm y se almacena a 4 °C.

Determinación de los equivalentes de TCO por equivalente de anticuerpo

La cantidad de TCO reactivos por molécula de anticuerpo se determina mediante electroforesis SDS-PAGE haciendo reaccionar bevacizumab-TCO con diferentes concentraciones de una tetrazina fluorescente, Cy3-CH₃-tetrazina (Click Chemistry tools, 1µg/µL). Se incuban alícuotas de 100 µg de disolución de bevacizumab-TCO (4 mg/mL) con 1, 3, 6, 9 y 12 equivalentes de Cy3-CH₃-tetrazina en un volumen final de 100 µL, durante 30 minutos y a T. Amb. Seguidamente, alícuotas de cada reacción y el marcador de peso molecular se siembran en un gel de poliacrilamida al 10 % y se separan mediante electroforesis utilizando un buffer de electroforesis (10 % SDS). Para la detección de Cy3 se utiliza el equipo In-Vivo MS FX PRO (Bruker) obteniendo la imagen de fluorescencia a 540 nm / 600 nm. El gel se revela con Coomassie para confirmar la ubicación de bevacizumab y el marcador de peso molecular. Para el análisis, se seleccionan las regiones de las bandas correspondientes al anticuerpo unido a la tetrazina y se cuantifica la intensidad promedio de píxeles por cada región seleccionada. El número de moléculas de TCO por molécula de anticuerpo se calcula graficando la intensidad de fluorescencia de la banda versus los equivalentes de Cy3-CH₃-tetrazina.

Estudio de la reacción de cicloadición sobre el anticuerpo

La especificidad de la reacción entre el grupo tetrazina y el bevacizumab-TCO se determina mediante electroforesis SDS-PAGE. Se siembra en un gel de poliacrilamida al 10 % el marcador de peso molecular, 10 µg de bevacizumab comercial libre de excipientes, 10 µg de bevacizumab comercial + 7 eq de Cy3-CH₃-tetrazina previamente incubados 30 minutos, bevacizumab-TCO y 10 µg de bevacizumab-TCO + 7 equivalentes de Cy3-CH₃-tetrazina previamente incubados por 30 minutos. Luego se separa mediante electroforesis utilizando un buffer de electroforesis (10 % SDS). Finalmente, el gel se analiza utilizando el equipo In-Vivo MS FX PRO (Bruker) obteniendo la imagen de fluorescencia a 540 nm / 600 nm y se realiza tinción de proteínas con Coomassie.

Estudio de la reacción de cicloadición con los derivados sintetizados

Se incubaba 50 µg (50 µL) de bevacizumab-TCO con 50 µL de una fracción purificada por HPLC de los diferentes radiomarcados, ^{99m}Tc-GRTz06 y ^{99m}Tc-GRTz10 (10000 cpm aproximadamente). Como control negativo se incubaba el radiomarcado con el anticuerpo sin conjugar con TCO. Luego de 30 minutos a 37 °C se siembra una fracción en cada sistema

cromatográfico, W1 en acetona y ITLC-BSA en EtOH:hidróxido de amonio:H₂O (2:1:5), y se cuantifica la radioactividad en un contador de NaI.

Experimentos *in vitro* e *in vivo*

Cultivo celular

Para los cultivos celulares realizados los medios de cultivo, PBS y suero fetal bovino (SFB) se obtienen de Capricorn Scientific. La solución de TripLE™ Express se obtiene de Gibco. La línea celular de melanoma murino B16-F10 fue obtenida de la colección celular de la ATCC (American Tissue Culture Collection), se cultivan en medio DMEM con 10 % de SFB en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Ensayo de unión de bevacizumab-TCO radiomarcado en células B16-F10

El estudio de unión de bevacizumab-TCO *in vitro* en células B16-F10 se realiza, por cuadruplicado, en placa de cultivo de 24 pocillos. Para ello, se incuban 1x10⁵ células B16-F10 durante 48 h, al día siguiente, una vez que las células alcanzan el 90 % de confluencia en la placa se realiza un cambio de medio. Seguidamente, las células se fijan con 200 µL de paraformaldehído (PFA, 2 %) en PBS durante 15 minutos y se lavan con 0.5 mL de PBS/0.2 % BSA. Una vez fijadas, se incuban con 200 µL de una disolución de saponina (0.2 % en PBS) por 30 minutos. Posteriormente se lavan con 0.5 mL de PBS/0.2 % BSA. Se adiciona bevacizumab-TCO que previamente se hizo reaccionar con ^{99m}Tc-GRTz06 (37kBq por pocillo, 107 nM de bevacizumab por pocillo). Se incuba por 1 y 4 h a T. Amb. Por otro lado, se realiza un bloqueo a 4 h con el anticuerpo frío en una relación molar 50:1 con respecto al radiomarcado. Los pocillos se lavan con PBS/0.2 % BSA y se colecta el medio en un tubo (medio). Las células fijadas al pocillo se lavan con 0.5 mL de disolución acuosa de NaOH (1 M) y se colectan en otro tubo (células). Se mide la actividad en contador de NaI. Se grafica el porcentaje de actividad en las células siguiendo la Ecuación 2.

$$\% \text{ de actividad en células} = \frac{\text{actividad en células}}{\text{actividad en células} + \text{actividad medio}} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo de unión de bevacizumab-TCO-^{99m}Tc-GRTz06 a B16-F10

Ensayos de biodistribución in vivo

La evaluación biológica *in vivo* se lleva a cabo mediante experimentos de biodistribución en ratones normales. Los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias.

Biodistribución en ratones normales

Los ensayos de biodistribución se realizan en ratones hembra C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad. A cada animal se le administra 3.7 MBq de ^{99m}Tc -GRTz06 disuelto en 0.1 mL de PBS por vía intravenosa a través de la vena de la cola (0.18 MBq/g de ratón). Luego del tiempo establecido de biodistribución 1, 4 y 24 h, los animales ($n = 4$) se sacrifican, y se diseccionan los órganos de interés. Estos se masan y se cuantifica su radioactividad en un espectrómetro gamma. La radioactividad se expresa como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) o porcentaje de dosis inyectada (% DI). La cantidad total de sangre se considera como el 6.5 % del peso corporal total.

Estudios estadísticos

Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* se llevó a cabo un análisis ANOVA de una o dos vías con la corrección de Bonferroni. Se consideró un nivel de significancia de 0.05 para determinar si había diferencias significativas entre las medias.

Resultados y Discusión

Síntesis orgánica

En la presente tesis de maestría se planteó como uno de los objetivos el diseño, la síntesis y la caracterización de al menos un compuesto híbrido, que contenga, por un lado un quelante de ^{99m}Tc y, por otro, un grupo funcional tetrazina capaz de reaccionar de forma bioortogonal con TCO, conteniendo o no un espaciador entre ellos (Figura 22).

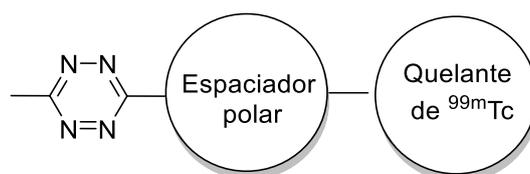


Figura 22. Esquema del objetivo de síntesis planteado

Derivados de cyclam

Con el objetivo de lograr obtener un compuesto más hidrofílico que los sintetizados previamente por el grupo de trabajo, se eligió continuar el trabajo utilizando como molde estructural el macrociclo conocido como cyclam. En este trabajo se preparó, utilizando intermediarios de síntesis derivados de cyclam[107], el derivado GRTz04 (Figura 23) desarrollado en la tesis doctoral de la Dra. M^a Fernanda García [108]. En el presente trabajo, se retomó la preparación de este compuesto y se exploraron nuevas estrategias utilizando derivados de tetrazina más estables para generar derivados del mismo.

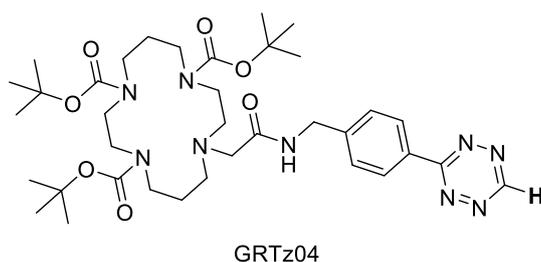


Figura 23. Estructura de GRTz04 (tesis doctoral Dra. Ma. Fernanda García)

Las rutas de los derivados de cyclam utilizan a GRTz03 como reactivo, el que se preparó siguiendo la ruta que describe la Figura 24 y previamente descrita por David, J. Yang et al. a la que se realizaron modificaciones en el escalado. [109]

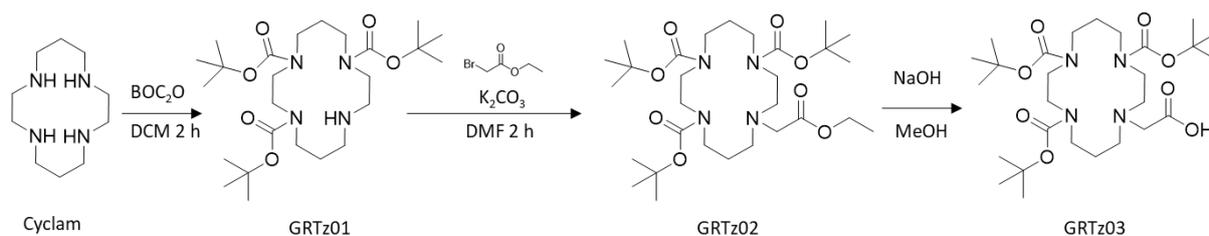


Figura 24. Ruta de síntesis de GRTz03

Si bien existe una numerosa cantidad de estrategias para lograr la formación de un enlace amida entre el GRTz03 y la tetrazina reactivo, en el presente trabajo se vieron limitadas las reacciones de optimización, debido al alto costo de las tetrazinas disponibles comercialmente.

Síntesis de GRTz04

En la tesis doctoral de la Dra. M^a Fernanda García se sintetizó el derivado GRTz04 con un rendimiento de 18 % y en el proceso de desprotección de los grupos t -butiloxicarbonilos se observó una alta descomposición del material de partida. En la presente tesis, se retomó la síntesis del derivado GRTz04, utilizando EDC y NHS sin mejora del rendimiento, pero para la reacción de desprotección se utilizaron dos concentraciones que difieren en la relación DCM/TFA (1:1 y 5:1). En ambos casos, visualmente se observa una pérdida de la coloración fucsia en la mezcla de reacción a los pocos minutos luego de adicionar el TFA al sistema. Este color fucsia es característico de las [1,2,4,5]tetrazinas, por lo que la pérdida de este es un indicativo de la descomposición. [110] Mediante CCF se confirma la desaparición del reactivo, que no se ve acompañada con la aparición de ningún producto de coloración rosada. En el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón del crudo de la reacción, no se observan las señales características de la tetrazina por lo que se confirma la descomposición del material de partida.

Síntesis de GRTz05 y GRTz06

A pesar que inicialmente se utilizó la tetrazina no-sustituida, por su mayor reactividad en la cicloadición posterior, en comparación, con la tetrazina metil-sustituida, se ha observado que es menos estable en ciertas condiciones de reacción. Es por ello que se optó por realizar la misma reacción, pero utilizando la tetrazina metil-sustituida. [84] Así, el derivado GRTz05 (Figura 25) se preparó a partir de la reacción entre GRTz03 y la tetrazina correspondiente por activación del ácido carboxílico con HOBT/EDC.

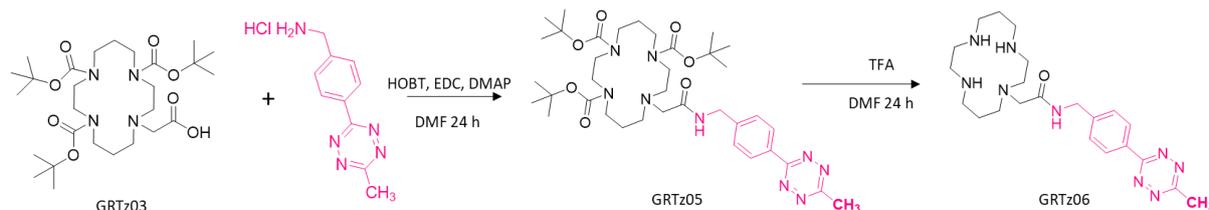


Figura 25. Esquema de la síntesis de GRTz06

Existen múltiples agentes activantes y aditivos para la reacción de amidación. En este sentido se ensayaron tres condiciones con el objetivo de comparar los rendimientos de reacción. En la Tabla 1. Condiciones de reacción ensayadas para obtener el compuesto GRTz05 se muestran los agentes activantes del ácido carboxílico y bases ensayados, así como los rendimientos de obtención del producto deseado. [111]–[113]

Tabla 1. Condiciones de reacción ensayadas para obtener el compuesto GRTz05

Condiciones de reacción	Disolvente	Rendimiento	Referencia
EDC, NHS, Et₃N 24h T. Amb	DMF	x	[114]
CDI, Et₃N 24h T. Amb	DMF	20 %	[111]
EDC, HOBt, DMAP, Et ₃ N 24h T. Amb	DMF	34 %	[115]

El mejor resultado se obtuvo cuando se utilizó EDC/HOBt/DMAP. El primer paso de la reacción consiste en la protonación de la molécula de EDC para formar un carbocatión que será atacado por el ácido carboxílico ionizado para formar el intermedio de *O*-acilisourea (Figura 26). Luego se forma el éster del HOBt, que por reacción con DMAP, agente de transferencia del grupo acilo, forma la amida del DMAP altamente reactiva. Si bien el HOBt se recupera, se describe que utilizarlo en cantidades catalíticas o en cantidades equimoleculares no modifica el rendimiento de la reacción. El objetivo de utilizar el HOBt en la reacción es aumentar el rendimiento y en reacciones donde participan centros quirales, evitando la racemización. [110], [111] Por último, la amina de la tetrazina ataca al carboxilo. Si bien es de esperar que el éster de HOBt reaccione de manera lenta con la amina

deficiente en electrones de la tetrazina, con la formación del éster de DMAP se espera que la velocidad de reacción aumente. [106], [109]

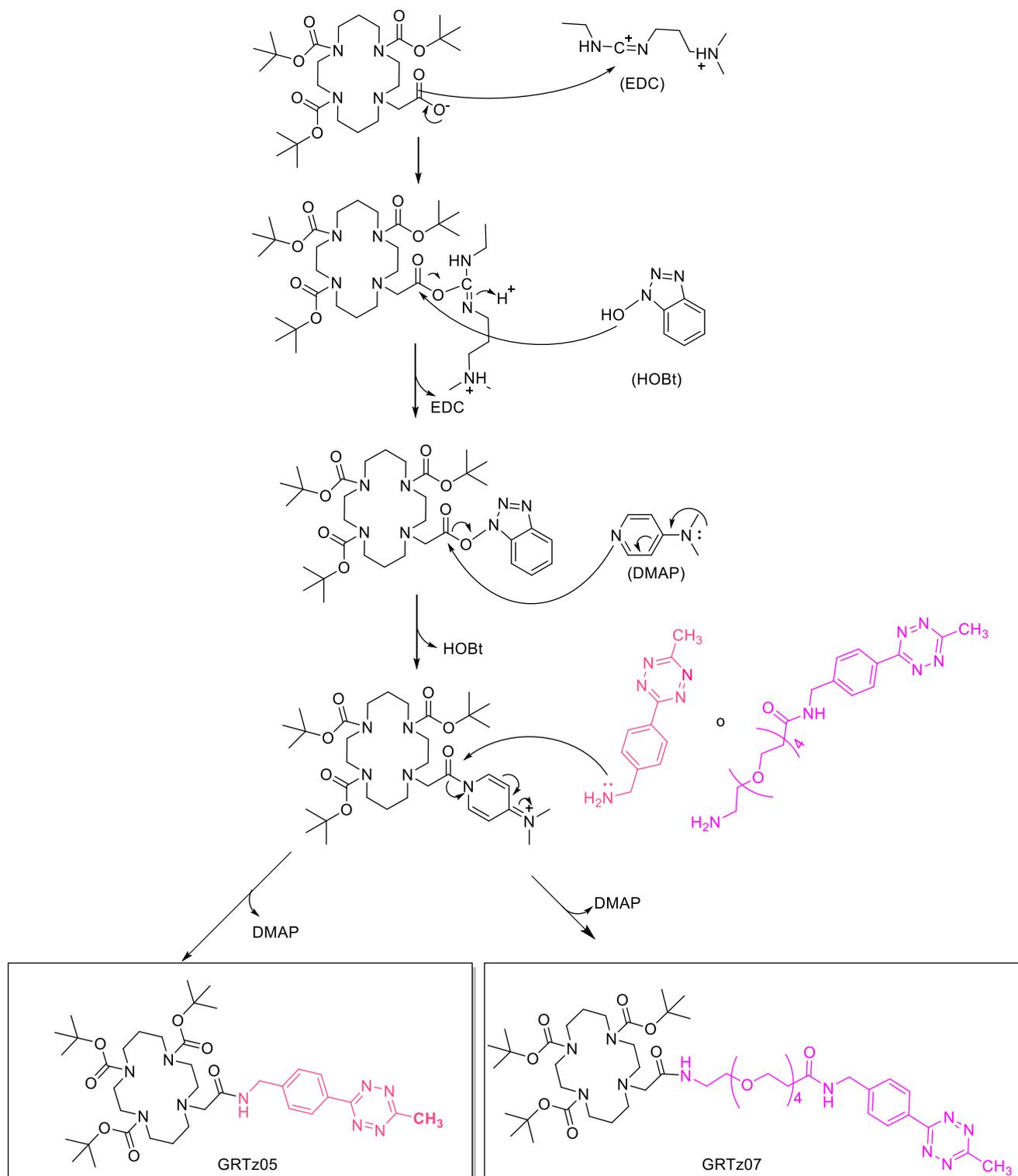


Figura 26. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de GRTz05 y GRTz07

Otra estrategia utilizada fue la utilización de EDC/NHS (Tabla 1). Primero se realiza la activación del ácido con EDC, lo que resulta en un producto que es fácilmente hidrolizable. Por lo que rápidamente se adiciona NHS, que forma un intermedio altamente reactivo y al mismo tiempo estable. [118] Luego se agrega la amina correspondiente y se eleva el pH con Et₃N para dar la amida. Si bien en la síntesis de GRTz04 se obtuvo el producto buscado con moderado rendimiento utilizando NHS/EDC. Para este nuevo sistema, síntesis de GRTz05, no fue posible aislar ningún producto utilizando las mismas condiciones de reacción, únicamente se observó el reactivo incambiado. [118]

Síntesis de GRTz07

En la búsqueda de generar derivados tetrazina más hidrofílicos, se planteó la síntesis de un derivado de cyclam que contenga una cadena repetitiva etiloxi como conector. En el mercado existen diversas opciones de tetrazinas ya acopladas a este tipo de conectores con diferente cantidad de subunidades etiloxi, en donde el precio aumenta en relación al incremento en masa molecular. Se realizó la síntesis de GRTz07, que contiene 4 subunidades de etiloxi, buscando incrementar la hidrofilia en comparación a GRTz06.

La estrategia química utilizada fue la misma que para el compuesto GRTz06 (Figura 26). El mejor resultado también se obtuvo utilizando EDC/HOBt/DMAP con un 22 % de rendimiento de reacción. También se probó la misma condición utilizando CDI, y al igual que lo que ocurrió con GRTz06 (Tabla 1) se logró aislar el producto buscado, pero con un bajo rendimiento (5 %) (Tabla 2)

Tabla 2. Condiciones de reacción de GRTz07

Condiciones de reacción	Disolvente	Rendimiento
CDI, Et ₃ N 24h T. Amb	DMF	5 %
EDC, HOBT, DMAP, Et ₃ N 24h T. Amb	DMF	22 %

Síntesis de los derivados de cyclam desprotegidos

Para obtener los derivados GRTz06 y GRTz08 se realizó la desprotección utilizando DCM:TFA (1:1), en ambos casos, se observó que efectivamente los derivados de tetrazina metil-sustituidas son más estables, por lo que la reacción evolucionó hasta obtener el producto final con un rendimiento del 93 % y 90 %, respectivamente. (Figura 27)

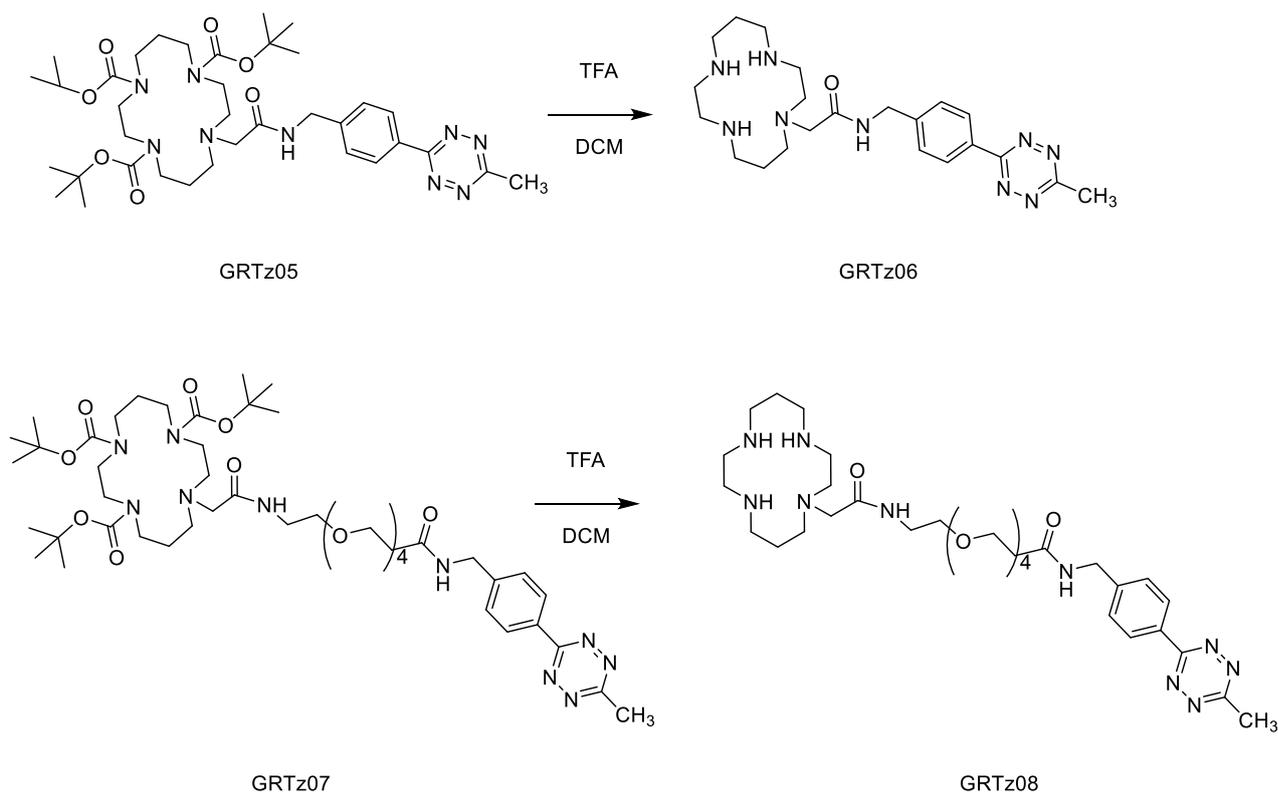


Figura 27. Esquema de síntesis de los compuestos desprotegidos GRTz06 y GRTz08

Si bien las reacciones de desprotección descritas en el presente documento se pueden seguir fácilmente por CCF, se detalla el seguimiento de la reacción por HPLC para la

obtención del derivado GRTz08, partiendo de su precursor GRTz07. En la Figura 27 se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC, utilizando el *método 1*, y con detección a 510 nm que es la longitud de onda de absorción característica de las tetrazinas. Se observa que la reacción se completa a los 90 minutos sin detectarse descomposición del material de partida.

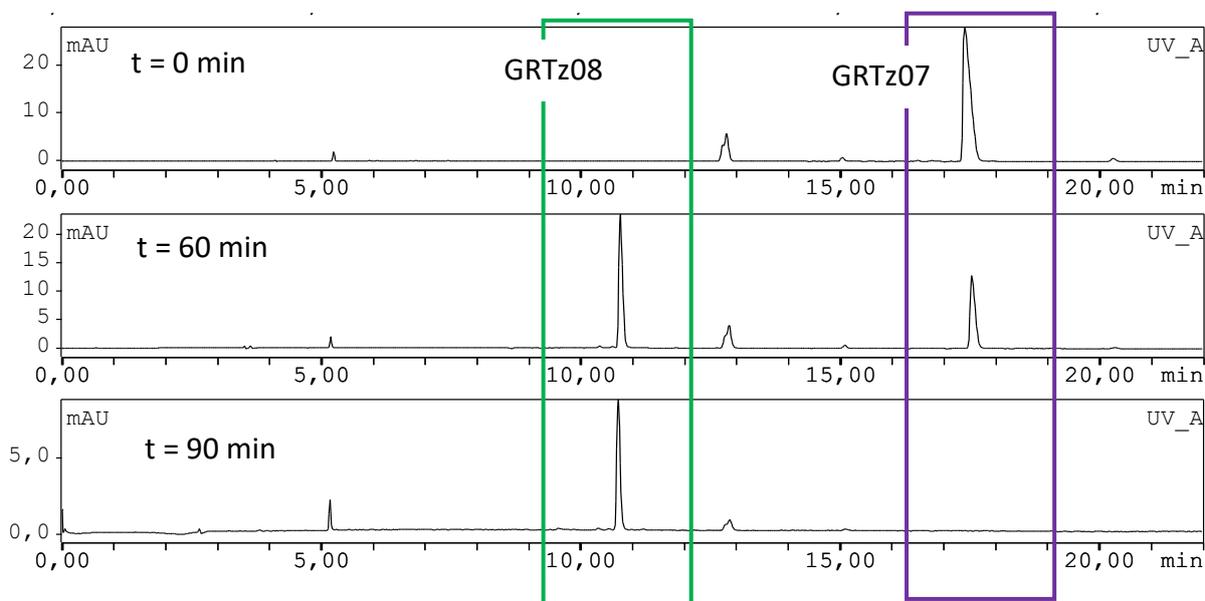


Figura 28. Cromatogramas de HPLC correspondiente a la reacción de desprotección de GRTz07. Arriba: Reacción a $t = 0$. Medio: Reacción a $t = 60$ min. Abajo: Reacción a $t = 90$ min

Así, se obtuvieron dos productos derivados de cyclam que contienen un grupo tetrazina en su estructura, uno de ellos con un espaciador potencialmente más hidrofílico. A ellos se le estudió las condiciones de marcación con ^{99m}Tc .

Derivados de DTPA

Síntesis de GRTz09

En la literatura existen varias estrategias para preparar derivados de DTPA, entre ellas, el uso del bis-anhídrido de DTPA (Figura 28) es una de las más populares, ya sea para conjugación directa a biomoléculas de alta masa molecular, [119], [120] o para conjugaciones a pequeñas moléculas orgánicas. [121]

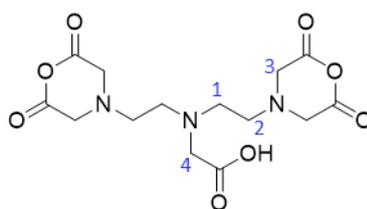


Figura 29. Bis-anhídrido de DTPA

Así fue que, en primer lugar, se buscó preparar el bis-anhídrido de DTPA. Para ello se siguió el procedimiento descrito, obteniendo un sólido blanco en buena cantidad. Pero cuando se caracteriza el mismo por $^1\text{H-RMN}$, se encuentra que hay una ligera diferencia con lo descrito en la literatura, si bien se observan las cuatro señales correspondientes a los protones H1, H2, H3 y H4 (Figura 28), la señal de H4 tiene una integración de 4 cuando debería ser de 2, y las señales de H3 deberían tener un $\delta = 3.7$ ppm, mientras que en el espectro se observan en $\delta = 3.1$ ppm. En MS se observa que el ión de m/z correspondiente a $[\text{M}+\text{H}]^+$ tiene la masa molecular de DTPA (Figura 29). Por lo que debido a las incongruencias en la caracterización y la falta de reactividad del sólido blanco sintetizado se opta por adquirir el bis-anhídrido comercialmente.

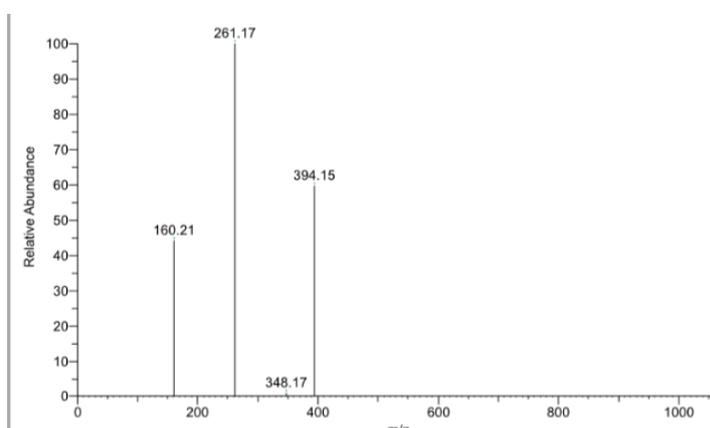


Figura 30. Full scan MS del sólido blanco obtenido en el intento de síntesis del bis-anhídrido de DTPA

Síntesis de GRTz10

Para la síntesis del compuesto GRTz10, se optó por realizar la conjugación utilizando el bis-anhídrido del DTPA (Figura 31). La dificultad de esta metodología radica en que la reacción se debe dar únicamente con un anhídrido, para obtener así la mono-reacción en lugar de la reacción con ambos anhídridos que daría lugar a la bis-amida. Para ello se tomó el

procedimiento descrito por M. Amanlou et al. [122] donde se estudian numerosas condiciones de síntesis para alcanzar dicho objetivo.

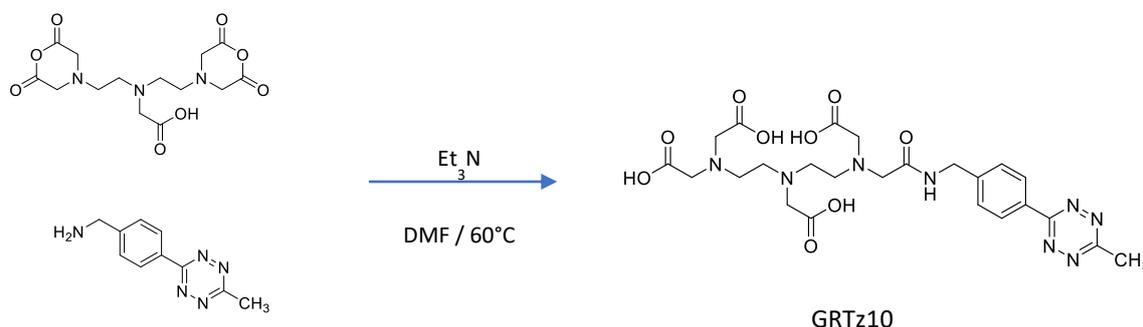


Figura 31. Esquema de síntesis de GRTz10

Allí se describe la síntesis, no sólo a través del bis-anhídrido, sino también activando el ácido carboxílico. Según el artículo, a temperaturas entre $50\text{-}70^\circ\text{C}$ se obtiene mayoritariamente el bis-producto, es decir generación de una diamida, mientras que a temperaturas mayores a 90°C se obtiene principalmente la mono reacción. Esta última condición no es compatible con la inestabilidad térmica que presentan las tetrazinas con las que se trabajó, en donde a partir de los 60°C dependiendo del tiempo y la presencia de determinadas sustancias como ácidos o bases, se suelen descomponer. Por otra parte, los autores describen el uso de ultrasonido como una alternativa rápida y eficiente, que permite acortar los tiempos de reacción. Además, la presencia de tamices moleculares activados en el medio de reacción favorece el acople, mediante la captación del agua liberada en la reacción de amidación cuando se parte de los ácidos libres. [123] Por último, la utilización de una relación molar DTPA:tetrazina de 3:1, aumenta las posibilidades de que la mono-reacción sea el producto mayoritario. Con la presente información, se comenzó utilizando condiciones de reacción moderadas, las cuales se resumen en la Tabla 3. Los productos obtenidos son polares por lo que el seguimiento de la reacción se llevó a cabo por HPLC (en fase reversa)-MS, cuantificando los picos correspondientes a los dos posibles productos (Figura 32): la mono-reacción (tiempo de retención: 13.9 min) y la di-reacción (tiempo de retención: 17.7 min).

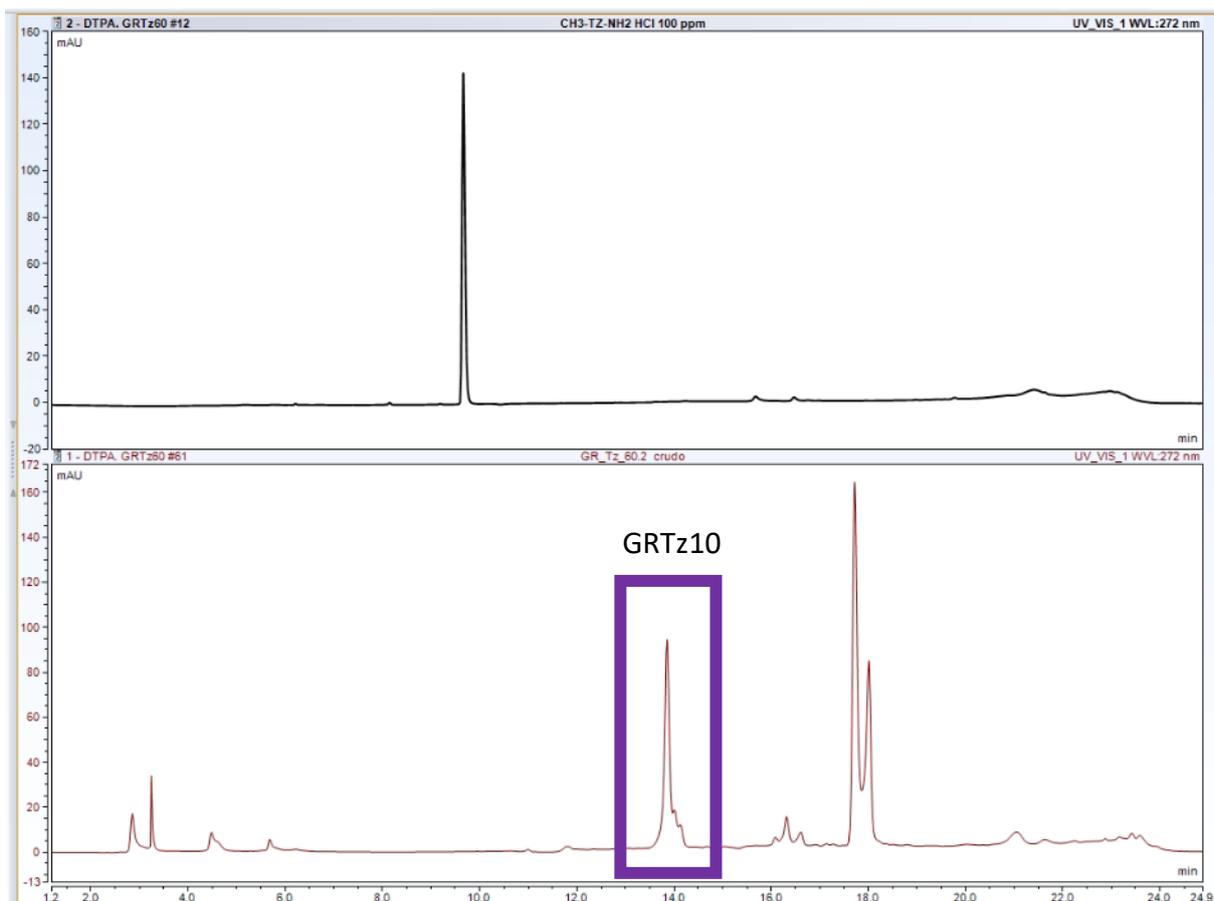


Figura 32. Cromatogramas de HPLC de la síntesis de GRTz10. Arriba, tetrazina reactivo. Abajo, crudo de reacción.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la obtención de GRTz10

Condición	Temperatura	Sonicación	Disolvente	Tiempo	Rendimiento
1	60	No	DMF	24 h	45 %
2	60	Si	DMF	15 min	30 %
3	60	Si	Tolueno	15 min	34 %
4	90	Si	DMF	15 min	22 %

A modo de ejemplo se detalla la elucidación estructural por RMN de GRTz10, se utilizaron experimentos de ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC y COSY. En primer lugar, se comenzó por la identificación de los protones aromáticos del reactivo derivado de la tetrazina (específicamente los protones fenílicos del mismo). Mediante información espectroscópica de otros derivados de tetrazina, y del propio reactivo, se sabe que los 4 protones del grupo fenilo aparecerán como dos dobletes. En donde los protones H33 (Figura 32) del grupo

fenilo aparecen como un doblete más desblindado (8.36 ppm) debido a que se encuentran en posición *orto* con respecto al grupo tetrazina, y por efecto resonante, estas posiciones son deficientes en electrones, además es posible calcular su constante de acoplamiento con el protón fenílico vecino (7.58 ppm), siendo $J = 7.3$ Hz. A partir de ellos fue posible asignar los desplazamientos de sus carbonos por HSQC. Por HMBC el carbono secundario C28 y los carbonos terciarios C29, C32 y C35.

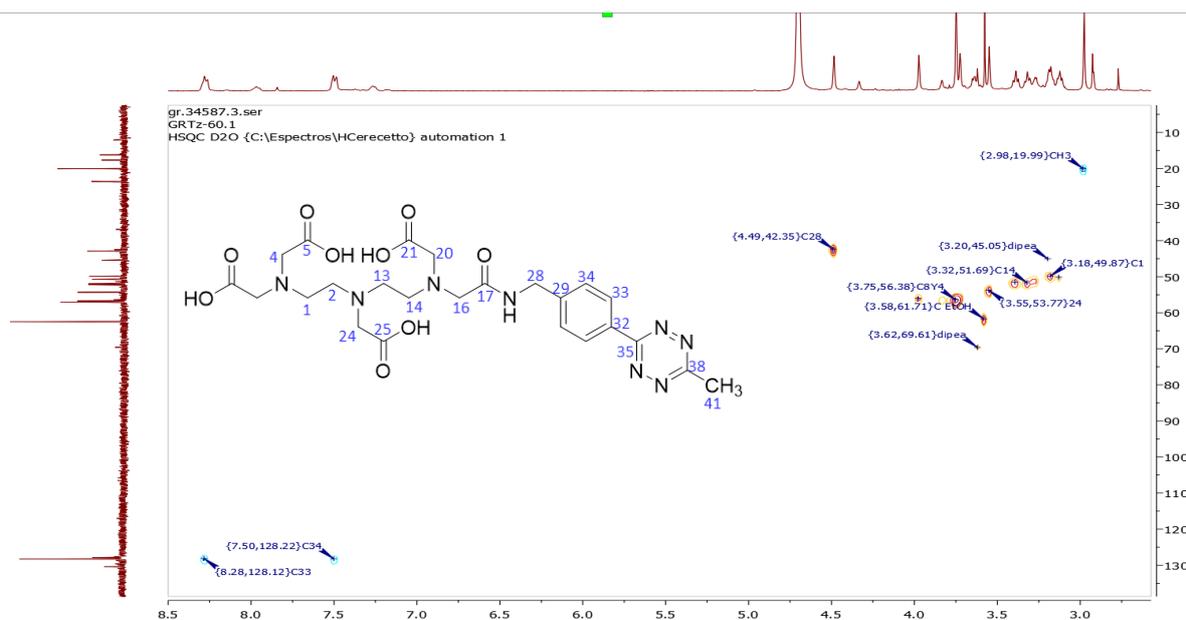


Figura 33. Experimento heteronuclear HSQC para GRTz10 en D_2O (la numeración utilizada es arbitraria)

Por otra parte, el metilo de la tetrazina es fácilmente identificable en el espectro de 1H , un singulete con integración 3, y a partir de HSQC y HMBC es posible asignar el carbono del metilo y el carbono de la tetrazina C38 (Figura 34) completando así las asignaciones para todos los H y C del fragmento de tetrazinilo.

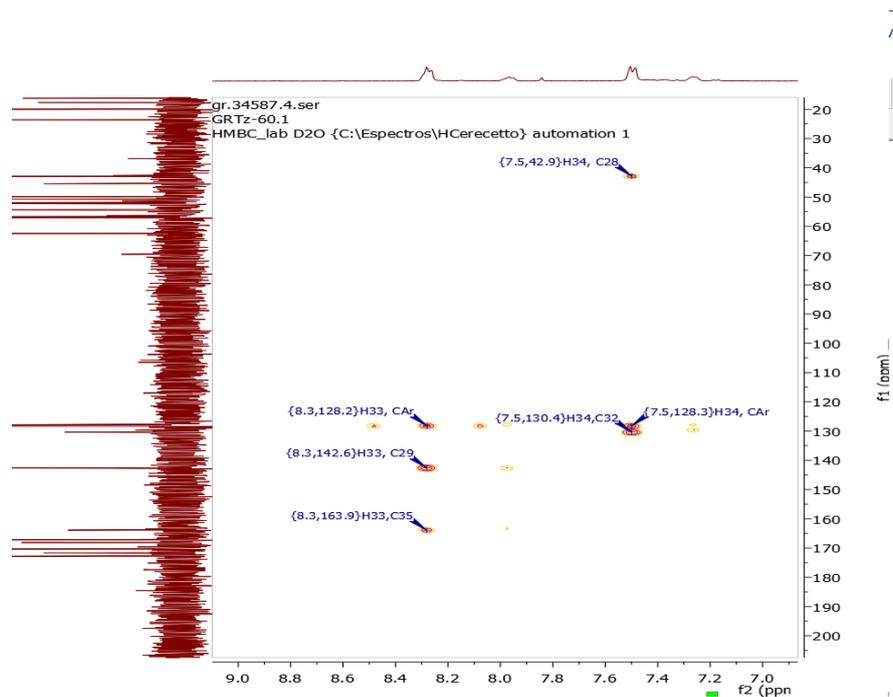


Figura 34. Experimento heteronuclear HSQC para GRTz10 en D₂O. Se muestra únicamente la región ampliada de ¹H aromáticos

A partir de la señal del metileno del grupo bencilo, protones H28, es posible asignar el carboxilo amídico C17 (168.12 ppm) y a partir de ésta, siguiendo la secuencia, asignar la señal de H16. Por HMBC H16 correlaciona con C14 (52.22) ppm y C20. Para identificar a cada uno de estos, se parte de que el metileno H14 presenta un acoplamiento con los protones de H13 y por HMBC, se correlaciona con otros dos átomos de carbono secundarios (C2 y C24). En cambio C20 presenta en el HMBC un acople con la señal del carboxilo C21. Y mediante el mismo razonamiento, se identifica la señal de C24 y el carboxilo C25.

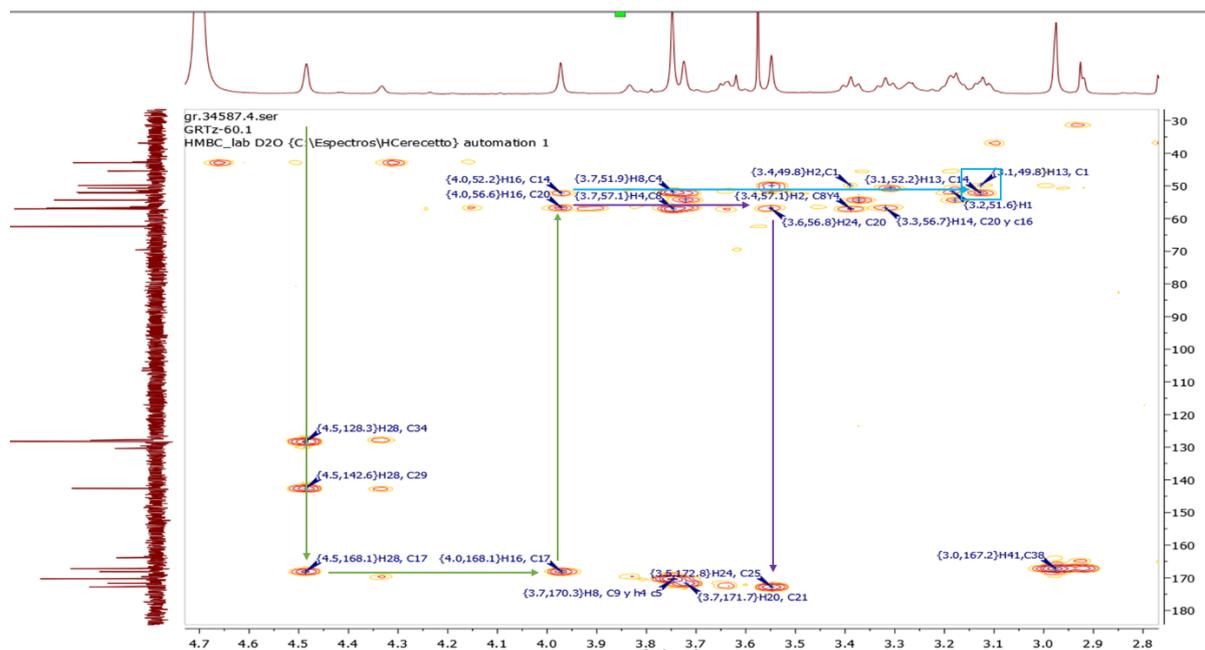


Figura 35. Experimento heteronuclear HMBC para GRTz10 en D₂O. Se muestra únicamente la región ampliada de ¹H alifáticos. Se señalan con flechas algunas correlaciones

Por último, a partir de C2 y las señales de los dos metilenos H4 se encuentran en el mismo desplazamiento, de igual manera que los desplazamientos de los carboxilos vecinos.

A partir del RMN, se logra asignar todas las señales presentes de GRTz10 y confirmar por su integración que se trata de la mono reacción, para obtener la masa suficiente para realizar los espectros, se utilizó una fracción 67 % pura, donde el contaminante es la tetrazina utilizada como reactivo, esta se purifica por HPLC para obtener el producto final con pureza superior al 95 %.

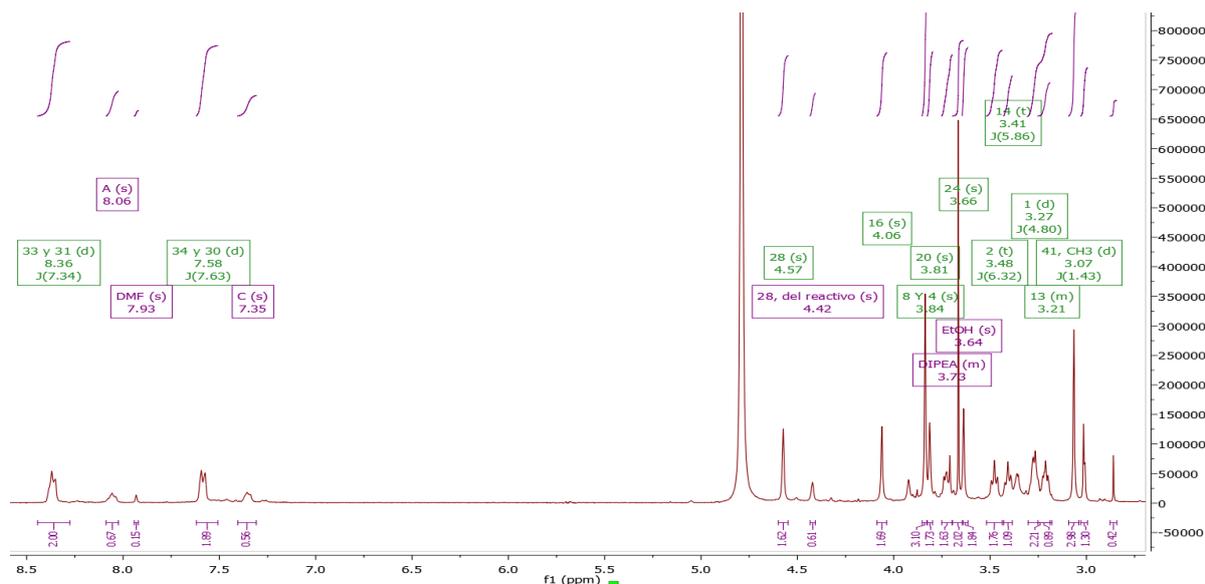


Figura 36. Espectro de ¹H-RMN de GRTz10 con las señales asignadas

Por último, el compuesto se caracterizó por HPLC-MS, el pico correspondiente a GRTz10, se seleccionó y se realizó un full scan, observando el ión de $m/z = 577$ correspondiente a $[M+H]^+$ y otro ión de $m/z = 599$ correspondiente a $[M+Na]^+$ (Figura 37).

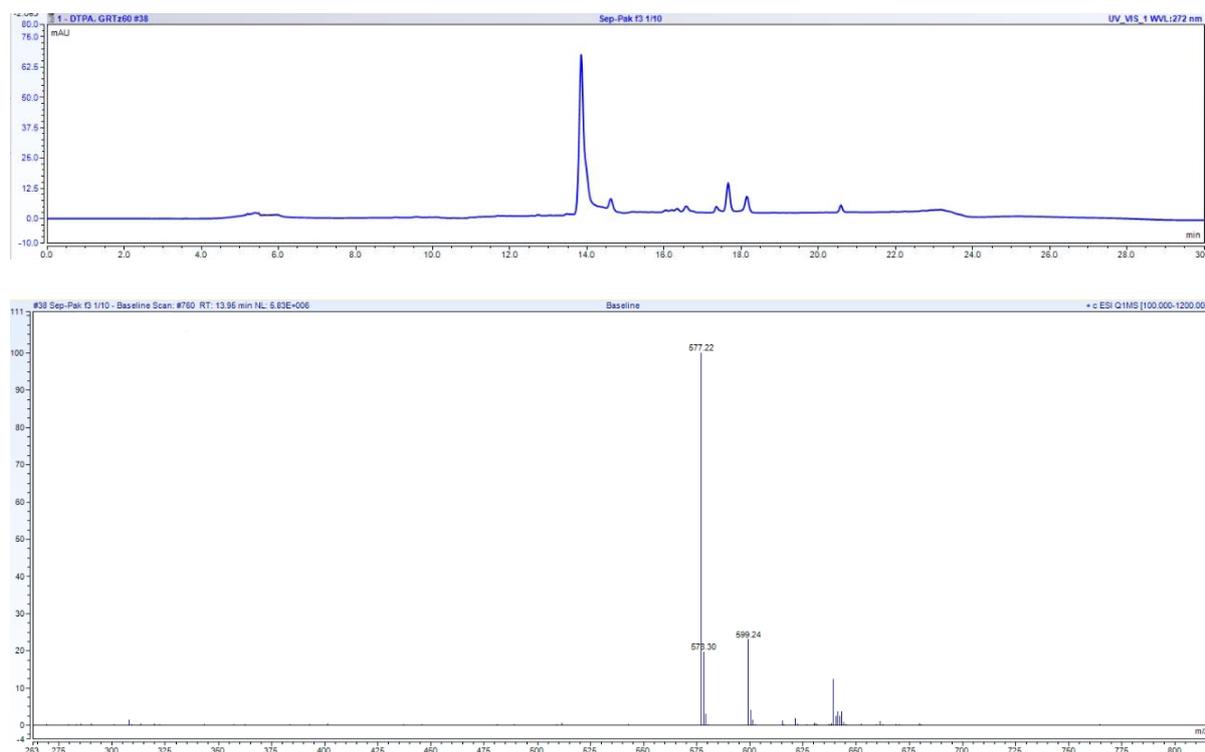


Figura 37. Arriba, Cromatograma de HPLC de GRTz10 purificada por C18 SepPack, tiempo de retención 13.9 min. Abajo, MS-full scan del pico correspondiente a GRTz10.

ninguna de las fracciones se logró obtener los productos con una pureza suficiente, pero se logró obtener fracciones en donde hay un producto mayoritario. En la Figura 40 se muestra, el ejemplo de la fracción 4 conteniendo el producto. Una vez liofilizado, el compuesto se termina de purificar por HPLC (Figura 41) obteniendo un producto puro, pero en muy baja cantidad (rendimiento 8 %).

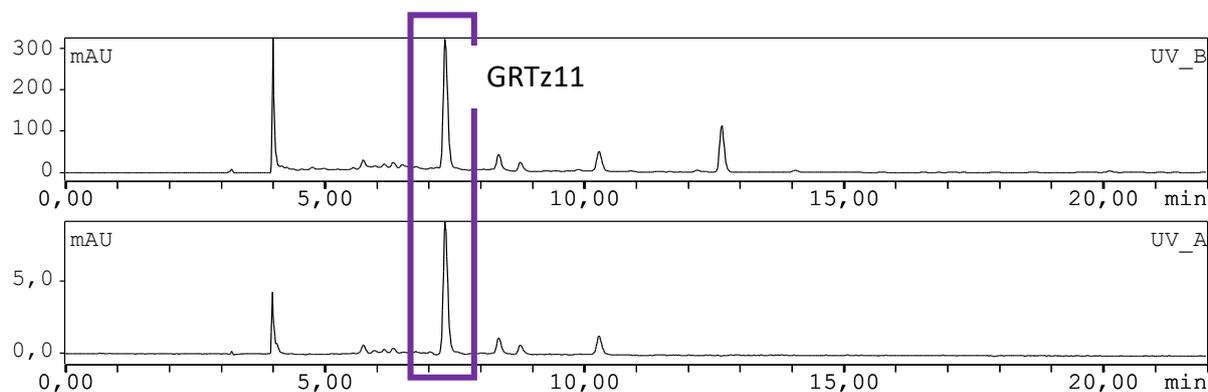


Figura 40. Cromatograma de HPLC para una fracción aislada por cartucho de C18 de GRTz11. Arriba: Canal 280 nm, Abajo: Canal 510 nm

Se estima que el producto seleccionado corresponde con el deseado, debido a que es el único que reacciona con bevacizumab-TCO y por señales confirmatorias en $^1\text{H-RMN}$. (indicando la presencia de tetrazina y DTPA en su estructura). Se obtuvo 0.5 mg del producto purificado y los infructuosos resultados de marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ver más adelante) llevaron a que no se continuara trabajando con este derivado.

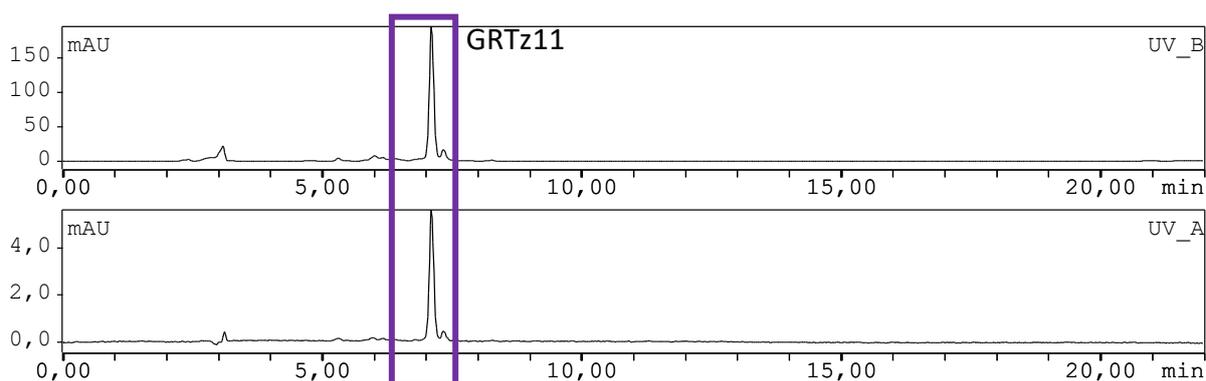


Figura 41. Cromatograma de HPLC para el compuesto purificado por HPLC se observa un pico mayoritario que se corresponde con GRTz11. Arriba: Canal 280 nm, Abajo: Canal 510 nm

Marcación con ^{99m}Tc

Con los cuatro productos que se obtuvieron y que fueron caracterizados correctamente (GRTz06, GRTz07, GRTz10 y GRTz11) se ensayó la marcación con ^{99m}Tc . Para ellos se estudiaron las condiciones de marcación con ^{99m}Tc que se discuten a continuación.

Derivados del cyclam

Basándose en los derivados de cyclam marcados con ^{99m}Tc mencionados en la bibliografía, presentan una estructura en donde el macrociclo tiene cuatro posiciones de coordinación con el átomo de ^{99m}Tc disponibles en el plano ecuatorial por las tres aminas secundarias y la terciaria. En esta estructura se unen dos oxígenos en posición axial con el tecnecio en estado de oxidación +5 bajo la forma de *trans*-dioxo, $\text{Tc(V)}\text{O}_2$, resultando un complejo con carga neta +1 de estructura octaédrica. [118], [119] Como ejemplo se muestra la estructura propuesta para el complejo formado con GRTz06 (Figura 42). Existen diversas metodologías de marcación de cyclam con ^{99m}Tc , estas tienen en común que la formación del complejo se da en un único paso, con la adición de los reactivos en simultáneo. En cuanto al resto de las variables, se describen marcaciones que utilizan desde temperatura ambiente hasta 90 °C, diferentes sales de Sn como agentes reductores y diferentes pHs, entre 5 y 11, donde en general los rendimientos mayores a 95 % se dan a pH básico. [126]–[130]

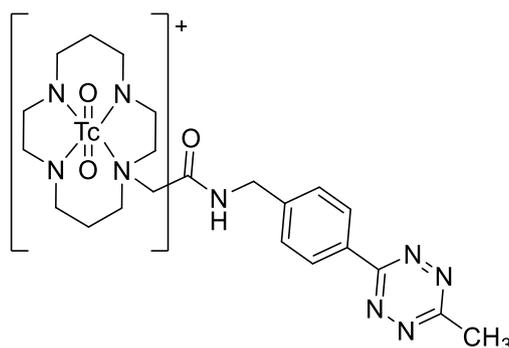


Figura 42. Estructura propuesta para el complejo ^{99m}Tc -GRTz06

Derivado de GRTz06

Para GRTz06 se ensayaron cerca de 30 condiciones diferentes de marcación con ^{99m}Tc (Tabla 4). Se estudió el uso de SnCl_2 y SnF_2 como agentes reductores, diferentes pH, entre 7 y 11,

diferentes temperaturas, entre 25 y 90 °C, diferentes tiempos de reacción, diferentes relaciones molares y purgando las soluciones con N₂ previo a su uso.

Tabla 4. Condiciones de marcación de GRTz06

Disolución (mg/mL)	Agente Reductor				Buffer			Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Citrato (0.5M)	Referencia	Rendimiento del complejo ^{99m} Tc-GRTz06	
	GRTz06 (µg) STOCK 1mg/mL	^{99m} TcO ₄ ⁻ (mCi)	Formula	Volumen (µL)	Disolvente	Disolución (mg/mL)	Buffer						Volumen (µL)
50	1.2	SnCl ₂	100	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10.6	50	9.5	30	50	5µL	-	
50	1.4	SnCl ₂	100	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10.6	50	8.5	30	37	5µL	-	
50	1.5	SnCl ₂	20	HCl 0.1M	1	H ₂ O	100	8	30	T.amb	-	[127]	-
50	0.6	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9	100	8	15	90	-	[126]	-
20	2.9	SnCl ₂	20	EtOH	2	PBS	175	10.5	30	T.amb	5µl	[128]	<10 %
20	1.6	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	7.5	15	90	0	[131]	-
20	2.0	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10.6	200	9	15	90	0		<10 %
20	0.7	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10.6	200	9	15	50	0		<10 %
20	2.7	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		<10 %
20	3.6	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	H ₂ O	200	10	30	T. Amb	0	[129]	-
20	5	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		-
20	3.3	SnF ₂	25	HCl 0.1M	2	H ₂ O	200	5.5	30	T. Amb	0	[130]	-
20	2.8	SnF ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		-
20	1.6	SnCl ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		-
20	2.9	SnF ₂	25	HCl 0.1M	2	H ₂ O	200	5.5	30	T. Amb	0		-
20	2.7	SnCl ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		51 %
20	1.9	SnF ₂	40	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=9-9.5	200	9	15	50	0		47.4 %
100	2.5	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	500	10	15	85	0		<10 %
100	2.7	SnCl ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	500	10	15	85	0		<10 %
100	2	SnF ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	520	10	15	75	0		31 %
120	2.1	SnCl ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	500	10	12	T. Amb	0		<10 %
120	1.5	SnCl ₂	50	HCl 1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	20	70	0		64 %
120	3.9	SnCl ₂	40	HCl 1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	30	70	0		43 %
120	4.1	SnCl ₂	50	HCl 1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	60	70	0		27 %
120	3.1	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	60	20	0		30 %
120	3.0	SnCl ₂	50	EtOH	1	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	30	20	0		20 %
200	2.9	SnCl ₂	50	HCl 0.1M	2	CO ₃ ²⁻ pH=10	300	10	60	60	0		72 %

El mejor resultado de la marcación del compuesto GRTz06 (Figura 43) se logró utilizando 50 μL de SnCl_2 , disueltos en HCl 0.1M (2mg/mL), 300 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH=10.6 y 0.2 mg de GRTz06 y 3.9 mCi de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ en 100 μL de suero fisiológico, incubando 60 minutos a 60 $^\circ\text{C}$. Con esta condición se logró obtener un marcado con 72 % de pureza radioquímica. A pesar de haber obtenido una marcación con una PRQ moderada la reproducibilidad de dicho resultado utilizando la misma condición fue muy baja, usualmente se obtuvo el complejo en las mismas condiciones con PRQ por debajo del 40 %. En general, se observó que la utilización de SnCl_2 produjo mejores resultados en relación al uso de SnF_2 , sin observarse una diferencia significativa entre disolverlo en EtOH o HCl . Adicionalmente se estudió si el uso de un agente quelante auxiliar como el citrato de sodio podía estabilizar el complejo con Tc(V) y servir como agente de transferencia, sin obtener buenos resultados. Si bien de acuerdo a la bibliografía en las condiciones a altas temperatura es más frecuente obtener el compuesto marcado, esta condición tiende a generar varios subproductos, probablemente producidos por la descomposición del anillo de tetrazina, ya que se observa la desaparición de señales en el canal de 510 nm. Por otro lado, con el buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH=10.6) se obtuvieron los mejores resultados.

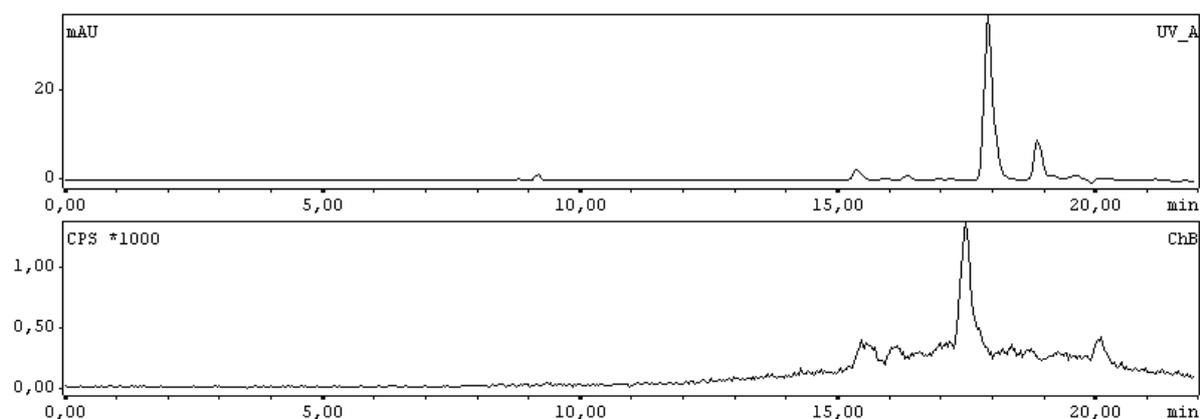


Figura 43. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz06 con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Arriba: Canal UV 510nm. Abajo: Canal gamma. Se observa el pico correspondiente a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GRTz06 en 17.1 min.

Derivado de GRTz08

Con respecto a GRTz08, inicialmente se probaron las condiciones de marcación optimizadas para GRTz06. Así, el mejor radiomarcado se obtuvo utilizando 50 μg de SnCl_2 , disueltos en HCl 0.1M (1mg/mL), 200 μL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH=10.6, 0.2 mg de GRTz08 y 1.1 mCi de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Se obtuvo un complejo con una PRQ del 89 % (Figura 44). Nuevamente, la

principal dificultad estuvo en la reproducibilidad de la técnica, en donde no fue posible repetir el buen rendimiento, usualmente se obtuvieron radiomarcados con una PRQ por debajo del 30 % y al elevar la temperatura comienzan a aparecer productos de descomposición de la tetrazina.

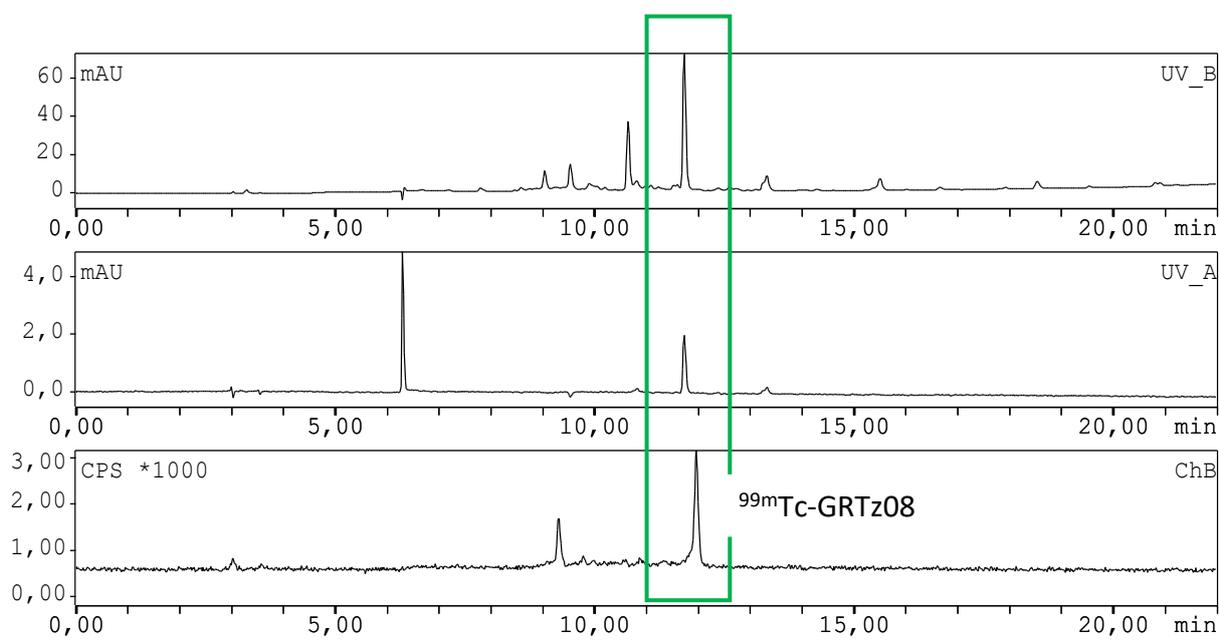


Figura 44. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz08 con ^{99m}Tc señalado en verde el producto de interés. Arriba: Canal 280 nm, Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma.

Por otra parte, se probó realizar la desprotección de GRTz07 en el instante previo al radiomarcado. Sin obtener una mejora significativa de los resultados. Si bien se logró obtener un marcado con una PRQ de 67 %, de igual manera que en los casos anteriores, la principal dificultad fue la reproducibilidad. Además, se observa que en las condiciones de marcado se descompone parcialmente el compuesto y sucede una inestabilización del radiomarcado que luego de las dos horas desaparece casi completamente con la clara producción de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Figura 45).

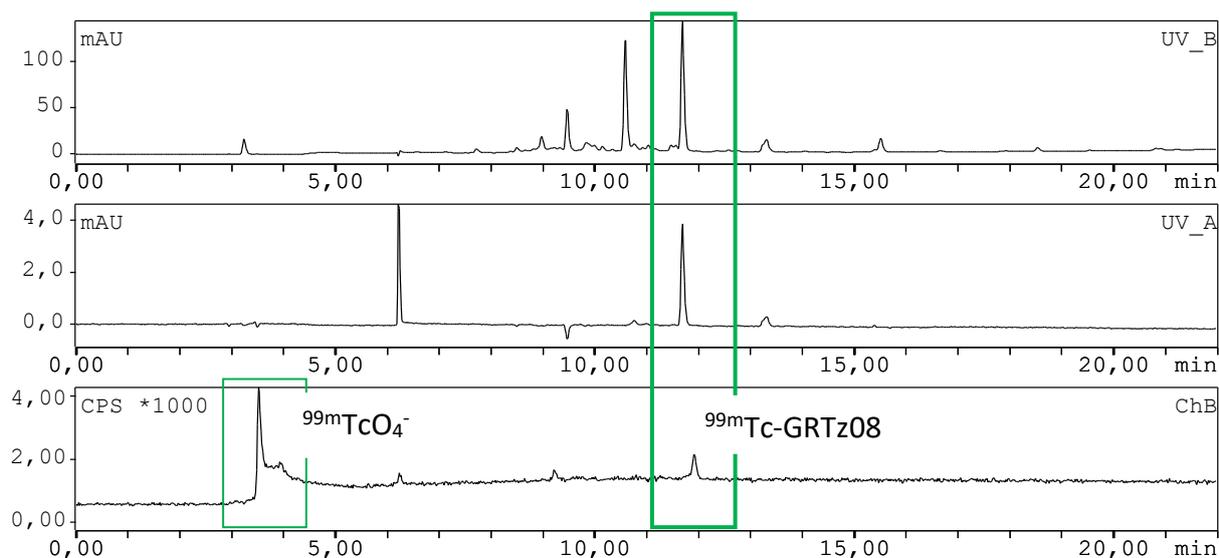


Figura 45. Cromatograma de HPLC para ^{99m}Tc -GRTz08 luego de 2 horas de marcado. Arriba: Canal 280 nm. Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma.

Derivados de DTPA

La formación de complejos entre ^{99m}Tc y DTPA existe desde la primera generación de radiofármacos utilizado para estudios de filtración renal. A partir de ello se han desarrollado compuestos bifuncionales derivados de DTPA [132]–[135] capaces de quelar átomos de ^{99m}Tc y ciertos lantánidos. Los complejos presentan una estructura en donde el motivo DTPA tiene seis posiciones de coordinación con el átomo de ^{99m}Tc en el plano donde están disponibles, en el plano ecuatorial, tres aminas terciarias y un carboxilato (Figura 45). En esta estructura se unen otros dos carboxilatos en posición axial con el tecnecio en estado de oxidación +4 resultando, a pH fisiológico, un complejo con carga neta 0 de estructura octaédrica. [136] Como ejemplo se muestra la estructura propuesta para el complejo formado con GRTz10 (Figura 42). Típicamente se describe en la bibliografía que las condiciones de marcaciones utilizan SnCl_2 como agente reductor de tecnecio y un pH entre 5 y 8.

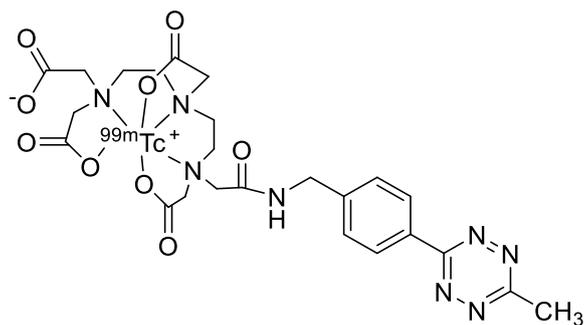


Figura 46. Posible estructura del complejo ^{99m}Tc -GRTz10

Derivado de GRTz10

Para GRTz10, se optimizaron las condiciones de marcación y se observó que utilizando entre 0.07 a 0.15 GBq de ^{99m}Tc , 50 μg de compuesto, 50 μg de SnCl_2 en EtOH, pH final 5 e incubando 20 minutos a temperatura ambiente, se obtienen purzas radioquímicas superiores al 80 % (Figura 47).

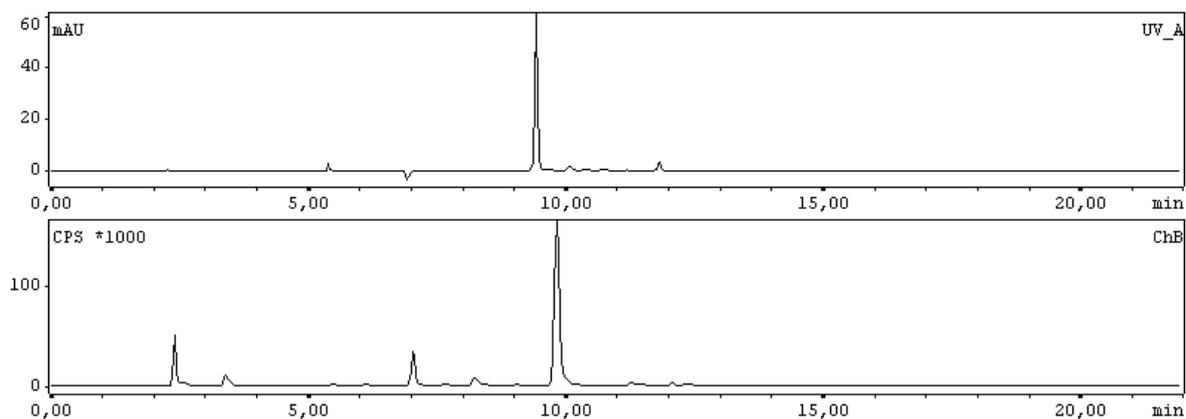


Figura 47. Cromatograma de HPLC de la marcación de GRTz10 con ^{99m}Tc , tiempo de retención 9.9 min. Arriba: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma.

Derivado de GRTz11

Para el supuesto producto que se correspondería con GRTz11 se ensayaron las condiciones de marcación descritas previamente para el otro derivado de DTPA. Sin embargo, no fue posible observar el compuesto marcado, debido a que se evidenció la descomposición total del producto en todas las condiciones de marcación. La hipótesis inicial fue que el compuesto se inestabilizaba al ajustar pH ya sea por un cambio brusco a pH ácido o básico. Esto fue descartado realizando la marcación en buffer fosfato pH = 4.5 en donde también se observó descomposición del compuesto luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente (Figura 48). Debido a que no se logró impedir la descomposición del compuesto, se decidió no seguir trabajando con este derivado.

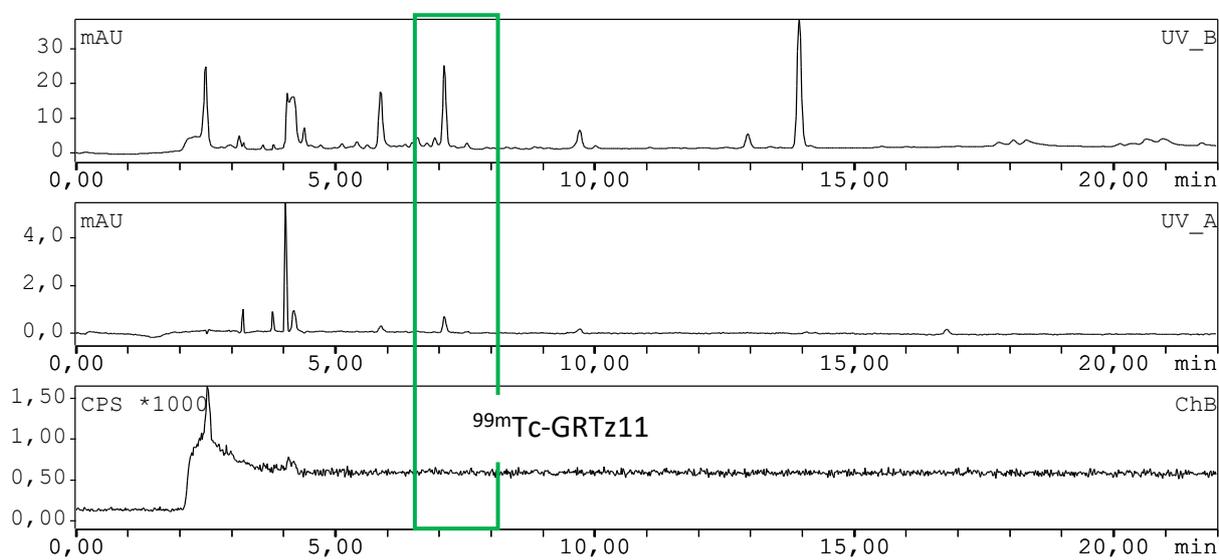


Figura 48. Cromatograma de HPLC en donde se muestra el resultado de una condición de marcación con ^{99m}Tc para GRTz11 luego de 30 minutos, en el rectángulo verde se muestra el tiempo de retención esperado. Se observa descomposición del material de partida luego de 30 min. Arriba: Canal 280 nm. Medio: Canal 510 nm. Abajo: Canal gamma

Lipofilia (LogD)

Uno de los objetivos principales de este trabajo era generar un radiomarcado que mejore las propiedades fisicoquímicas en relación a las sondas sintetizadas en trabajos anteriores. Para ello, se determinó el coeficiente de reparto *n*-octanol/PBS (pH=7.4), $\text{LogD}_{7.4}$, como parámetro de hidrofiliidad, de los nuevos complejos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5. En la misma se comparan los valores de $\text{LogD}_{7.4}$ de los complejos obtenidos durante este trabajo y los obtenidos previamente en el grupo de trabajo.

Tabla 5. Valores de $\text{LogD}_{7.4}$ obtenidos para los complejos desarrollados en este trabajo y de los complejos antecedentes de este trabajo

Compuesto	LogD _{7.4}	Referencia
^{99m} Tc-GRTz06	-1.89 ± 0.01	-
^{99m} Tc-GRTz10	-1.82 ± 0.03	-
^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-Hy ^a	-0.54 ± 0.07	[97]
^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-PEG ₄ -HYNIC ^b	-0.62 ± 0.03	[100]
^{99m} Tc-CH ₃ -Tz-PEG ₄ -Peptido-HYNIC ^c	-1.05 ± 0.02	[100]

^a El ligando de este radiomarcado se muestra en la Figura 19a. ^b El ligando de este radiomarcado se muestra en la Figura 20a. ^c El ligando de este radiomarcado se muestra en la Figura 20b.

Los compuestos sintetizados en este trabajo sin ningún conector polar resultaron tener valores de LogD_{7.4} similares, -1.89 ± 0.01 y -1.82 ± 0.03 , en donde se ve que ambos logran mejorar la hidrofilia de los complejos. En los trabajos previos, se observó que la inclusión de un pequeño fragmento de cuatro subunidades de etiloxi no influía tanto en la lipofilia como si lo hacía el agregado de una pequeña secuencia peptídica. En este trabajo se observa que cambiar el quelante, por uno con mayores características hidrofílicas es un cambio más significativo aún.

Estudios de estabilidad

Se estudió la estabilidad en condiciones fisiológicas de dos de los radiomarcados generados (Tabla 6). El estudio se realizó únicamente con los radiomarcados de GRTz06 y de GRTz10 debido a que para el resto de los compuestos no fue posible obtener marcados con buena repetitividad.

Tabla 6. Estudios de estabilidad de los derivados radiomarcados GRTz06 y GRTz10

	^{99m} Tc-GRTz06	^{99m} Tc-GRTz10
tiempo	proporción en el medio estudiado	
1 h	98 %	96 %
6 h	98 %	95%
24 h	96 %	96 %

Los dos complejos estudiados demostraron tener muy buena estabilidad luego de 24 h a pH = 7.4 y 37 °C.

Conjugación con TCO

El modelo de pre-dirección elegido para este trabajo implica la modificación de un anticuerpo, conjugándolo a moléculas de TCO. Se utilizó el AcMo humanizado anti-VEGF bevacizumab (Avastin®). La conjugación se dio mediante un protocolo previamente optimizado. Para cuantificar el número de moléculas de TCO por molécula de anticuerpo se utilizó geles de electroforesis SDS-PAGE. Una alícuota del anticuerpo conjugada a TCO, se incubó a 37 °C por 30 minutos con diferentes relaciones molares de una tetrazina fluorescente (conjugada al fluoróforo Cy3) (1:3, 1:5, 1:7, 1:9). Como controles negativos, se siembra una reacción del anticuerpo sin conjugar a TCO incubado con Tz-Cy3. Se siembran alícuotas de cada reacción en un gel de poliacrilamida, y se separan por electroforesis. Se analizan las bandas fluorescentes correspondientes a la tetrazina unida al anticuerpo, cuantificando la intensidad de pixel promedio por cada banda, cuando la curva de intensidad vs número de equivalente de TCO-NHS que se pusieron a reaccionar, alcanzada la saturación se asocia a la ausencia de sitios disponibles para que la tetrazina fluorescente reaccione. Se determina que se unen entre 6 y 7 moléculas de TCO por molécula de anticuerpo.

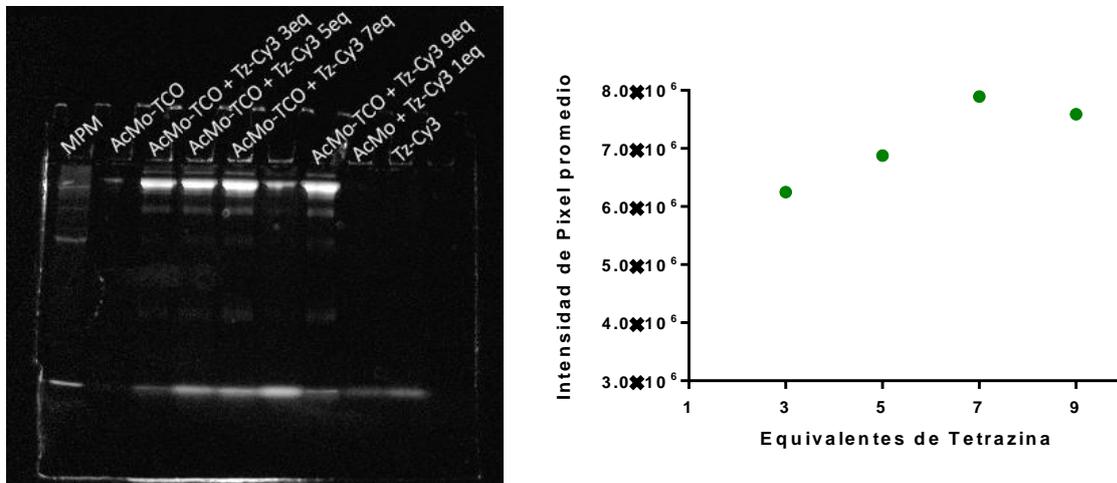


Figura 49. Izq. Gel SDS-poliacrilamida, detección por fluorescencia 540/600 nm (izquierda, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 bevacizumab-TCO, carriles 3,4,5 y 5 bevacizumab-TCO con distintos equivalentes de Tz-Cy3, carril 8 bevacizumab sin TCO y TzCy3, carril 9 Tz-Cy3). Der. Gráfico de cuantificación de la señal de las bandas de bevacizumab-TCO+Tz-Cy3.

Estudio de la cicloadición con los derivados sintetizados

Para confirmar que los complejos marcados, mantienen la capacidad de reaccionar con TCO, se los hace reaccionar con bevacizumab-TCO durante 30 minutos a 37 °C, se cuantifica utilizando CCF. Los resultados muestran que, para ambos complejos ^{99m}Tc -GRTz06 y ^{99m}Tc -GRTz10, ocurre la reacción de cicloadición entre la tetrazina y el *trans*-cicloocteno conjugado al anticuerpo. Se calcula el rendimiento de reacción, obteniendo un 90.3 % y 87.5 %, respectivamente.

Estudios *in vitro* de bioactividad en células B16-F10

Se evaluó la inmunoreactividad del producto de la reacción del AcMo-TCO con la Tz-radiomarcada frente a su antígeno *in vitro*. Para ello se incubaron células que expresan VEGF-A, B16F10. [137] A estas se adicionó el anticuerpo ya acoplado a ^{99m}Tc -GRTz06 y se comparó la radioactividad de la fracción correspondiente al medio de cultivo y a las células luego de 1 y 4 horas de incubación. También se realizó un experimento de bloqueo a las 4 horas, en donde se adicionó 50 veces más de anticuerpo comercial, no marcado (anticuerpo frío), en relación al marcado. En la Figura 50 se observa que el porcentaje de actividad en las células aumenta con respecto al tiempo de incubación, es decir, a mayor tiempo de incubación, mayor es la unión al receptor del producto de la reacción entre el anticuerpo y el radiomarcado ^{99m}Tc -GRTz06. Además, se observa que existe un efecto de bloqueo cuando se saturan los receptores de bevacizumab que no es confirmado estadísticamente, lo que podría explicarse por la baja actividad específica alcanzada en el marcado

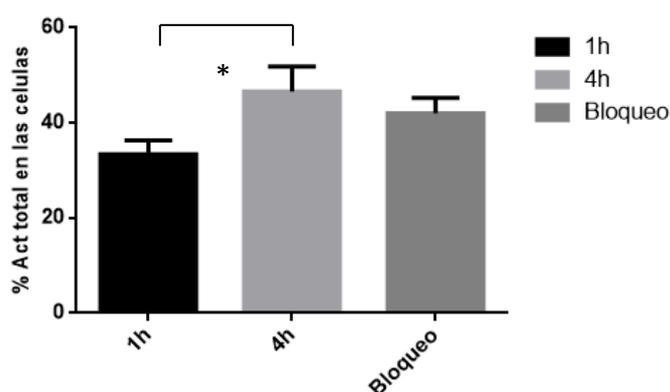


Figura 50. Resultados del ensayo de bioactividad *in vitro* en células B16-F10. (*) Diferencia significativa ($p < 0.05$), ANOVA de una vía

Debido a la dificultad del marcado, el ensayo se realizó con una baja actividad específica, lo que genera que mucho compuesto frío sature los TCO y no permite que se aprecien diferencias significativas.

Estudios *in vivo*

Con la finalidad de evaluar el comportamiento biológico de los derivados de tetrazina, sin reacción bioortogonal, se realizaron estudios de biodistribución de los radiomarcados ^{99m}Tc -GRTz06 y ^{99m}Tc -GRTz10 en ratones normales C57bl/6 (n=3) a 1, 4 y 24 h después de su administración intravenosa.

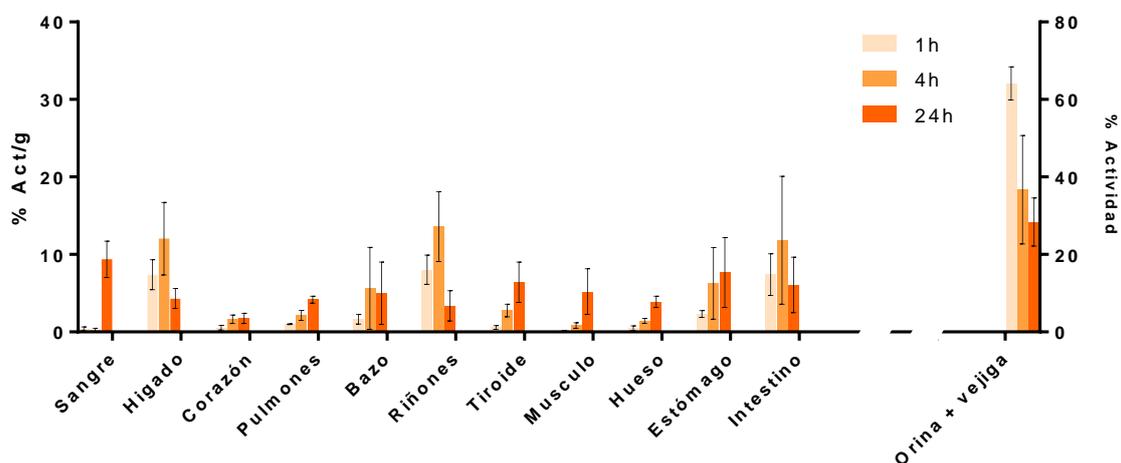


Figura 51. Biodistribución de ^{99m}Tc -GRTz06 en ratones normales C57BL/6

Como se puede observar en la Figura 51 para el compuesto ^{99m}Tc -GRTz06 hay una baja circulación en sangre 4 horas después de la inyección (0.07 ± 0.03 % DI/g), que luego se incrementa levemente a las 24 h. La principal vía de eliminación es la renal ya que se observa un 64.16 ± 4.24 % DI en la orina y vejiga luego de una hora, en menor medida se ve que el hígado e intestino también contribuyen en la eliminación del compuesto alcanzando su máximo a las 4 h (12.02 ± 3.21 y 11.21 ± 5.29 %DI/g). Se observa también que a 24 h

existe leve acumulación inespecífica en tiroides, hueso, estómago y otros órganos no específicos, lo que estaría evidenciando que el marcado se inestabiliza ligeramente *in vivo*.

Se realizó el mismo experimento para $^{99m}\text{Tc-GRTz10}$ (Figura 52), se ve una muy rápida eliminación del compuesto de la sangre (2.26 ± 1.29 %DI/g) en 1 hora luego de la administración. En este caso el compuesto se acumula en el estómago y de acuerdo a la bibliografía [138] podría tratarse de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre, posiblemente producto de una inestabilización *in vivo*. A su vez, se ve que hay una eliminación más lenta, ya que recién a las 24 h el % DI es mayor que el 40 % en la orina y vejiga, lo que indica que hay mayoritariamente presencia de la impureza de ^{99m}Tc más que el compuesto marcado.

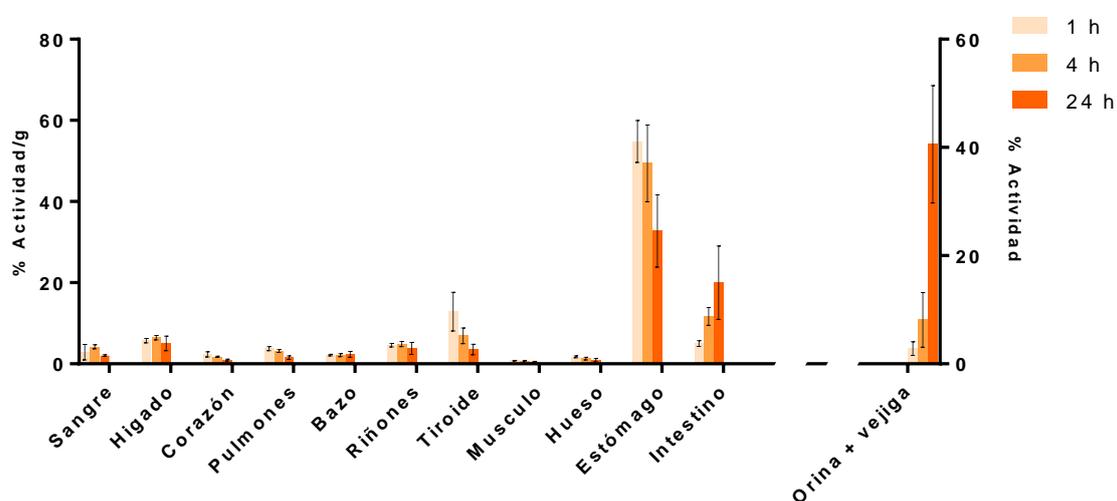


Figura 52. Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-GRTz10}$ en ratones normales C57BL/6

Para analizar la relación entre los datos de LogD y su distribución biológica, se realizaron gráficos de LogD vs %DI-g en tres órganos de interés (hígado, intestinos e riñones)(Figura 53, Tabla 7) Estos resultados permitieron analizar si la hipótesis relacionada con la hidrofilia del agente quelante y la biodistribución fue válida. Así, considerando los datos previos de biodistribución en animales sanos de los radiomarcados antecedentes de este trabajo y los obtenidos por los dos desarrollados en esta tesis se puede observar:

- Como es de esperar, evidenciado también en otros procesos, existe una tendencia cuadrática entre la lipofilia y la acumulación en hígado (Figura 53). La alta hidrofilia de los radiomarcados desarrollados en esta tesis conduce a una relevante acumulación en hígado (en comparación con el antecedente $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-PEG}_4\text{-}$

Péptido-HYNIC). Con los nuevos ligandos preparados en esta tesis no se obtiene una lipofilia óptima (el mínimo en la curva de la Figura 53) para minimizar la bioacumulación en hígado

- Similarmente ocurre con la biodistribución en los intestinos, donde los dos nuevos compuestos sintetizados muestran que son demasiado hidrofílicos, y también no presentan la ID %/g óptima.
- En el caso de la acumulación en riñones no es tan clara la tendencia cuadrática, quizás porque, por un lado, $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-PEG}_4\text{-Peptido-HYNIC}$ puede ser un “outlier” por poseer en su estructura aminoácidos que favorecen la excreción renal más allá de su LogD [139], [140]. De todas formas, los nuevos radiomarcados desarrollados poseen una hidrofilia que los ubica en la región ascendente izquierda de la cuadrática, lo que implica mayor biodistribución en riñones que los radiomarcados antecedentes.

El resultado obtenido coincide con las primeras aproximaciones sobre las características ideales que debe tener un radiofármaco para su uso en una estrategia bioortogonal. Es decir, el radiofármaco debe aumentar la excreción renal y reducir la intestinal, lo que se observa en el complejo formado con el ligando GRTz06.[90]

Tabla 7. Comparación de los valores de $\text{LogD}_{7.4}$ con respecto al %ID/g de los principales órganos de interés obtenidos a partir de biodistribución en ratones normales

Compuesto	LogD _{7.4}	%ID/g 1h pos-inyección		
		Hígado	Intestinos	Riñones
$^{99m}\text{Tc-GRTz06}$	-1.89 ± 0.01	7.5	5.5	8
$^{99m}\text{Tc-GRTz10}$	-1.82 ± 0.03	5	5.5	4
$^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$	-0.54 ± 0.07	14	5	7.5
$^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-PEG}_4\text{-HYNIC}$	-0.62 ± 0.03	10	23.5	1.5
$^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-PEG}_4\text{-Peptido-HYNIC}$	-1.05 ± 0.02	1	0.5	3.5

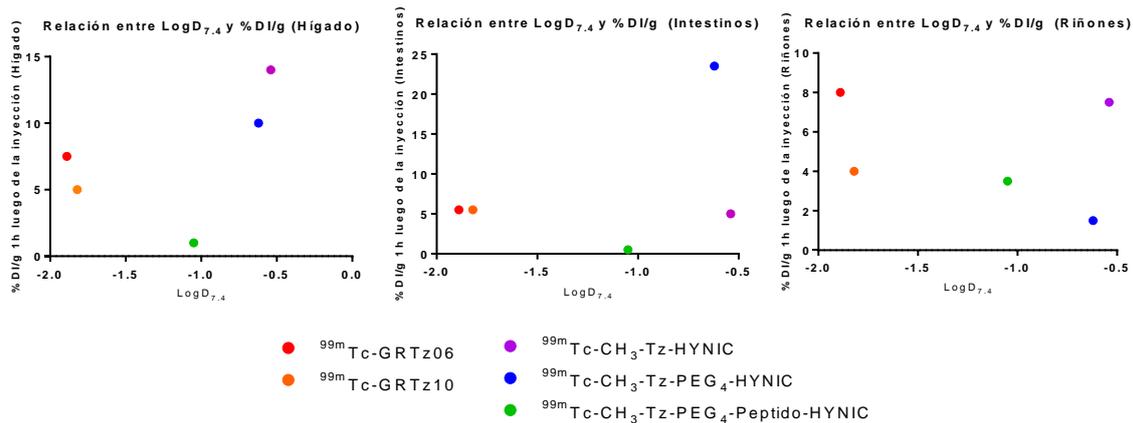


Figura 53. Relaciones entre $\text{LogD}_{7.4}$ y %DI/g en el hígado (izq), Intestinos (centro), y riñones (der) luego de 1 h post inyección para los radiomarcados analizados en la tabla 7.

Estos resultados sientan las bases para nuevas modificaciones estructurales buscando los valores óptimos de LogD para la biodistribución deseada.

Conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis de derivados de cyclam y DTPA con el objetivo de obtener tetrazinas más polares, todos los radiomarcados sintetizados demostraron ser más hidrofílicos que los sintetizados en trabajos anteriores. Se estudiaron las condiciones de marcación con ^{99m}Tc y se observó que los derivados que contienen un fragmento de PEG en su estructura presentaron inestabilidad en las condiciones de marcado no pudiendo ser generados. Para los derivados GRTz10 y GRTz06 se logró establecer condiciones de marcado con moderada PRQ, lo que permitió continuar con la evaluación de los mismos en sistemas biológicos. A los radiomarcados obtenidos se estudió la reacción de cicloadición con bevacizumab-TCO mostrando una alta eficiencia.

Se analizaron los perfiles de biodistribución de GRTz10 y GRTz06. El radiomarcado de GRTz10 mostró una rápida inestabilidad *in vivo*. Por otro lado, el radiomarcado de GRTz06 mostró un perfil más adecuado de biodistribución.

A partir de estos resultados, se decide no continuar trabajando con estos derivados, principalmente debido a la dificultad de obtener marcados con ^{99m}Tc con buena reproducibilidad.

Capítulo II

Agentes de imagen derivados de HYNIC

Objetivos específicos

En el presente capítulo se describen las estrategias exploradas en el diseño de un agente de imagen basado en el anticuerpo monoclonal atezolizumab y mediante una estrategia de marcación bioortogonal para el diagnóstico de melanoma. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la expresión de PD-L1 en las líneas de melanoma murino B16F1, B16F10 y Tm1MT.)
- Caracterizar la reacción *in vitro* entre el sistema atezolizumab-TCO y $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$.
- Estudiar la estrategia utilizando atezolizumab-TCO y Cy5-CH3-Tz o Cy3-CH3-Tz
- Emplear *in vivo* la estrategia pre-dirigida entre $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ y el anticuerpo anti-PD-L1 para un nuevo enfoque pre-dirigido de diagnóstico de melanoma.

Antecedentes y justificación

En el presente capítulo se explora el uso del proceso bioortogonal utilizando el anticuerpo atezolizumab (Tecentriq®). Este AcMo humanizado bloquea la unión del ligando de muerte programada (PD-L1 por su sigla en inglés) con la proteína de muerte programada 1 (PD-1). Esta vía, PD-1/PD-L1, controla la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmune con el microambiente tumoral, es decir actúa como un freno a la respuesta inmune. La unión de PD-1 presentes en las células del sistema inmune con sus ligandos PD-L1 en otra célula evita una respuesta citotóxica de las células T hacia las células que expresan PD-L1 favoreciendo la supervivencia de éstas. [141] La activación de PD-L1/PD-1 lleva a las células T a la apoptosis y anergia, por lo que es un mecanismo por el cual las células tumorales se valen para evadir al sistema inmunitario. Se ha descrito que PD-L1 presenta una expresión aumentada en varios tipos de cánceres, por lo que bloquear la unión de PD-L1/PD-1 es un blanco de la inmunoterapia contra el cáncer. [142], [143]

La regulación de PD-L1 se puede dar principalmente por microRNAs, [144] o por interferones, particularmente el interferón gamma (IFN- γ), induce la expresión de PD-L1 en células T, macrófagos, mieloides, células B, células epiteliales, en células del endotelio vascular y en células tumorales.[145]

En base a los resultados obtenidos en el capítulo I, en el presente capítulo se describe el estudio de la reacción bioortogonal utilizando el derivado CH₃-Tz-Hy para la marcación del AcMo atezolizumab. Como ya se mencionó, el Área de Radiofarmacia del Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias se ha utilizado HYNIC como quelante de ^{99m}Tc en varias líneas de investigación, más específicamente se desarrollaron los derivados conteniendo un grupo tetrazina en su estructura, mencionados en la Figura 19 (en la Introducción). Si bien el derivado de CH₃-Tz-Hy mostró falencias en los perfiles de biodistribución, es muy útil para utilizarlo como prueba de concepto por la relativa facilidad de su síntesis y marcación. Se presentan los resultados de expresión de PD-L1 obtenidos en las diferentes líneas celulares estudiadas, la caracterización química y biológica de atezolizumab marcado con tecnecio-99m

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los diferentes abordajes que utilizan atezolizumab frente a diferentes líneas celulares. Para ello se seleccionaron dos líneas de melanoma murino, B16F10 derivada de ratones C57BL/6J y que es un subclon de la línea B16 generada inyectando a ratones células tumorales B16, colectando y cultivando las células de los tumores secundarios generados repitiendo el proceso 10 veces, de esta manera se obtiene una línea con mayor capacidad de formar metástasis. Esta línea se encuentra estudiada como modelo para el estudio de melanoma [146] y más específicamente se ha utilizado en modelo de melanoma para el estudio de la terapia basada en PD-L1. [136], [137]

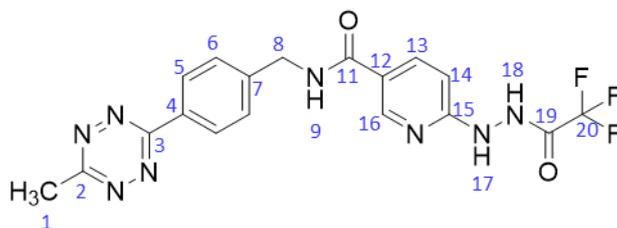
La otra línea celular que se utilizó fue Tm1MT, derivada de la línea celular TM1, producida a partir de un linaje de melanocitos inmortalizados no tumorigénicos, Melan-a. [149] El uso de líneas derivadas de TM1 como modelo de melanoma ha sido descrito, [150] no así para el estudio de PD-L1 en modelos de melanoma.

Materiales y Métodos

Química

Síntesis de *N*-[4-(6-metil-[1,2,4,5]tetrazin-3-il)encil]-6-trifluoroacetilhidracino-3-piridincarboxamida (*CH*₃-Tz-Hy)

Previo a la reacción se neutraliza hidrocloreuro de [4-(6-metil-[1,2,4,5]tetrazin-3-il)encil]metanamina (50.2 mg, 2.50×10^{-4} mol) agregando gota a gota una disolución acuosa de NaOH (1M). La tetrazina neutralizada se extrae utilizando DCM y la fase orgánica, luego de secada, se evapora a presión reducida. El sólido se resuspende en THF (2 mL, 2.47×10^{-2} mol) y se adicionan *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (25 μ L, 2.75×10^{-4} mol) y 6-trifluoroacetilhidracinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidinilo (95mg, 2.75×10^{-4} mol). La reacción se agita a T. Amb durante 24 h. El disolvente se evapora a presión reducida y se purifica el producto final utilizando múltiples CCF (alúmina, DCM:MeOH, 95:5). Se obtiene *CH*₃-Tz-Hy como un sólido de color fucsia (48 mg, 77 %).



¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.40 (sa, 1H, 18), 9.07 (sa, J = 4.8 Hz, 1H, 17), 8.65 (s, 1H, 16), 8.44 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 5), 8.07 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 13), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 6), 6.73 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 14), 4.57 (d, J = 4.8 Hz, 2H, 8), 2.99 (s, 3H, 1).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.25 (2), 165.87 (11), 163.16 (3), 158.23 (19), 158.09 (15), 148.57 (151), 145.17 (4), 136.46 (13), 130.41 (7), 128.23 (5), 127.62 (6), 117.22 (12), 113.04 (20), 104.39 (14), 42.38 (8), 20.99 (1).

Marcación con ^{99m}Tc

Para el marcado con ^{99m}Tc del compuesto *CH*₃-Tz-Hy, se utilizaron principalmente dos condiciones distintas:

Método 1

En un tubo de 1.5 mL, se adiciona CH₃-Tz-Hy (20 µg, 1 µg/µL en DMSO), seguidamente se adiciona una disolución de SnCl₂ recién preparada en HCl 1M (12 µL 1 mg/mL), una disolución acuosa de tricina (62 µL, 100mg/mL) y disolución salina de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 µL, 100 MBq). Se controla el pH y se incuba 15 minutos a T. Amb. Las purezas radioquímicas se determinaron por HPLC (*método 1*, ver capítulo I) y por CCF.

Método 2

En un tubo de 1.5 mL, se adiciona CH₃-Tz-Hy (2 µg, 1 µg/µL en DMSO), seguidamente se adiciona una disolución de SnCl₂ recién preparada en EtOH (20 µL, 1 mg/mL), una disolución acuosa de tricina (62 µL, 100mg/mL) y disolución salina de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 µL, 100 MBq). Se controla el pH y se incuba 30 minutos a 60 °C. Las purezas radioquímicas se determinaron por HPLC (*método 1*) y por CCF.

Anticuerpo

Purificación de atezolizumab

Con una jeringa estéril se toma atezolizumab (25 mg/mL, 0.3 mL) y se purifica por columna PD-10. La columna se equilibra lavando con PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar, 20 mL), luego la muestra se diluye en 1 mL y se eluye utilizando PBS, se recogen fracciones de 1mL. La concentración del anticuerpo se cuantifica por absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 1.4 \text{ cm mg}^{-1}$).

Conjugación de TCO a atezolizumab

A una disolución de anticuerpo en PBS (2 mg, 1.3 nmol), se añade buffer Na₂CO₃/NaHCO₃ (1 M, pH = 9.5, 40 µL) y se controla el pH de la disolución resultante. Seguido de la adición de TCO-NHS (6.5 µL, 13 nmol, Click Chemistry Tools, 5 mg/mL en DMSO seco), con un volumen de reacción final ajustado a 0.5 mL con PBS. La mezcla de reacción se protege de la luz y se deja reaccionar a T. Amb durante 30 min con agitación lenta. El AcMo conjugado se purifica por PD-10 en PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar). La concentración del AcMo-TCO purificado se determina midiendo la absorbancia a 280 nm y se almacena a 4 °C.

Determinación de los equivalentes de TCO por equivalente de anticuerpo

La cantidad de TCO reactivos por molécula de anticuerpo se determina mediante electroforesis SDS-PAGE después de la reacción de diferentes concentraciones de Cy3-CH₃-

tetrazina (Click Chemistry tools, 1µg/µL) con atezolizumab-TCO. Se incuban alícuotas de 100 µg de disolución de atezolizumab-TCO (4 mg/mL) con 1, 3, 6, 9 y 12 equivalentes de Cy3-CH₃-tetrazina en un volumen final de 100 µL durante 30 minutos a T. Amb. Seguidamente, alícuotas de cada reacción y el marcador de masa molecular se siembran en un gel de poliacrilamida al 10 % y se separan mediante electroforesis utilizando un buffer de electroforesis (10 % SDS). Para la detección de Cy3 se utiliza el equipo In-Vivo MS FX PRO (Bruker) obteniendo la imagen de fluorescencia a 540 nm/600 nm. El gel se revela con Coomassie para confirmar la ubicación de atezolizumab y el marcador de masa molecular. Para el análisis, se seleccionan las regiones de las bandas correspondientes al anticuerpo unido a la tetrazina y se cuantifica la intensidad promedio de pixeles por cada región seleccionada. El número de moléculas de TCO por molécula de anticuerpo se calcula, se grafica y se observa la banda en donde la intensidad de fluorescencia se mantiene constante.

Reacción de cicloadición sobre el anticuerpo

Se hace reaccionar 50 µL de una disolución 1 mg/mL de atezolizumab-TCO con una alícuota de 50 µL (0.2 kBq) de la disolución del radiomarcado ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy. Como control negativo se incubaba la misma fracción purificada por HPLC con atezolizumab sin conjugar a TCO en iguales condiciones. La reacción de cicloadición se purifica y controla por PD-10 y se cuantifica la radioactividad en un contador de NaI.

Estudios *in vitro*

Previo a los estudios *in vitro* se realizó la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y Cy5-CH₃-Tz y Cy3-CH₃-Tz (Click Chemistry tools)

Cultivo celular

Para los cultivos celulares realizados los medios de cultivo, PBS y SFB se obtienen de Capricorn Scientific. La solución de disociación celular de TrypLE™ Express se obtiene de Gibco. Las líneas celulares de melanoma murino B16F1 y B16F10 fueron obtenidas de la colección celular de la ATCC (American Tissue Culture Collection), la línea celular Tm1MT fue cedida por el Prof. Roger Chammas (Universidad de San Pablo, Brasil). Las líneas B16F1 y B16F10 se cultivan en medio DMEM con 10 % de SFB y la línea celular Tm1MT en medio RPMI con 5 % de SFB a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Citometría de flujo

La expresión de PD-L1 en las membranas celulares de las líneas tumorales (B16F1, B16F10 y Tm1MT) se realizó mediante citometría de flujo. A su vez, se estudió el efecto inductor del IFN- γ (Millipore IF005) sobre la expresión de PD-L1 en las líneas celulares mencionadas. Las células se cultivaron en frascos T25 utilizando los medios de cultivo completos correspondientes y se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % CO₂. Para la condición en presencia de IFN- γ , luego de 24 h se adicionó IFN- γ (10 ng/mL) al cultivo. Luego del período de incubación (24 h) las células se lavaron con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y se procedió a levantarlas utilizando un *scraper*. Las células se resuspendieron en buffer PBS 2 % SFB y EDTA 1 mM a una concentración de 1×10^6 células en 50 μ L. Se marcaron durante 30 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ L de un buffer PBS 2 % SFB y EDTA 1 mM. Las células fueron marcadas utilizando: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD274 conjugado a APC (Biolegend, CA, USA), inmunoglobulina de rata IgG2b conjugada a APC como control de isotipo (Biolegend, CA, USA) y atezolizumab-TCO-Cy5-CH₃-Tz (0,6 μ g por cada 1×10^6 células). Se adquirieron 10.000 eventos por muestra en citómetro FACS Canto II (BD Bioscience) utilizando el software FACS Diva. Los resultados fueron analizados utilizando FlowJo, LLC.

Estudio de la bioactividad in vitro entre ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy y atezolizumab-TCO

Para el estudio de bioactividad *in vitro* se realiza el ensayo en placas de cultivo de 24 pocillos, realizando cada condición por cuatriplicado. Se incuban 100000 células Tm1MT por pocillo cuando llegan a confluencia las células se lavan con PBS/0.2 % BSA. Se adiciona 1.5 pg (37 kBq) de atezolizumab-TCO por pocillo que previamente se hizo reaccionar con ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy (3.7 MBq, método marcación 2). Se incuban por 1 y 4 h, por otra parte, se realiza un bloqueo a 4 h con el anticuerpo frío coinyectándolo en una relación 100:1 con respecto al radiomarcado. Los pocillos se lavan con PBS/0.2 % BSA y se colecta el medio en un tubo (medio), las células se lavan con 0.5 mL de buffer glicina pH = 2 y se colecta (membrana), por último las células se desprenden con disolución acuosa de NaOH (1 M) y se colectan en otro tubo (células). La radioactividad se cuenta en contador de NaI. Se grafica el promedio del porcentaje de actividad total en la célula siguiendo la Ecuación 3

$$\% \text{ de actividad en células} = \frac{\text{actividad en células}}{\text{actividad en células} + \text{membrana} + \text{medio}} \times 10$$

Determinación de la fracción inmunorreactiva

La fracción inmunorreactiva de atezolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy se determina de acuerdo al ensayo descrito por primera vez por Lindmo et al. [151] En una placa de 24 pocillos se incuba una concentración constante de atezolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy (90 pM, 7.4 MBq) y diluciones seriadas de células Tm1MT (6 × 10⁶ – 0.1 × 10⁶ células/mL) en RPMI conteniendo 0.5 % de BSA. La unión no-específica se determina con el agregado de un exceso de anticuerpo sin marcar (100 mol en la relación de menor concentración de células utilizada). Luego de 2 horas de incubación a 37 °C, se centrifugan las células a 3000 g y se remueve el sobrenadante, las células se lavan dos veces con PBS 1 % BSA y se centrifugan los tubos nuevamente a 3000 g, el sobrenadante se remueve y se cuantifica la actividad en el pellet en un contador gamma. El ensayo se realiza por cuadruplicado. Para cada concentración, la unión específica se determina restando la unión inespecífica del total de las cuentas. Se grafica la inversa de la unión específica vs la inversa de la concentración de células, mediante regresión lineal, utilizando Graph Pad Prism 6, se calcula la ordenada en el origen que se corresponde con la inversa de la fracción inmunorreactiva.

Determinación de IC₅₀

Se cultiva en una placa de 24 pocillos células Tm1MT, una vez que llegan a la confluencia se realiza el ensayo de IC₅₀ del bloqueo de PD-L1 con atezolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy. Se incuban las células por 2 horas en hielo en PBS 0.5 % BSA, conteniendo 30 µL de una disolución 1 × 10⁻¹⁰ M de atezolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy (18.5 kBq, metodo marcación 2) y diluciones seriadas de atezolizumab sin modificar entre 1 × 10⁻⁷ y 1 × 10⁻¹² M por cuadruplicado. Luego de la incubación las células se lavan dos veces con PBS y se recoge en un tubo, las células adheridas se desprenden con disolución acuosa de NaOH (1 M) y se registra la actividad de cada fracción en un contador gamma. El IC₅₀ se define como la concentración de anticuerpo requerida para inhibir en un 50 % la unión del anticuerpo marcado. Los cálculos de IC₅₀ se realizan utilizando Graph Pad Prism 6.

Estudios *in vivo*

Modelo tumoral

Los experimentos de la reacción bioortogonal *in vivo* se realizan en un modelo murino de melanoma en ratones C57BL/6J. Se inoculan 150000 células Tm1MT disueltas en 0.1 mL de PBS vía subcutánea en la zona del flanco dorsal del animal. A partir de la fecha de inoculación se realiza seguimiento diario de los ratones alcanzando los tumores una masa de 0.2 g aproximadamente luego de 12 días. Los procedimientos fueron aprobados por la CEUA de la Facultad de Ciencias.

Biodistribución

Estudio de la reacción bioortogonal en modelo tumoral murino

Los experimentos de cicloadición *in vivo* se realizan en ratones C57BL/6J portadores de tumores de melanoma inducido con células Tm1MT. Se estudian 5 condiciones distintas, a un único tiempo (4h)

- Reacción bioortogonal 1. Se administra de forma intravenosa 10 µg (en 0.1 mL de PBS) de atezolizumab-TCO por animal, se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente se administra 5.5 MBq de ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy (9.6 MBq/µg) y se le permite circular durante 4 h.
- Reacción bioortogonal 2. Se administra de forma intravenosa 100 µg de atezolizumab-TCO (en 0.1 mL de PBS), se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente se administra 2 MBq de ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy por animal (0.216 kBq/µg) y se le permite circular durante 4 h.
- Bloqueo para Reacción Bioortogonal 1. Se administra 10 µg de atezolizumab-TCO y 100 µg mg de atezolizumab sin modificar para realizar un bloqueo, se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente se administra 5.5 MBq de ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy por animal (9.6 MBq/µg) y se le permite circular durante 4 h.
- Atezolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy. La última condición se corresponde con la administración del producto de la reacción de cicloadición previamente realizada, se administra 9.0 MBq de ^{99m}Tc-atezolizubab-TCO- CH₃-Tz-Hy por animal (0.9 MBq/ µg de Ab) y se le permite circular durante 4 h.

- Atezolizumab + $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$. Se administra 100 μg de atezolizumab sin modificar, se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente, se administra 5.5 MBq de $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ (9.6 kBq/ μg) y se le permite circular durante 4 h.

Posteriormente los animales se sacrificaron y se realiza el estudio de biodistribución en los órganos.

Estudios de Imagen

Para los estudios de imagen se realizó utilizando un equipo de SPECT/CT (NanoScan, Mediso), se utilizaron ratones C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas con un tumor de melanoma inducido con células Tm1MT. Se estudiaron dos condiciones:

- Reacción bioortogonal. Se administra de forma intravenosa 100 μg de atezolizumab-TCO (en 0.1 mL de PBS), se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente se administra 40 MBq por animal de $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ (5 MBq/ μg) y se le permite circular durante 4 h.
- Tetrazina control. Se administra 100 μg de atezolizumab sin modificar, se permite su biodistribución por 24 h. Al día siguiente, se administra 40 MBq de $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ (5 MBq/ μg) y se le permite circular durante 4 h.

Resultados y discusión

Química

El compuesto $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$ había sido sintetizado previamente en el grupo, la estrategia de síntesis del mismo se resume en la Figura 54. Las condiciones de reacción previamente descritas del paso de amidación incluyen la utilización de 2 equivalentes de base que tienen el objetivo de desprotonar el hidrocloreto de tetrazina. Para ello se ensayaron varias condiciones utilizando dos aminas terciarias distintas DIPEA y Et_3N , de ellas se observó que cuando se utilizaba DIPEA el rendimiento de reacción era superior, obteniéndose un 27 % como un valor máximo. En este trabajo de tesis se modificó la estrategia, en donde, en lugar de intentar desprotonar la amina en el medio de reacción, se realiza una neutralización

previa, utilizando una base fuerte como NaOH. Luego, la tetrazina neutralizada se utiliza como reactivo en la reacción siguiente. De esta manera se logró incrementar el rendimiento a 77 % luego de la purificación.

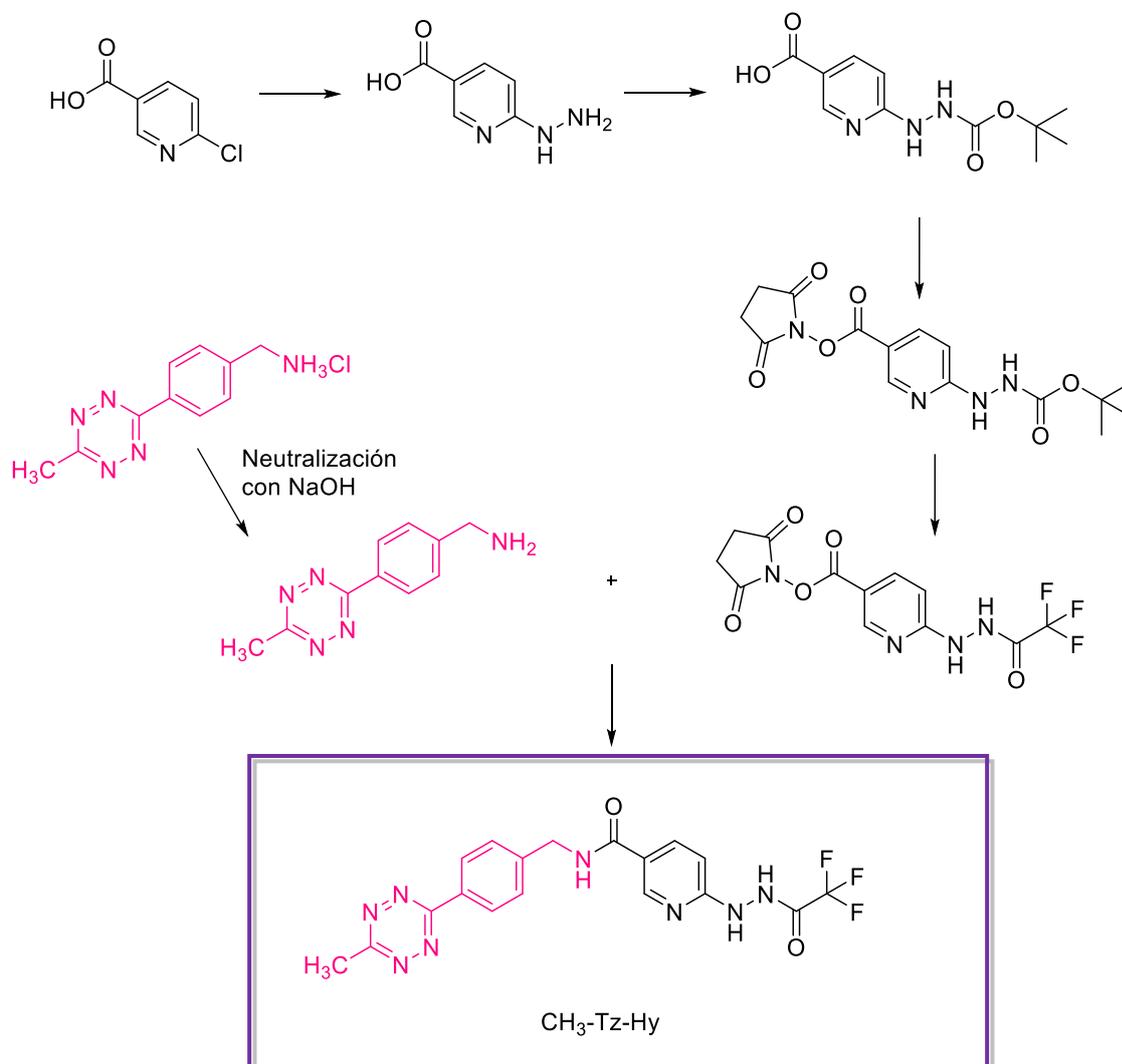


Figura 54. Esquema de la síntesis de $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$

Marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$

En primer lugar, las condiciones de marcación utilizadas fueron las mismas que las descritas en la tesis doctoral de la Dra. Ma. Fernanda García, en donde se obtuvieron marcados con alta PRQ siguiendo el *método 1*. Debido a que los ensayos *in vitro* e *in vivo* demandan obtener una alta actividad específica, se buscó disminuir la cantidad de tetrazina utilizada en la marcación empleando la misma actividad, descrita previamente de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. [152] Sin embargo, cuando se trabajó con cantidades menores a 10 μg de la Tz, se obtuvieron PRQ menores al 50 % con importante presencia de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Es por ello que luego de un proceso

de optimización del marcado se llegó al *método 2*. Las principales diferencias entre estos dos métodos son: un pequeño incremento en la cantidad del agente reductor (SnCl_2) debido a la presencia de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ y un incremento en el tiempo y la temperatura de reacción. Con dichas modificaciones se lograron obtener PRQ cercanas al 100 % (Figura 55) lo que posibilitó continuar con los experimentos en la línea celular de estudio. En la Figura 55 se observa además un pico en 13.1 min que se corresponde con $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$ sin desproteger

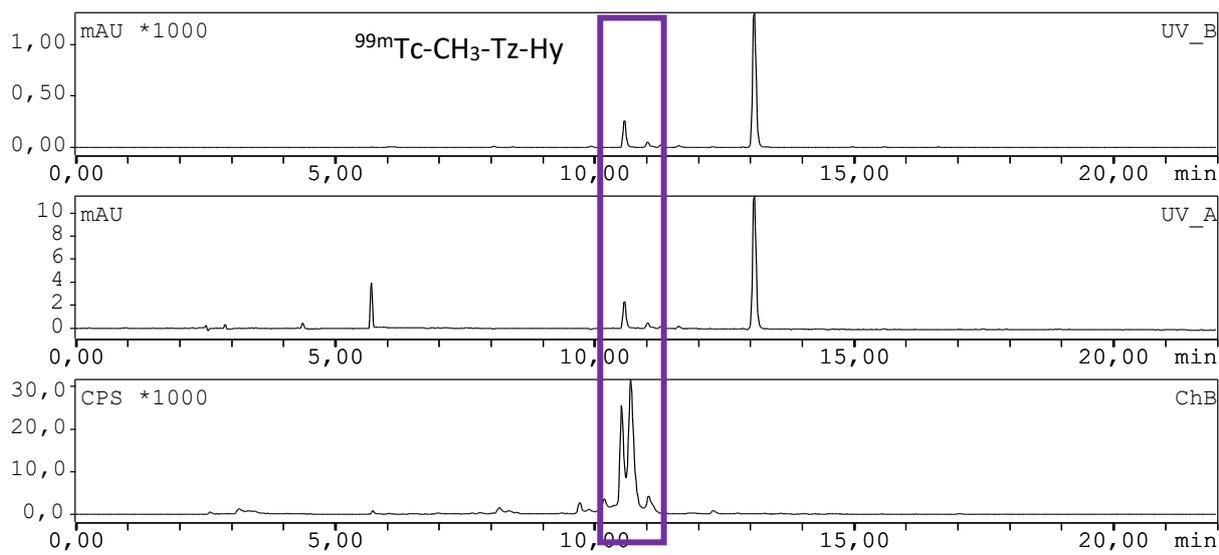


Figura 55. Marcación de $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$ utilizando el método 2. Arriba: Canal 260nm. Medio: Canal 515 nm. Abajo: Canal gamma.

Anticuerpo

Conjugación de TCO a atezolizumab

Se realizó el procedimiento de conjugación del anticuerpo atezolizumab con TCO-NHS siguiendo el procedimiento habitual, verificando que se unen 8 fragmentos derivados de TCO por cada molécula de anticuerpo.

Reacción de cicloadición

La reacción de cicloadición entre $^{99\text{m}}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ y atezolizumab-TCO se optimizó para realizar los estudios *in vitro*. De acuerdo a artículos publicados se deben utilizar concentraciones entre 10^{11} y 10^{10} M de anticuerpo-TCO para realizar ensayos *in vitro*. [152] Cuando se marcan 3.3×10^{-8} mmol de atezolizumab-TCO con 2.4×10^{-7} mmol de tetrazina radiomarcada (7 eq) se observa que la reacción es completa (Figura 56) ya que

toda la actividad se concentra en las fracciones 4 y 5, de existir $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ sin reaccionar, se observaría actividad en las fracciones entre 11-14.

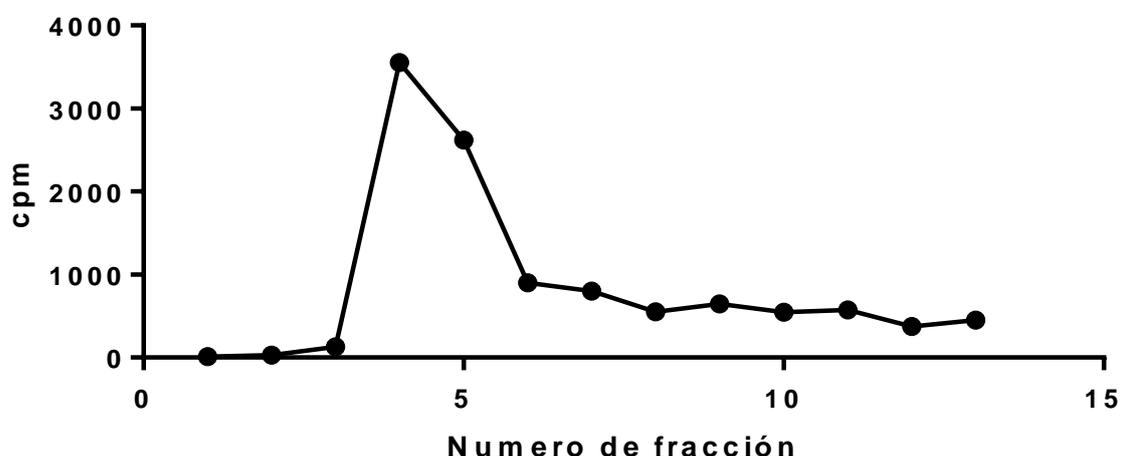


Figura 56. Cuentas por minuto para cada fracción obtenida por PD-10 de la reacción de cicloadición entre atezolizumab-TCO y $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$

También se caracterizó la reacción entre atezolizumab-TCO y las tetrazinas acopladas a fluoróforo Cy3 y Cy5, Cy3-CH3-Tz y Cy5-CH3-Tz (Click Chemistry tool), observando que la reacción entre las tetrazinas y el anticuerpo es completa, ya que toda la absorbancia proveniente de los fluoróforos se concentra en el pico de 9.5 min Figura 57

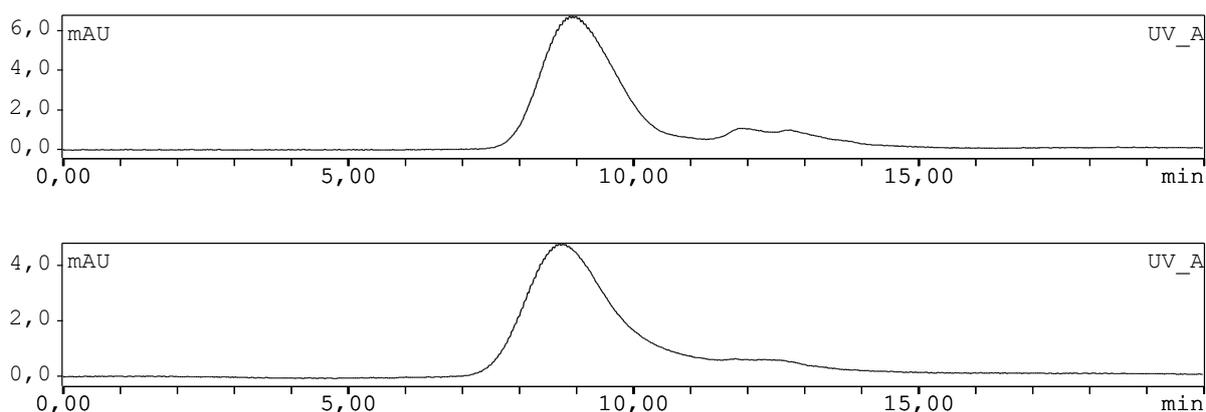


Figura 57. Cromatograma de HPLC para las reacciones de cicloadición entre atezolizumab-TCO y las tetrazinas acopladas a fluoróforo, Cy3-CH3-Tz (arriba) y Cy5-CH3-Tz (abajo), detección canal 515 nm.

Estudios *in vitro*

Citometría de flujo

Primeramente, se evaluó la expresión de PD-L1 a nivel de la superficie celular en las líneas celulares de melanoma B16F1, B16F10 y Tm1MT, utilizando anticuerpo comercial anti-PD-L1 murino conjugado a APC. En los ensayos de citometría se observa que Tm1MT es la línea celular que presenta mayor expresión del ligando, tanto en ausencia como en presencia de IFN- γ (Figura 58). Adicionalmente, en las tres líneas estudiadas se puede constatar el efecto inductor del IFN- γ sobre la expresión de PD-L1.

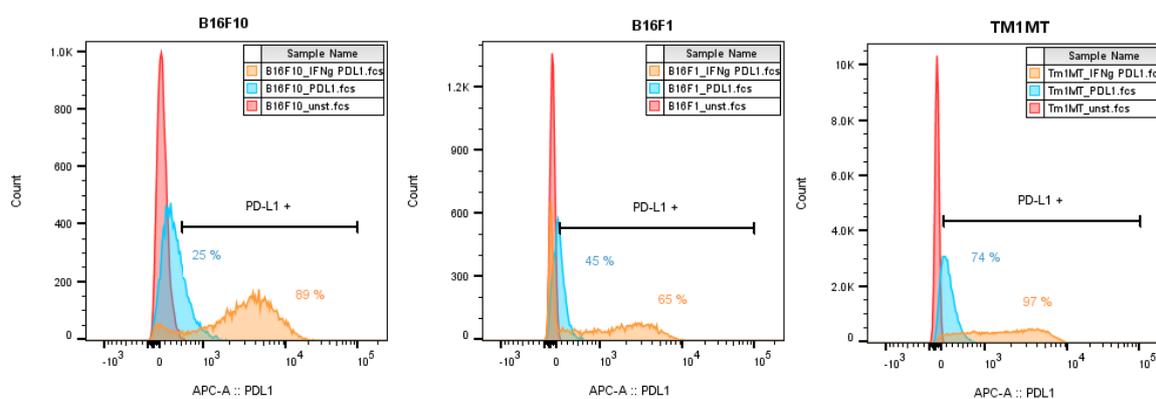


Figura 58. Resultados de la citometría de flujo para evaluar la expresión de PD-L1 en B16F1, B16F10 Y Tm1MT utilizando anticuerpo comercial (□ unst (sin tinción), □ PDL1, □ PDL1 IFN- γ). Los histogramas con los isotipos y los unst de las distintas condiciones son comparables (resultados no mostrados)

Seguidamente, con la línea que presentó mayor expresión de PD-L1, se realizó un experimento similar, pero esta vez utilizando el sistema atezolizumab-TCO-Cy5-CH3-Tz obtenido previamente mediante la reacción de cicloadición entre la correspondiente Tz y atezolizumab-TCO. Se observó el reconocimiento del conjugado desarrollado por su blanco molecular en las células estudiadas, tanto en presencia como en ausencia de IFN- γ (Figura 59). Estos resultados demuestran que la reacción bioortogonal puede ser utilizada como un sistema modular de síntesis, permitiendo la obtención de distintos conjugados a partir de un mismo AcMo de forma sencilla

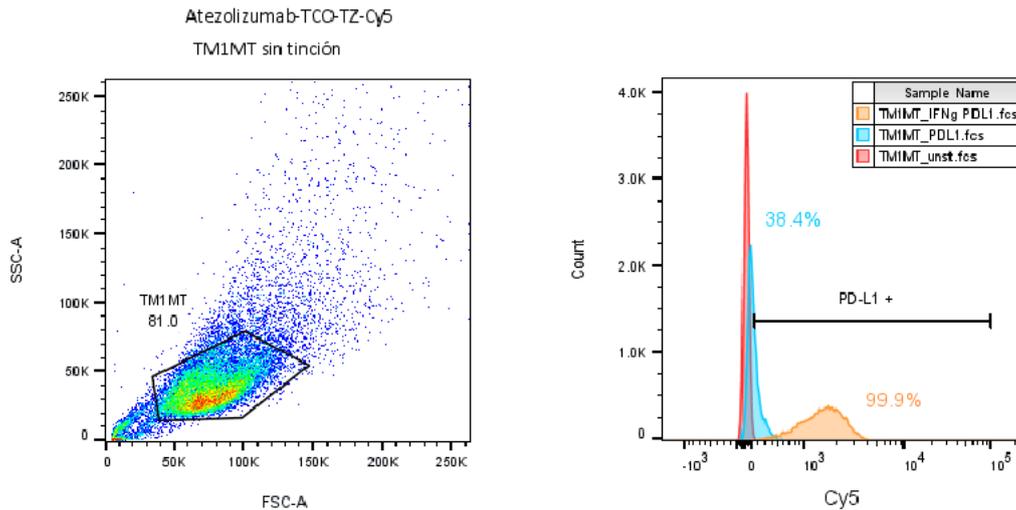


Figura 59. Resultados de la citometría de flujo utilizando atezolizumab-TCO-Cy5-CH₃-Tz-Hy en la línea celular Tm1MT. A la izquierda se muestra la estrategia de gating y en la derecha el histograma de la intensidad de fluorescencia en la línea Tm1MT en presencia y ausencia de IFN-γ (□ unst (sin tinción), □ PDL1, □ PDL1 IFN-γ). Estudio de unión de ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy en células Tm1MT y de bloqueo

Estudio de la reacción de cicloadición entre ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy y atezolizumab-TCO *in vitro*.

Con el objetivo de estudiar la unión del anticuerpo marcado ^{99m}Tc-atezolizumab-CH₃-Tz-Hy se realizó la caracterización biológica *in vitro*. Para las líneas celulares B16F10 y Tm1MT, se realizó un ensayo de unión y bloqueo, además se evaluó si la adición de INF-γ aumenta la expresión de PD-L1.

En la Figura 60 y Figura 61, se observan los resultados de unión e internalización del anticuerpo radiomarcado en las líneas B16F10 y Tm1MT. Para la línea B16F10 no se observa un aumento significativo en el % Actividad unido a las células cuando se incubó 1 o 2 h con el radiomarcado. Ante la presencia de IFN-gamma se constata un aumento en el % Actividad unida e internalizada a las células tanto a 1 y 2 h, lo que se puede correlacionar un aumento en la expresión del blanco molecular en las condiciones mencionadas. Adicionalmente fue posible observar un bloqueo significativo de la unión de radiomarcado a las 2 h y en presencia de IFN-γ.

Para la línea Tm1MT se observa un porcentaje de actividad unido e internalizado similar a la hora y dos horas de incubación. Sin embargo ante la presencia de IFN-gamma se constata un aumento significativo en el porcentaje de actividad unida e internalizada en los dos

tiempos estudiados, lo que nuevamente se puede correlacionar un aumento en la expresión del blanco molecular en las condiciones mencionadas. Adicionalmente fue posible observar un bloqueo significativo de la unión de radiomarcado a las 2 h y en presencia de IFN.

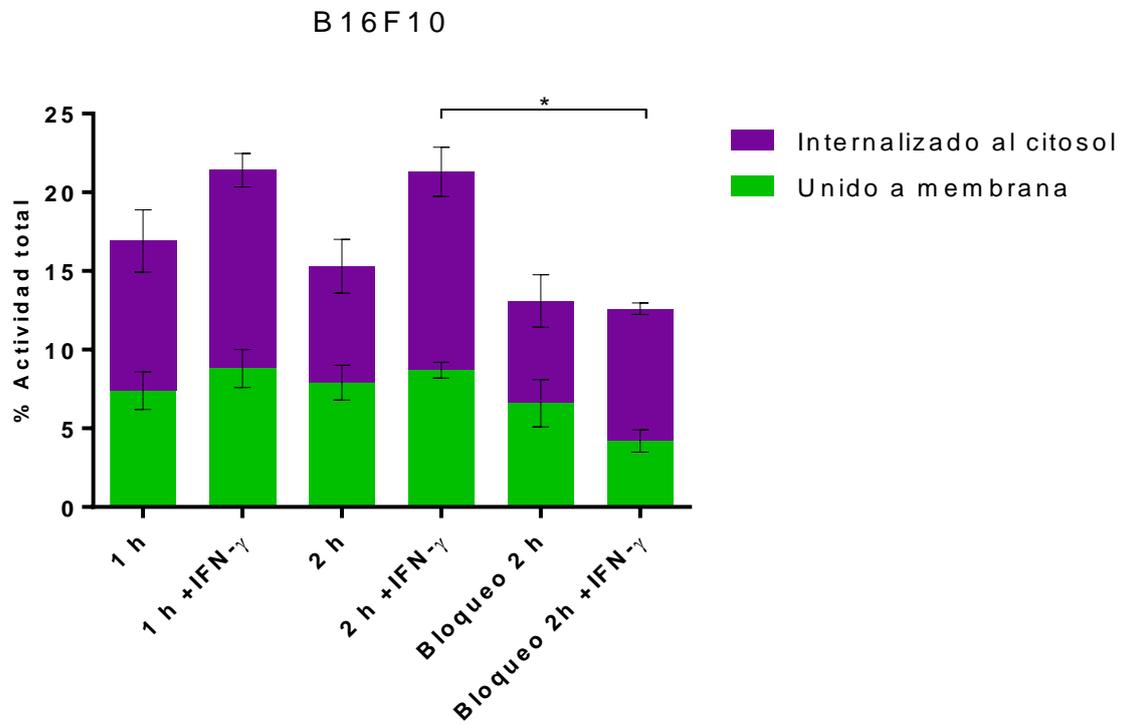


Figura 60. Resultados del experimento de unión y bloqueo de ^{99m}Tc -atezolizumab- $\text{CH}_3\text{-Tz-Hy}$ en células B16F10. (*) Diferencia significativa en el total ($p < 0.05$, t-student)

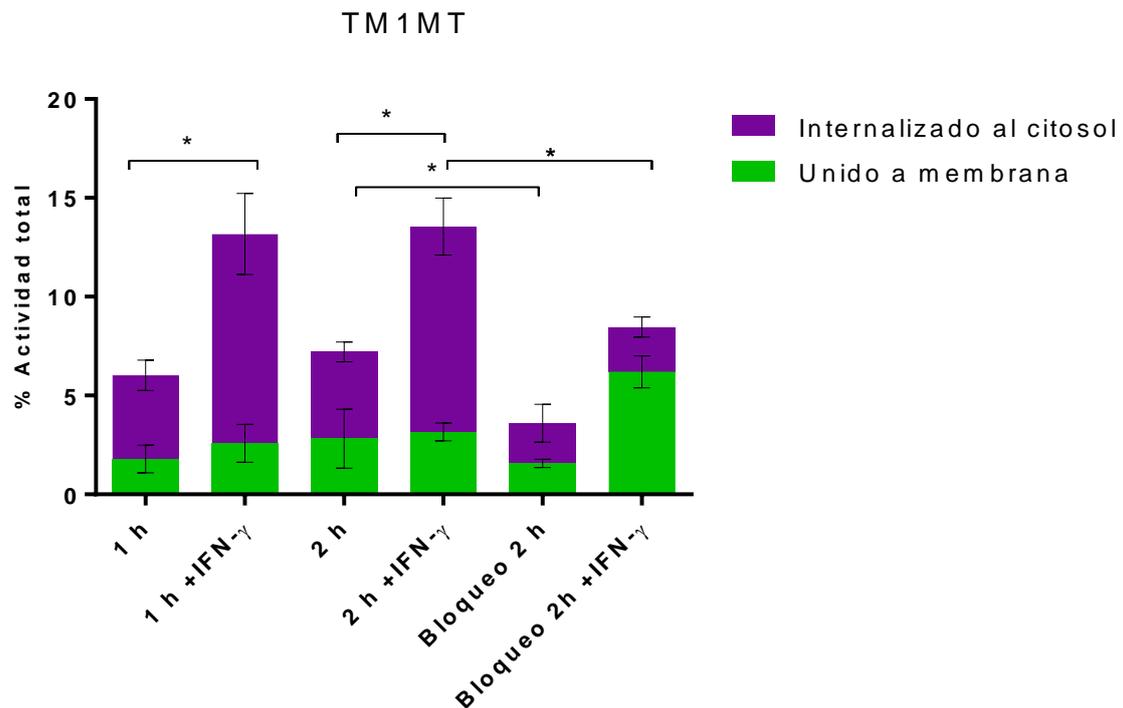


Figura 61. Resultados del experimento de unión y bloqueo de ^{99m}Tc -atezolizumab- CH_3 -Tz-Hy en células Tm1MT. (*) Diferencia significativa en el total ($p < 0.05$), t-student)

Determinación de la fracción inmunorreactiva

Se determinó la fracción inmunorreactiva para atezolizumab-TCO luego de la reacción con ^{99m}Tc - CH_3 -Tz-Hy con el fin de evaluar que tanto se ve afectada la capacidad de unión del anticuerpo por su antígeno, luego del proceso de conjugación y marcación. [151] Dicho parámetro se determinó utilizando la línea celular Tm1MT y se realizaron dos condiciones, en presencia y en ausencia de $\text{INF-}\gamma$. El resultado obtenido fue $42 \pm 1 \%$ y $51 \pm 7 \%$, respectivamente, si bien este resultado indica que aproximadamente la mitad de los anticuerpos no se unen a su antígeno, en otros estudios que utilizan atezolizumab, pero con otras modificaciones estructurales, los resultados se encuentran entre un 50 y un 70 % utilizando el mismo método de determinación (Figura 62). [140], [142], [146], [147]

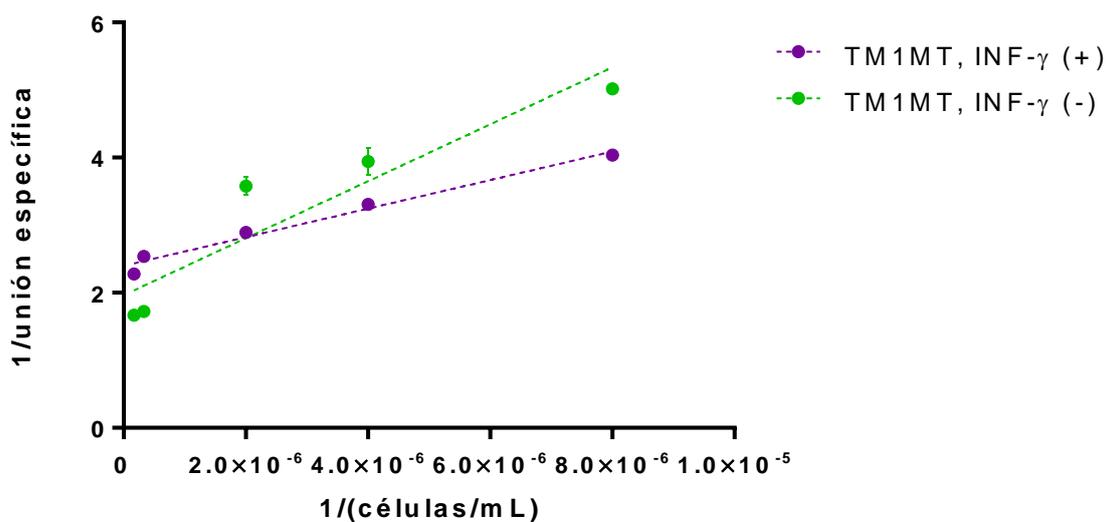


Figura 62. Resultados del experimento de determinación de la fracción inmunorreactiva en la línea celular Tm1MT, para ^{99m}Tc-atézolizumab-TCO-CH₃-Tz-Hy.

IC₅₀

La cantidad de anticuerpo sin modificar necesario para bloquear la unión de ^{99m}Tc-atézolizumab-TCO-^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy se evaluó en un ensayo de IC₅₀ utilizando Tm1MT en condiciones de cultivo normal manteniendo una concentración fija de AcMo marcado y utilizando diferentes concentraciones del AcMo sin modificar. Se obtuvo un valor de IC₅₀= 5.3 × 10⁻¹⁰ M (Figura 63), observando un comportamiento dependiente de la dosis. Este valor se encuentra en el orden esperado de acuerdo a otros ensayos similares y al de atézolizumab determinado por otra técnica (IC₅₀= 19.9 × 10⁻¹⁰ M según Ren y Sun et al.). [142], [148]

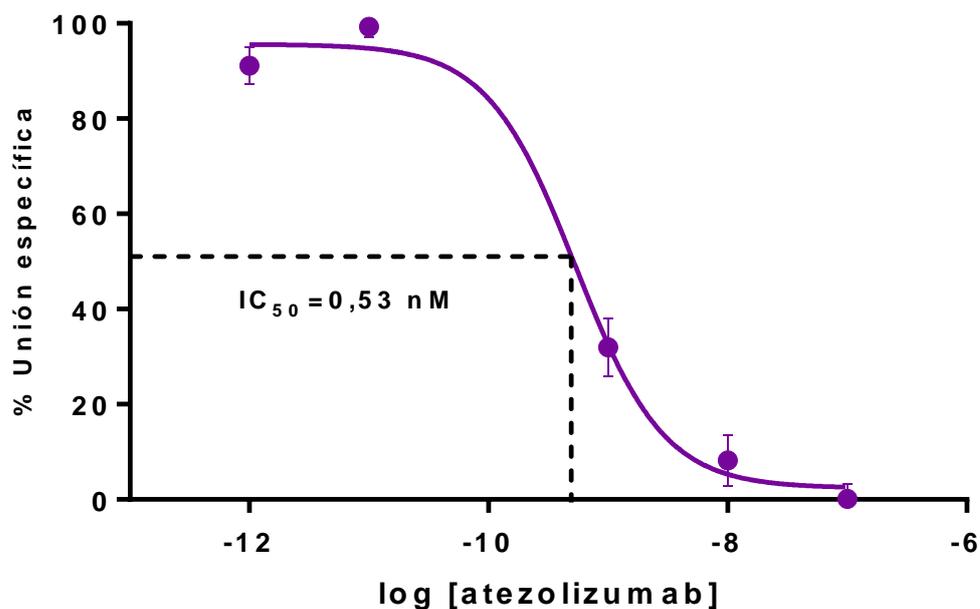


Figura 63. Resultados del experimento de inhibición IC_{50} en la línea celular Tm1MT, para atezolizumab- ^{99m}Tc -TCO-CH₃-Tz-Hy

Estudios *in vivo*

Finalmente se realizó el estudio de la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m}Tc -CH₃-Tz-Hy *in vivo*. i) Se administró atezolizumab-TCO, se le permitió circular por 24 h, luego se administró el radionucleido para posteriormente realizar las biodistribuciones luego de 4 h utilizando dos condiciones diferentes. A demás se realizaron los siguientes controles siguiendo el esquema detallado en la Figura 64: ii) reacción bioortogonal con un bloqueo concomitante, utilizando exceso de anticuerpo sin modificar; iii) ^{99m}Tc -atezolizumab-TCO-CH₃-Tz-Hy previamente preparado (fuera del animal); iv) atezolizumab sin modificar y posterior administración de ^{99m}Tc -CH₃-Tz-Hy. En cuanto a las reacciones bioortogonales se estudiaron dos condiciones, la primera condición, partiendo de los buenos resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* al aumentar la actividad específica (50 MBq/ μ g de tetrazina). Se propuso que disminuir la concentración de Ac-TCO y aumentar la actividad específica del radiomarcado podría influir en obtener mejores resultados en *in vivo* también. De esta manera se logra obtener una relación estequiométrica 1:5 entre anticuerpo y tetrazinas radiomarcadas en donde hipotéticamente todas estas se unen a moléculas de TCO. La segunda condición utiliza mayor cantidad de anticuerpo (0.01 mg) y un exceso de tetrazina con una actividad específica de 10 MBq/ μ g de tetrazina. (Figura 64).

En la primera condición se registró una acumulación en tumor de 5.50 ± 3.47 % Act/g (reacción bioortogonal 1, Figura 65), muy superior en comparación con 1.39 ± 0.42 % obtenidos previamente utilizando la misma tetrazina y el anticuerpo monoclonal CC49 modificado con TCO en tumores de LS147T, [97] con una acumulación en tejidos no específicos más alta, lo que se reflejó en una moderada relación tumor músculo de 3.8 ± 1.8 . [97] Por otro lado, cuando se administró el equivalente de la Reacción bioortogonal 1 pero con el conjugado previamente preparado, fuera del animal, y permitiendo una acumulación de 4 h (Figura 65), se alcanzó un % DI/g de 3.1 ± 2.2 y una relación tumor/sangre de 0.30 ± 0.19 , algo esperable debido al tiempo corto de biodistribución sumado a los elevados niveles de ^{99m}Tc -atezolizumab-TCO-CH₃-Tz-Hy en sangre a las 4h que se comporta con la farmacocinética del anticuerpo.

En el trabajo publicado por Shi et al. 2020, en el cual realizan una estrategia similar, utilizando una tetrazina acoplada a HYNIC con una cadena de 11 subunidades de etiloxi y atezolizumab-TCO logran obtener una relación tumor/músculo de 16.47 ± 0.07 en tumores de H1975 luego de 6 h de circulación de la tetrazina radiomarcada, previamente al anticuerpo-TCO se le permitió circular por 24 h. [145] En otras estrategias que utilizan atezolizumab pero marcándolo directamente con distintos radiometales obtiene relaciones de tumor/sangre 3.9 ± 1.0 luego de 7 días de circulación..[152]

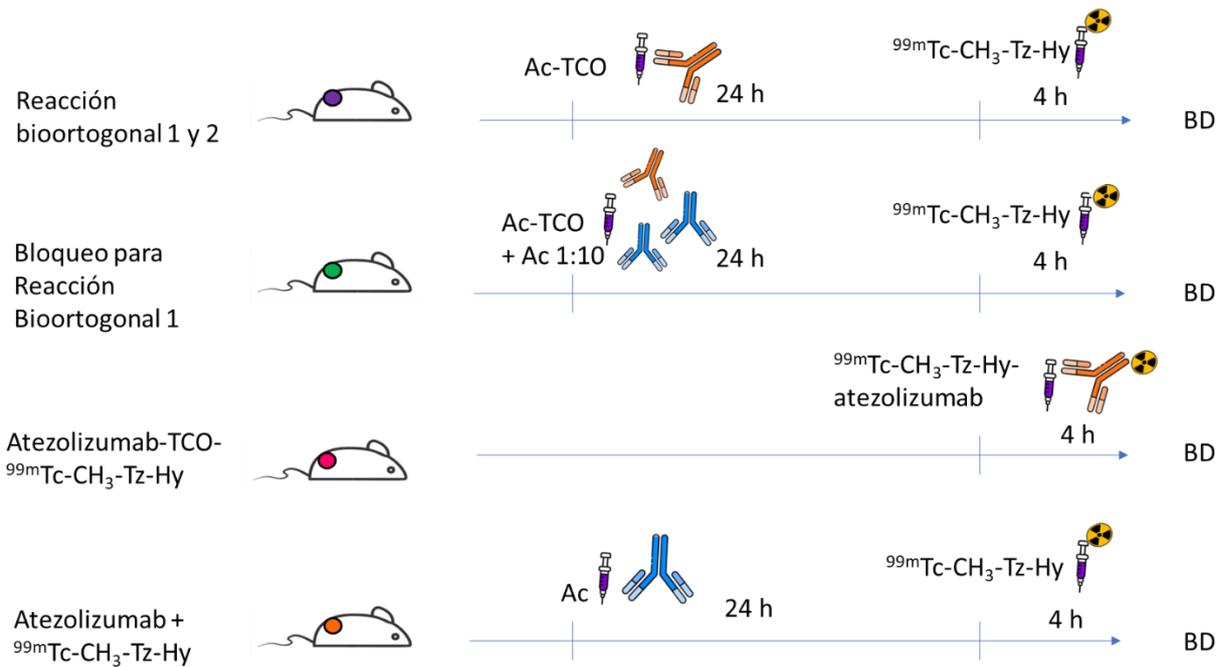


Figura 64. Esquema de la metodología utilizada en los ensayos in vivo para el estudio de la reacción bioortogonal entre GRTz10 y atezolizumab-TCO

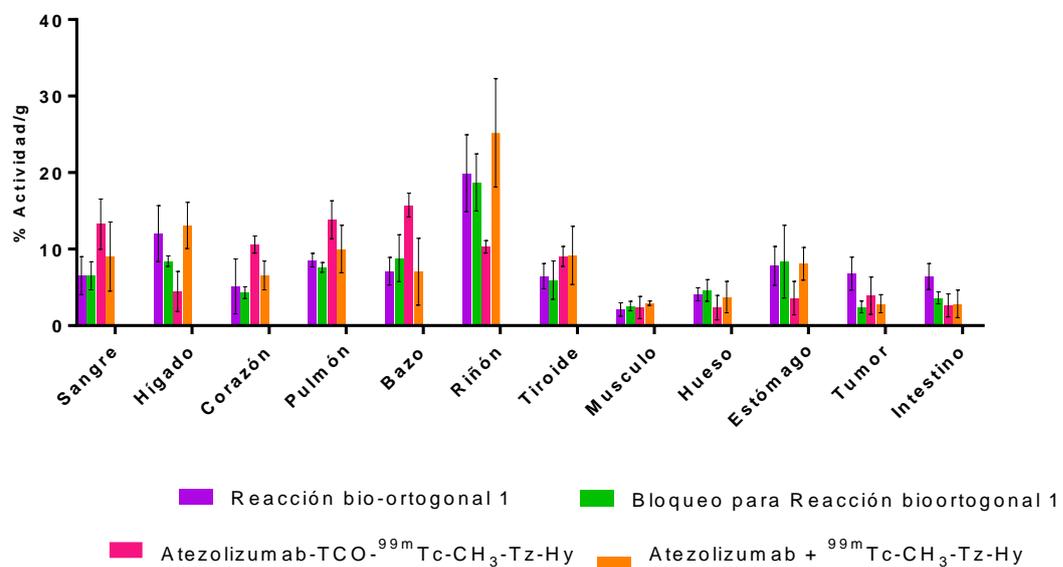


Figura 65. Arriba: Esquema de la metodología de los estudios in vivo para. Abajo: Resultados de la biodistribución de la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy y sus respectivos controles

Por otra parte, se realizó el estudio modificando las concentraciones de atezolizumab-TCO y ^{99m}Tc-CH₃-Tz-Hy (Reacción bioortogonal 2, Figura 66). En este caso se ven perfiles generales

de biodistribución similares, sin embargo se observó un importante incremento en la captación en el tumor, 12.7 ± 1.3 % Act/g. Concomitantemente, en una forma positiva se observa una disminución en las señales provenientes en órganos no-blanco, por ejemplo sangre, probablemente debido a la mayor cantidad de tetrazina circulando que permite superar las interacciones no específicas, mejorando la diferencia en las relaciones entre el tumor y órganos blanco. (Tabla 8)

(Tabla 8)

Tabla 8. Comparación de la relación % ID/g Tumor/músculo para los sistemas utilizados en el estudio de la reacción bioortogonal entre $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hyy}$ atezolizumab-TCO. (*). Diferencia significativa ($p < 0.05$), ANOVA una vía con corrección de Bonferroni)

Sistema	Relación tumor/músculo
Reacción Bioortogonal 1	3.2 ± 1.5
Bloqueo para Reacción Bioortogonal 1	0.9 ± 0.7
Atezolizumab-TCO- $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$	1.6 ± 1.9
Atezolizumab + $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$	0.9 ± 0.3
Reacción Bioortogonal 2	$11.3 \pm 0.8^*$

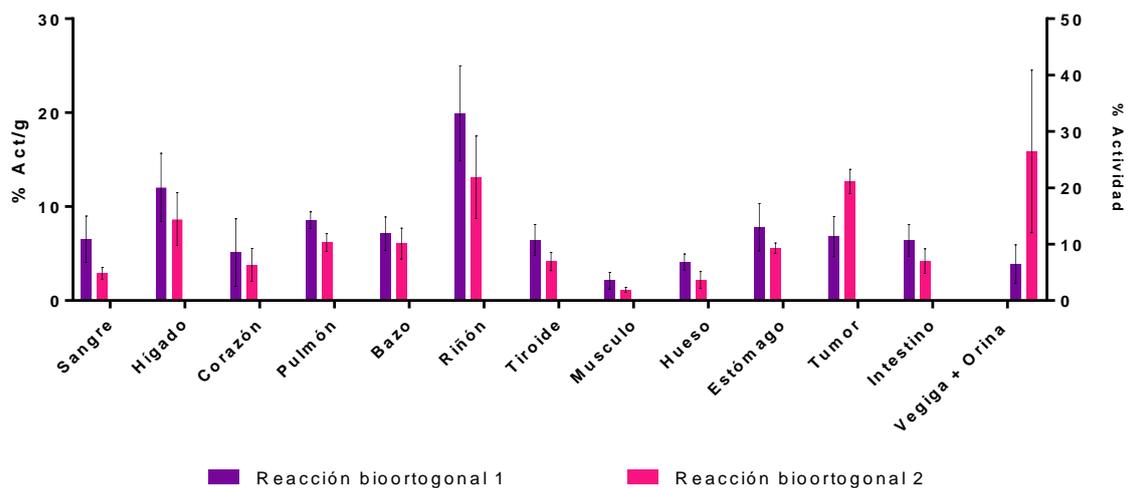


Figura 66. Resultados de la biodistribución de la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$, utilizando dos concentraciones diferentes

Por último, se realizaron los estudios imagenológicos mediante SPECT/CT utilizando la mejor condición obtenida en las biodistribuciones. Como control se administró atezolizumab sin modificar y la tetrazina marcada correspondiente.

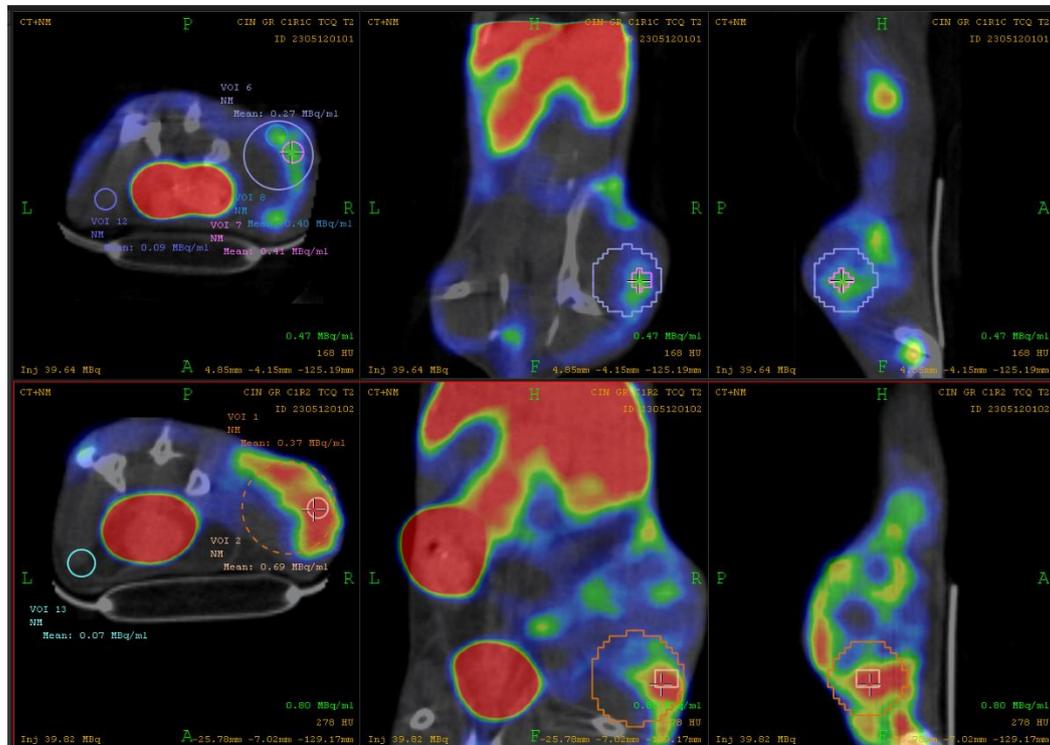


Figura 67. Imágenes obtenidas por SPECT/CT para la reacción bioortogonal entre atezolizumab-TCO y ^{99m}Tc -Tz-Hy. De izquierda a derecha se muestra un corte transversal, corte frontal y corte sagital en la zona donde la captación en el tumor es alta. Arriba: control negativo. Abajo: reacción bioortogonal

En la Figura 67, se muestran los resultados de la reacción bioortogonal *in vivo* se observa una alta captación en el tumor, si bien esta es heterogénea, se detectan focos de hasta 0.69 MBq/mL logrando una relación máxima entre tumor/músculo de 9.9, o 5.3 si se toman en cuenta una región más amplia incluyendo zonas del tumor donde se observa menor captación. La relación tumor/músculo es similar a la observada en los estudios de biodistribución. En comparación, el control negativo presenta regiones dentro del tumor que tienen una acumulación no específica de tetrazina, que logran alcanzar una relación tumor/músculo entre 4.4 y 3 dependiendo el área seleccionada que no se observa en las biodistribuciones realizadas anteriormente, esto puede deberse a regiones altamente vascularizadas o edematizadas. La heterogeneidad de expresión de PD-L1 intratumoral e intertumoral es algo ya descrito y se plantea como una de las posibles limitantes para utilizarlo como un blanco molecular, en especial si la herramienta para diagnosticar es una

biopsia [156], [157]. Es por ello que tener buenos agentes de imagen para monitorear la expresión de PD-L1 puede significar un avance en este tipo de terapias.

Como era de esperarse, y lo que ha dado lugar a esta tesis de maestría, el uso de $^{99m}\text{Tc-CH}_3\text{-Tz-Hy}$ como etiqueta bioortogonal es una herramienta que puede poseer limitaciones, ya que debido a la lipofilia de esta entidad se pueden observar, como hemos descrito previamente, regiones de hipercaptación en el tracto gastrointestinal. En esta prueba de concepto (Figura 67) se observó este proceso, lógicamente tanto en el control negativo como en la reacción bioortogonal.

De todas maneras, el experimento demuestra que la reacción bioortogonal alcanza niveles satisfactorios de detección con una muy buena señal en el tumor y confirmando la utilidad de esta herramienta.

Conclusiones

Se propuso evaluar la estrategia de reacción bioortogonal utilizando el AcMo atezolizumab en un enfoque pre-dirigido para el diagnóstico de melanoma utilizando un derivado de Tz-Hy previamente sintetizado en el grupo. Para este, se modificó las condiciones de la síntesis triplicando el rendimiento, y se optimizaron las condiciones de marcación con ^{99m}Tc con el objetivo de mejorar los estudios *in vitro* e *in vivo*.

Se estudiaron las líneas celulares B16F1, B16F10 y Tm1MT evaluando la expresión de PD-L1 mediante citometría de flujo. Los resultados indicaron que Tm1MT es la línea celular que presenta la mayor expresión del ligando y se pudo constatar el efecto inductor del IFN- γ sobre la expresión de PD-L1. Además, utilizando el sistema atezolizumab-TCO-Cy5-CH3-Tz, se comprobó que el sistema bioortogonal Tz y TCO se puede utilizar como plataforma modular de síntesis para la obtención de distintos conjugados a partir de un mismo AcMo de forma sencilla.

Por otro lado, en los experimentos *in vivo* utilizando como modelo tumoral Tm1MT, se observó un efecto de acumulación específica en el tumor, confirmado tanto con los experimentos de biodistribución como de imágenes SPECT. Modulando la concentración de AcMo-TCO se logró aumentar la relación tumor/músculo y se comprobó, utilizando los controles de bloqueo y marcación directa del anticuerpo, que la reacción bioortogonal es operativa.

Todos estos resultados indican que Tm1MT es una línea celular prometedora para ser utilizada como modelo de melanoma y que el sistema atezolizumab puede ser una plataforma útil para la obtención de diferentes conjugados. Además, se confirma que la reacción bioortogonal es una estrategia efectiva para lograr mayor cantidad de dosis en el tumor.

Bibliografía

- [1] WHO, "Cancer Today," *Cancer Today*, 1984. [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
- [2] C. E. Meacham and S. J. Morrison, "Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity," *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 328–337, 2013.
- [3] R. Fisher, L. Pusztai, and C. Swanton, "Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 3, pp. 479–485, 2013.
- [4] S. H. Hassanpour and M. Dehghani, "Review of cancer from perspective of molecular," *J. Cancer Res. Pract.*, vol. 4, no. 4, pp. 127–129, 2017.
- [5] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2016," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, 2016.
- [6] Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, "Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer," *Regist. Nac. del Cáncer*, pp. 1–61, 2022.
- [7] L. Fass, "Imaging and cancer: A review," *Mol. Oncol.*, vol. 2, no. 2, pp. 115–152, 2008.
- [8] V. McCormack and A. Aggarwal, "Early cancer diagnosis: reaching targets across whole populations amidst setbacks," *Br. J. Cancer*, vol. 124, no. 7, pp. 1181–1182, 2021.
- [9] J. E. Woods, *Recent Results in Cancer Research*, vol. 80, no. 6. 1987.
- [10] Z. Y. Chen, Y. X. Wang, Y. Lin, J. S. Zhang, F. Yang, Q. L. Zhou, and Y. Y. Liao, "Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [11] R. J. Hicks and M. S. Hofman, "Is there still a role for SPECT-CT in oncology in the PET-CT era?," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 9, no. 12, pp. 712–720, 2012.
- [12] A. Alavi and S. Basu, "Planar and SPECT imaging in the era of PET and PET-CT: Can it survive the test of time?," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. 8, pp. 1554–1559, 2008.

- [13] A. Cuocolo and M. Petretta, "PET and SPECT Specialty Grand Challenge. When Knowledge Travels at the Speed of Light, Photons Take to the Field," *Front. Nucl. Med.*, vol. 1, no. April, pp. 1–3, 2021.
- [14] A. Boschi, L. Uccelli, and P. Martini, "A picture of modern Tc-99m radiopharmaceuticals: Production, chemistry, and applications in molecular imaging," *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 12, pp. 1–16, 2019.
- [15] T. B. Saleh, "Radiopharmacy: Basics," *Basic Sci. Nucl. Med.*, pp. 25–39, Jan. 2011.
- [16] J. R. Dilworth and S. J. Parrott, "The biomedical chemistry of technetium and rhenium," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 43–55, 1998.
- [17] U. Abram and R. Alberto, "Technetium and rhenium - Coordination chemistry and nuclear medical applications," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 17, no. 8, pp. 1486–1500, 2006.
- [18] S. Liu and S. Chakraborty, "99mTc-centered one-pot synthesis for preparation of 99mTc radiotracers," *Dalt. Trans.*, vol. 40, no. 23, pp. 6077–6086, 2011.
- [19] B. Costa, D. Ilem-Özdemir, and R. Santos-Oliveira, "Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: old chemistry for new products," *J. Coord. Chem.*, vol. 72, no. 11, pp. 1759–1784, Jun. 2019.
- [20] K. Schwochau, "Technetium Radiopharmaceuticals—Fundamentals, Synthesis, Structure, and Development," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 22, pp. 2258–2267, 1994.
- [21] K. Itoh, "99mTc-MAG3: Review of pharmacokinetics, clinical application to renal diseases and quantification of renal function," *Ann. Nucl. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 179–190, 2001.
- [22] S. Matsuo, K. Nakajima, and S. Kinuya, "Evaluation of Cardiac Mitochondrial Function by a Nuclear Imaging Technique using Technetium-99m-MIBI Uptake Kinetics," *Asia Ocean. J. Nucl. Med. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 39–43, 2013.
- [23] K. Nedd, G. Sfakianakis, W. Ganz, B. Uricchio, D. Vernberg, P. Villanueva, A. M. Jabir, J. Bartlett, and J. Keena, "99mTc-HMPAO SPECT of the brain in mild to moderate

- traumatic brain injury patients: Compared with CT-a prospective study," *Brain Inj.*, vol. 7, no. 6, pp. 469–479, 1993.
- [24] A. D. Nunn, M. D. Loberg, and R. A. Conley, "A structure-distribution-relationship approach leading to the development of Tc-99m mebrofenin: An improved cholescintigraphic agent," *J. Nucl. Med.*, vol. 24, no. 5, pp. 423–430, 1983.
- [25] S. Banerjee, M. R. Ambikalmajan Pillai, and N. Ramamoorthy, "Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 31, no. 4, pp. 260–277, Oct. 2001.
- [26] S. Liu and D. S. Edwards, "99mTc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2235–2268, 1999.
- [27] O. Israel, O. Pellet, L. Biassoni, D. De Palma, E. Estrada-Lobato, G. Gnanasegaran, T. Kuwert, C. la Fougère, G. Mariani, S. Massalha, D. Paez, and F. Giammarile, "Two decades of SPECT/CT – the coming of age of a technology: An updated review of literature evidence," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 46, no. 10, pp. 1990–2012, 2019.
- [28] M. W. Sundberg, C. F. Meares, D. A. Goodwin, and C. I. Diamanti, "Chelating agents for the binding of metal ions to macromolecules," *Nature*, vol. 250, no. 5467, pp. 587–588, 1974.
- [29] Y. Liu, G. Liu, and D. J. Hnatowich, "A brief review of chelators for radiolabeling oligomers," *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 5, pp. 3204–3217, 2010.
- [30] D. J. Hnatowich, W. W. Layne, R. L. Childs, D. Lanteigne, M. A. Davis, T. W. Griffin, and P. W. Doherty, "Radioactive labeling of antibody: A simple and efficient method," *Science*, vol. 220, no. 4597, pp. 613–615, May 1983.
- [31] M. Brom, L. Joosten, W. J. G. Oyen, M. Gotthardt, and O. C. Boerman, "Improved labelling of DTPA- and DOTAconjugated peptides and antibodies with ¹¹¹In in HEPES and MES buffer," *EJNMMI Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–11, 2012.
- [32] G. Liu, S. Zhang, J. He, Z. Zhu, M. Rusckowski, and D. J. Hnatowich, "Improving the labeling of S-acetyl NHS-MAG3-conjugated morpholino oligomers," *Bioconjug. Chem.*,

- vol. 13, no. 4, pp. 893–897, 2002.
- [33] P. Winnard, F. Chang, M. Rusckowski, G. Mardirossian, and D. J. Hnatowich, "Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 425–432, Jul. 1997.
- [34] C. Decristoforo and S. J. Mather, "Preparation, 99mTc-labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N3S modified RC-160 and [Tyr3]octreotide," *Bioconjug. Chem.*, vol. 10, no. 3, pp. 431–438, May 1999.
- [35] M. J. Abrams, M. Juweid, C. I. TenKate, D. A. Schwartz, M. M. Hauser, F. E. Gaul, A. J. Fucello, R. H. Rubin, H. W. Strauss, and A. J. Fischman, "Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats," *J. Nucl. Med.*, vol. 31, no. 12, pp. 2022–2028, Dec. 1990.
- [36] S. Liu, "Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 12, pp. 1347–1370, Sep. 2008.
- [37] D. Zeng, Q. Ouyang, Z. Cai, X.-Q. Xie, and C. J. Anderson, "New cross-bridged cyclam derivative CB-TE1K1P, an improved bifunctional chelator for copper radionuclides," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 1, pp. 43–45, 2014.
- [38] E. Lelong, J. M. Suh, G. Kim, D. Esteban-Gómez, M. Cordier, M. H. Lim, R. Delgado, G. Royal, C. Platas-Iglesias, H. Bernard, and R. Tripier, "Complexation of C-Functionalized Cyclams with Copper(II) and Zinc(II): Similarities and Changes When Compared to Parent Cyclam Analogues," *Inorg. Chem.*, vol. 60, no. 15, pp. 10857–10872, 2021.
- [39] X. Liang and P. J. Sadler, "Cyclam complexes and their applications in medicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 33, no. 4, pp. 246–266, 2004.
- [40] S. Gupta, S. Batra, and M. Jain, "Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals," in *Cycle*, vol. 1141, no. Figure 1, K. K. Jain, Ed. New York, NY: Springer New York, 2014, pp. 147–157.
- [41] K. M. Lo, O. Leger, and B. Hock, *Antibody engineering*, vol. 1827. New York, NY:

Springer New York, 2015.

- [42] J. R. Adair and A. D. G. Lawson, *Therapeutic antibodies*, vol. 2, no. 3. New York, NY: Springer US, 2005.
- [43] G. Köhler and C. Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, Aug. 1975.
- [44] J. K. H. Liu, "The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations," *Ann. Med. Surg.*, vol. 3, no. 4, pp. 113–116, 2014.
- [45] M. Brüggemann, M. J. Osborn, B. Ma, J. Hayre, S. Avis, B. Lundstrom, and R. Buelow, "Human Antibody Production in Transgenic Animals," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 63, no. 2, pp. 101–108, Apr. 2015.
- [46] C. M. Hammers and J. R. Stanley, "Antibody Phage Display: Technique and Applications," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 2, pp. 1–5, Feb. 2014.
- [47] P. A. Todd and R. N. Brogden, "Muromonab CD3: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential," *Drugs*, vol. 37, no. 6, pp. 871–899, 1989.
- [48] H. Kaplon, A. Chenoweth, S. Crescioli, and J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2022," *MAbs*, vol. 14, no. 1, Dec. 2022.
- [49] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, Jun. 2004.
- [50] D. M. Goldenberg, R. M. Sharkey, G. Paganelli, J. Barbet, and J. F. Chatal, "Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy," *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 5, pp. 823–834, Feb. 2006.
- [51] W. C. Eckelman, C. H. Paik, and R. C. Reba, "Radiolabeling of Antibodies," *Cancer Res.*, vol. 40, no. 8, pp. 3036–3042, 1980.
- [52] R. M. Sharkey, J. Burton, and D. M. Goldenberg, "Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: a critical appraisal," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 1, no. 1, pp.

- 47–62, 2005.
- [53] S. I. Reactions, S. Cutaneous, and M. Reactions, “ZEVALIN - ibritumomab tiuxetan Acrotech Biopharma LLC,” no. 6, 2002.
- [54] P. Kręcis, K. Czarnecka, L. Królicki, E. Mikiciuk-Olasik, and P. Szymański, “Radiolabeled Peptides and Antibodies in Medicine,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 25–42, 2021.
- [55] M. Ovacik and K. Lin, “Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development,” *Clin. Transl. Sci.*, vol. 11, no. 6, pp. 540–552, 2018.
- [56] J. T. Ryman and B. Meibohm, “Pharmacokinetics of monoclonal antibodies,” *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, vol. 6, no. 9, pp. 576–588, 2017.
- [57] S. I. Rudnick and G. P. Adams, “Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting,” *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 24, no. 2, pp. 155–161, Apr. 2009.
- [58] G. Z. Ferl, A. M. Wu, and J. J. DiStefano, “A predictive model of therapeutic monoclonal antibody dynamics and regulation by the neonatal Fc receptor (FcRn),” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 33, no. 11, pp. 1640–1652, Nov. 2005.
- [59] V. Kenanova and A. M. Wu, “Tailoring antibodies for radionuclide delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 3, no. 1, pp. 53–70, Jan. 2006.
- [60] T. Suzuki, A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Kobayashi, T. Kanayasu-Toyoda, T. Kawanishi, and T. Yamaguchi, “Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 4, pp. 1968–1976, Feb. 2010.
- [61] C. Rodriguez, S. Delaney, S. M. Sarrett, O. M. Keinänen, and B. M. Zeglis, “Antibody Engineering for Nuclear Imaging and Radioimmunotherapy,” *J. Nucl. Med.*, vol. 63, no. 9, pp. 1316–1322, 2022.
- [62] D. M. Goldenberg, C. H. Chang, E. A. Rossi, W. J. McBride, and R. M. Sharkey, “Pretargeted molecular imaging and radioimmunotherapy,” *Theranostics*, vol. 2, no.

- 5, pp. 523–540, 2012.
- [63] D. J. Hnatowich, F. Virzi, and M. Rusckowski, “Investigations of avidin and biotin for imaging applications,” *J. Nucl. Med.*, vol. 28, no. 8, pp. 1294–1302, Aug. 1987.
- [64] D. T. Reardan, C. F. Meares, D. A. Goodwin, M. McTigue, G. S. David, M. R. Stone, J. P. Leung, R. M. Bartholomew, and J. M. Frincke, “Antibodies against metal chelates,” *Nature*, vol. 316, no. 6025, pp. 265–268, 1985.
- [65] D. A. Goodwin, C. F. Meares, G. F. David, M. McTigue, M. J. McCall, J. M. Frincke, M. R. Stone, R. M. Bartholomew, and J. P. Leung, “Monoclonal antibodies as reversible equilibrium carriers of radiopharmaceuticals,” *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 383–391, Jan. 1986.
- [66] D. M. Goldenberg, J. F. Chatal, J. Barbet, O. Boerman, and R. M. Sharkey, “Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting,” *Update Cancer Ther.*, vol. 2, no. 1, pp. 19–31, Mar. 2007.
- [67] R. M. Sharkey, E. A. Rossi, C. H. Chang, and D. M. Goldenberg, “Improved cancer therapy and molecular imaging with multivalent, multispecific antibodies,” *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2010.
- [68] M. Altai, R. Membreno, B. Cook, V. Tolmachev, and B. M. Zeglis, “Pretargeted imaging and therapy,” *J. Nucl. Med.*, vol. 58, no. 10, pp. 1553–1559, 2017.
- [69] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, “Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021, 2001.
- [70] E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, “Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 38, pp. 6974–6998, 2009.
- [71] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, and C. R. Bertozzi, “A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 25, pp. 14846–14851, Dec. 2003.
- [72] S. Sheikhabaei, S. J. Ahn, B. Young, M. Taghipour, C. Marcus, and R. M. Subramaniam, “Comparative effectiveness: 18 F-FDG-PET/CT versus CT for post-

- treatment follow-up of patients with lung cancer," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 38, no. 8, pp. 720–725, 2017.
- [73] E. Saxon and C. R. Bertozzi, "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction," *Science*, vol. 287, no. 5460, pp. 2007–2010, Mar. 2000.
- [74] E. Saxon, J. I. Armstrong, and C. R. Bertozzi, "A 'Traceless' Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds," *Org. Lett.*, vol. 2, no. 14, pp. 2141–2143, Jul. 2000.
- [75] Z.-P. A. Wang, C.-L. Tian, and J.-S. Zheng, "The recent developments and applications of the traceless-Staudinger reaction in chemical biology study," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 130, pp. 107192–107199, 2015.
- [76] F. Thalhammer, U. Wallfahrer, and J. Sauer, "Reaktivität einfacher offenkettiger und cyclischer dienophile bei Diels-Alder-reaktionen mit inversem elektronenbedarf," *Tetrahedron Lett.*, vol. 31, no. 47, pp. 6851–6854, 1990.
- [77] R. Selvaraj and J. M. Fox, "Trans-Cyclooctene-a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 753–760, 2013.
- [78] M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, "Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 41, pp. 13518–13519, 2008.
- [79] N. K. Devaraj, R. Weissleder, and S. A. Hilderbrand, "Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 12, pp. 2297–2299, 2008.
- [80] E. J. L. Stéen *et al.*, "Lipophilicity and Click Reactivity Determine the Performance of Bioorthogonal Tetrazine Tools in Pretargeted in Vivo Chemistry," *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 824–833, 2021.
- [81] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, and J. W. Chin, "Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction," *Nat. Chem.*, vol. 4, no. 4, pp. 298–304, Feb. 2012.
- [82] X. Fan, Y. Ge, F. Lin, Y. Yang, G. Zhang, W. S. C. Ngai, Z. Lin, S. Zheng, J. Wang, J. Zhao,

- J. Li, and P. R. Chen, "Optimized Tetrazine Derivatives for Rapid Bioorthogonal Decaging in Living Cells," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 55, no. 45, pp. 14046–14050, 2016.
- [83] P. Werther, K. Yserentant, F. Braun, N. Kaltwasser, C. Popp, M. Baalman, D. P. Herten, and R. Wombacher, "Live-Cell Localization Microscopy with a Fluorogenic and Self-Blinking Tetrazine Probe," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 59, no. 2, pp. 804–810, Jan. 2020.
- [84] M. R. Karver, R. Weissleder, and S. A. Hilderbrand, "Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation," *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 11, pp. 2263–2270, Nov. 2011.
- [85] C. Denk, D. Svatunek, T. Filip, T. Wanek, D. Lumpi, J. Fröhlich, C. Kuntner, and H. Mikula, "Development of a ¹⁸F-labeled tetrazine with favorable pharmacokinetics for bioorthogonal PET imaging," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 36, pp. 9655–9659, Sep. 2014.
- [86] C. Denk, D. Svatunek, S. Mairinger, J. Stanek, T. Filip, D. Matscheko, C. Kuntner, T. Wanek, and H. Mikula, "Design, Synthesis, and Evaluation of a Low-Molecular-Weight ¹¹C-Labeled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging Applying Bioorthogonal in Vivo Click Chemistry," *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 7, pp. 1707–1712, 2016.
- [87] S. Mayer and K. Lang, "Tetrazines in Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Cycloadditions and Their Use in Biology," *Synth.*, vol. 49, no. 4, pp. 830–848, 2017.
- [88] O. Keinänen, X. G. Li, N. K. Chenna, D. Lumen, J. Ott, C. F. M. Molthoff, M. Sarparanta, K. Helariutta, T. Vuorinen, A. D. Windhorst, and A. J. Airaksinen, "A New Highly Reactive and Low Lipophilicity Fluorine-18 Labeled Tetrazine Derivative for Pretargeted PET Imaging," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 1, pp. 62–66, 2016.
- [89] O. Keinänen, E. M. Mäkilä, R. Lindgren, H. Virtanen, H. Liljenbäck, V. Oikonen, M. Sarparanta, C. Molthoff, A. D. Windhorst, A. Roivainen, J. J. Salonen, and A. J. Airaksinen, "Pretargeted PET Imaging of trans-Cyclooctene-Modified Porous Silicon Nanoparticles," *ACS Omega*, vol. 2, no. 1, pp. 62–69, 2017.
- [90] J. P. Meyer, P. Kozlowski, J. Jackson, K. M. Cunanan, P. Adumeau, T. R. Dilling, B. M.

- Zeglis, and J. S. Lewis, "Exploring Structural Parameters for Pretargeting Radioligand Optimization," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 19, pp. 8201–8217, 2017.
- [91] J. L. Seitchik, J. C. Peeler, M. T. Taylor, M. L. Blackman, T. W. Rhoads, R. B. Cooley, C. Refakis, J. M. Fox, and R. A. Mehl, "Genetically encoded tetrazine amino acid directs rapid site-specific in vivo bioorthogonal ligation with trans-cyclooctenes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 6, pp. 2898–2901, Feb. 2012.
- [92] R. Rossin, S. M. Van Den Bosch, W. Ten Hoeve, M. Carvelli, R. M. Versteegen, J. Lub, and M. S. Robillard, "Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for diels-alder chemistry in living systems," *Bioconjug. Chem.*, vol. 24, no. 7, pp. 1210–1217, 2013.
- [93] R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. Van Den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, and M. S. Robillard, "In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 19, pp. 3375–3378, 2010.
- [94] N. K. Devaraj, G. M. Thurber, E. J. Keliher, B. Marinelli, and R. Weissleder, "Reactive polymer enables efficient in vivo bioorthogonal chemistry," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 13, pp. 4762–4767, 2012.
- [95] B. M. Zeglis, K. K. Sevak, T. Reiner, P. Mohindra, S. D. Carlin, P. Zanzonico, R. Weissleder, and J. S. Lewis, "A pretargeted PET imaging strategy based on bioorthogonal diels-alder click chemistry," *J. Nucl. Med.*, vol. 54, no. 8, pp. 1389–1396, 2013.
- [96] J. L. Houghton, R. Membreno, D. Abdel-Atti, K. M. Cunanan, S. Carlin, W. W. Scholz, P. B. Zanzonico, J. S. Lewis, and B. M. Zeglis, "Establishment of the in vivo efficacy of pretargeted radioimmunotherapy utilizing inverse electron demand diels-alder click chemistry," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 124–133, 2017.
- [97] M. F. García, X. Zhang, M. Shah, J. Newton-Northup, P. Cabral, H. Cerecetto, and T. Quinn, "^{99m}Tc-bioorthogonal click chemistry reagent for in vivo pretargeted imaging," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 24, no. 6, pp. 1209–1215, 2016.
- [98] A. Vito, H. Alarabi, S. Czorny, O. Beiraghi, J. Kent, N. Janzen, A. R. Genady, S. A. Alkarmi, S. Rathmann, Z. Naperstkow, M. Blacker, L. Llano, P. J. Berti, and J. F. Valliant,

- "A ^{99m}Tc -labelled tetrazine for bioorthogonal chemistry. Synthesis and biodistribution studies with small molecule trans-cyclooctene derivatives," *PLoS One*, vol. 11, no. 12, pp. 1–15, 2016.
- [99] A. Yazdani, H. Bilton, A. Vito, A. R. Genady, S. M. Rathmann, Z. Ahmad, N. Janzen, S. Czorny, B. M. Zeglis, L. C. Francesconi, and J. F. Valliant, "A Bone-Seeking trans-Cyclooctene for Pretargeting and Bioorthogonal Chemistry: A Proof of Concept Study Using ^{99m}Tc - and ^{177}Lu -Labeled Tetrazines," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 20, pp. 9381–9389, 2016.
- [100] M. F. García, F. Gallazzi, M. D. S. Junqueira, M. Fernández, X. Camacho, J. D. S. Mororó, D. Faria, C. D. G. Carneiro, M. Couto, F. Carrión, O. Pritsch, R. Chammas, T. Quinn, P. Cabral, and H. Cerecetto, "Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5]tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with ^{99m}Tc ," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 16, no. 29, pp. 5275–5285, 2018.
- [101] A. Yazdani, "Synthesis and Evaluation of [2+1] Re(I) and ^{99m}Tc Complexes: New Synthons for the Preparation of Isostructural Optical and Nuclear Probes," no. 1, 2016.
- [102] A. Yazdani, N. Janzen, S. Czorny, R. G. Ungard, T. Miladinovic, G. Singh, and J. F. Valliant, "Preparation of tetrazine-containing [2 + 1] complexes of ^{99m}Tc and: In vivo targeting using bioorthogonal inverse electron demand Diels-Alder chemistry," *Dalt. Trans.*, vol. 46, no. 42, pp. 14691–14699, 2017.
- [103] K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. Mejia Oneto, and M. Royzen, "Click activated prodrugs against cancer increase the therapeutic potential of chemotherapy through local capture and activation," *Chem. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 1259–1271, 2021.
- [104] M. Fernanda García, M. Souza Junqueira, J. Silva Mororó, X. Camacho, D. Paula Faria, C. Godoi Carneiro, F. Gallazzi, R. Chammas, T. Quinn, P. Cabral, and H. Cerecetto, "Radio- and Fluorescent-Labeling of Rituximab Based on the Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction," *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 8, pp. 1894–1899, Feb. 2021.
- [105] M. Couto, M. F. García, C. Alamón, M. Cabrera, P. Cabral, A. Merlino, F. Teixidor, H.

- Cerecetto, and C. Viñas, "Discovery of Potent EGFR Inhibitors through the Incorporation of a 3D-Aromatic-Boron-Rich-Cluster into the 4-Anilinoquinazoline Scaffold: Potential Drugs for Glioma Treatment," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 24, no. 13, pp. 3122–3126, 2018.
- [106] M. F. Garcia, V. Calzada, X. Camacho, E. Goicochea, J. Gambini, T. Quinn, W. Porcal, and P. Cabral, "Microwave-assisted Synthesis of HYNIC Protected Analogue for ^{99m}Tc Labeled Antibody," *Curr. Radiopharm.*, vol. 7, no. 2, pp. 84–90, Dec. 2014.
- [107] V. Teixeira Ferreira, "Desarrollo y evaluación de nuevos ^{99m}Tc-análogos de la hormona melanocito estimulante (alfa-msh) como agentes de imagenología molecular en melanoma."
- [108] M. F. Garcia, "Estudio de reacciones bio- ortogonales con aplicación en el diagnóstico de cáncer," 2018.
- [109] N. Tsao, M. Chanda, D. F. Yu, H. Kurihara, Y. H. Zhang, R. Mendez, and J. Y. David, "^{99m}Tc-N4amG: Synthesis biodistribution and imaging in breast tumor-bearing rodents," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 72, pp. 105–113, 2013.
- [110] D. Svatunek, M. Wilkovitsch, L. Hartmann, K. N. Houk, and H. Mikula, "Uncovering the Key Role of Distortion in Bioorthogonal Tetrazine Tools That Defy the Reactivity/Stability Trade-Off," *J. Am. Chem. Soc.*, 2022.
- [111] R. Vaidyanathan, V. G. Kalthod, D. P. Ngo, J. M. Manley, and S. P. Lapekas, "Amidations Using N,N'-Carbonyldiimidazole: Remarkable Rate Enhancement by Carbon Dioxide," *J. Org. Chem.*, vol. 69, no. 7, pp. 2565–2568, Apr. 2004.
- [112] A. K. Ghosh and D. Shahabi, "Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBt as the coupling reagents," *Tetrahedron Lett.*, vol. 63, p. 152719, 2021.
- [113] C. Wang, Q. Yan, H. B. Liu, X. H. Zhou, and S. J. Xiao, "Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions," *Langmuir*, vol. 27, no. 19, pp. 12058–12068, Oct. 2011.

- [114] N. Tsao, "Design , Synthesis and Development of Transporter Targeting Agents for Image-guided Therapy and Drug Delivery," University of Texas, 2013.
- [115] L. C. Chan and B. G. Cox, "Kinetics of amide formation through carbodiimide/N-hydroxybenzotriazole (HOBt) couplings," *J. Org. Chem.*, vol. 72, no. 23, pp. 8863–8869, 2007.
- [116] W. König and R. Geiger, "Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen," *Chem. Ber.*, vol. 103, no. 3, pp. 788–798, 1970.
- [117] E. Valeur and M. Bradley, "Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 2, pp. 606–631, 2009.
- [118] M. P. Wickramathilaka and B. Y. Tao, "Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates," *J. Biol. Eng.*, vol. 13, no. 1, pp. 8–17, 2019.
- [119] X. Xin, H. Sha, J. Shen, B. Zhang, B. Zhu, and B. Liu, "Coupling Gd-DTPA with a bispecific, recombinant protein anti-EGFR-iRGD complex improves tumor targeting in MRI," *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 6, pp. 3227–3235, 2016.
- [120] N. Kasraie, H. W. Oviatt, and G. D. Clarke, "On the Use of Molecular Weight Cutoff Cassettes to Measure Dynamic Relaxivity of Novel Gadolinium Contrast Agents: Example Using Hyaluronic Acid Polymer Complexes in Phosphate-Buffered Saline," *Radiol. Res. Pract.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [121] J. A. Park, J. Y. Kim, H. K. Kim, W. Lee, S. M. Lim, Y. Chang, T. J. Kim, and K. M. Kim, "Heteronuclear Gd- 99mTc complex of DTPA-bis(histidylamide) conjugate as a bimodal MR/SPECT imaging probe," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 4, pp. 299–302, 2012.
- [122] M. S. Ardestani, A. J. Arabzadeh, Z. Heidari, A. Hosseinzadeh, H. Ebrahimi, E. Hashemi, M. Mosayebnia, M. Shafiee-Alavidjeh, A. Alavi, M. H. Babaei, A. Rahmim, S. E. S. Ebrahimi, and M. Amanlou, "Novel and facile methods for the synthesis of DTPA-mono-amide: A new completely revised strategy in radiopharmaceutical chemistry," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 283, no. 2, pp. 447–455, 2010.

- [123] L. Gooßen, D. Ohlmann, and P. Lange, "The Thermal Amidation of Carboxylic Acids Revisited," *Synthesis (Stuttg.)*, vol. 2009, no. 01, pp. 160–164, Jan. 2009.
- [124] S. A. Zuckman, G. M. Freeman, D. E. Troutner, W. A. Volkert, R. A. Holmes, D. G. Van Derveer, and E. K. Barefield, "Preparation and X-ray Structure of trans-Dioxo(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)technetium(V) Perchlorate Hydrate," *Inorg. Chem.*, vol. 20, no. 8, pp. 2386–2389, 1981.
- [125] M. Nicolini, G. Bandoli, and U. Mazzi, Eds., *Technetium and rhenium in nuclear medicine*, vol. 10, no. 9. Cortina International, 2003.
- [126] A. Boschi, L. Uccelli, C. Bolzati, M. Marastoni, R. Tomatis, S. Spisani, S. Traniello, and A. Piffanelli, "A CD4/T4 receptor peptide ligand labeled with technetium-99m: Synthesis and biological activity," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 27, no. 8, pp. 791–795, 2000.
- [127] S. Murugesan, S. J. Shetty, T. S. Srivastava, O. P. D. Noronha, and A. M. Samuel, "A technetium-99m-labelled cyclam acid porphyrin (CAP) for tumour imaging," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 55, no. 5, pp. 641–646, 2001.
- [128] J. Franz, W. A. Volkert, E. K. Barefield, and R. A. Holmes, "The production of 99mTc-labeled conjugated antibodies using a cyclam-based bifunctional chelating agent," *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation.*, vol. 14, no. 6, pp. 569–572, 1987.
- [129] E. L. Engelhardt, R. F. Schneider, S. H. Seeholzer, C. C. Stobbe, and J. D. Chapman, "The synthesis and radiolabeling of 2-nitroimidazole derivatives of cyclam and their preclinical evaluation as positive markers of tumor hypoxia," *J. Nucl. Med.*, vol. 43, no. 6, pp. 837–850, 2002.
- [130] M. S. Ali, F. L. Kong, A. Rollo, R. Mendez, S. Kohanim, D. L. Smith, and D. J. Yang, "Development of 99mTc-N4-NIM for molecular imaging of tumor hypoxia," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, 2012.
- [131] S. Murugesan, S. J. Shetty, O. P. D. Noronha, A. M. Samuel, T. S. Srivastava, C. K. K. Nair, and L. Kothari, "Technetium-99m-cyclam AK 2123: A novel marker for tumor hypoxia," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 54, no. 1, pp. 81–88, 2001.
- [132] P. P. Hazari, G. Shukla, V. Goel, K. Chuttani, N. Kumar, R. Sharma, and A. K. Mishra,

- "Synthesis of Specific SPECT-Radiopharmaceutical for Tumor Imaging Based on Methionine:," *Synthesis (Stuttg)*., no. 26, pp. 229–239, 2010.
- [133] X. Xia, H. Feng, C. Li, C. Qin, Y. Song, Y. Zhang, and X. Lan, "99mTc-labeled estradiol as an estrogen receptor probe: Preparation and preclinical evaluation," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 43, no. 1, pp. 89–96, 2016.
- [134] D. Zwanziger and A. Beck-Sickinger, "Radiometal Targeted Tumor Diagnosis and Therapy with Peptide Hormones," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 24, pp. 2385–2400, 2008.
- [135] J. Wang, Y. Zhang, W. Yang, J. Xue, and Y. Liu, "99mTc-labeled colchicine for tumor imaging using DTPA as bifunctional chelating agent," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 307, no. 2, pp. 1087–1092, 2016.
- [136] "Monographs/ Technetium Tc-99m," in *Pharmacopoeia-National Formulary [USP 35 NF 30]*., 2012, p. 4470.
- [137] M. el Filali, L. V. Ly, G. P. M. Luyten, M. Versluis, H. E. Grossniklaus, P. A. van der Velden, and M. J. Jager, "Bevacizumab and intraocular tumors: An intriguing paradox," *Mol. Vis.*, vol. 18, no. October, pp. 2454–2467, 2012.
- [138] S. Vallabhajosula, R. P. Killeen, and J. R. Osborne, "Altered Biodistribution of Radiopharmaceuticals: Role of Radiochemical/Pharmaceutical Purity, Physiological, and Pharmacologic Factors," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 40, no. 4, pp. 220–241, 2010.
- [139] J. Chen, Z. Cheng, N. K. Owen, T. J. Hoffman, Y. Miao, S. S. Jurisson, and T. P. Quinn, "Evaluation of an (111)In-DOTA-rhenium cyclized alpha-MSH analog: a novel cyclic-peptide analog with improved tumor-targeting properties.," *J. Nucl. Med.*, vol. 42, no. 12, pp. 1847–55, Dec. 2001.
- [140] Y. Miao, F. Gallazzi, H. Guo, and T. P. Quinn, "111In-labeled lactam bridge-cyclized α -melanocyte stimulating hormone peptide analogues for melanoma imaging," *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 539–547, 2008.
- [141] G. J. Freeman *et al.*, "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation," *J. Exp.*

- Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034, 2000.
- [142] M. Song, D. Chen, B. Lu, C. Wang, J. Zhang, L. Huang, X. Wang, C. L. Timmons, J. Hu, B. Liu, X. Wu, L. Wang, J. Wang, and H. Liu, “PTEN Loss Increases PD-L1 Protein Expression and Affects the Correlation between PD-L1 Expression and Clinical Parameters in Colorectal Cancer,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [143] K. Mimura, J. L. Teh, H. Okayama, K. Shiraishi, L. F. Kua, V. Koh, D. T. Smoot, H. Ashktorab, T. Oike, Y. Suzuki, Z. Fazreen, B. R. Asuncion, A. Shabbir, W. P. Yong, J. So, R. Soong, and K. Kono, “PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer,” *Cancer Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 43–53, 2018.
- [144] A. S. Cristino, J. Nourse, R. A. West, M. B. Sabdia, S. C. Law, J. Gunawardana, F. Vari, S. Mujaj, G. Thillaiampalam, C. Snell, M. Gough, C. Keane, and M. K. Gandhi, “EBV microRNA-BHRF1-2-5p targets the 39UTR of immune checkpoint ligands PD-L1 and PD-L2,” *Blood*, vol. 134, no. 25, pp. 2261–2270, Dec. 2019.
- [145] D. Lu, Z. Ni, X. Liu, S. Feng, X. Dong, X. Shi, J. Zhai, S. Mai, J. Jiang, Z. Wang, H. Wu, and K. Cai, “Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2019, 2019.
- [146] M. Potez, V. Trappetti, A. Bouchet, C. Fernandez-Palomo, E. Güç, W. W. Kilarski, R. Hlushchuk, J. Laissue, and V. Djonov, “Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice,” *PLoS One*, vol. 13, no. 11, p. e0206693, Nov. 2018.
- [147] H. Noh, J. Hu, X. Wang, X. Xia, A. Satelli, and S. Li, “Immune checkpoint regulator PD-L1 expression on tumor cells by contacting CD11b positive bone marrow derived stromal cells,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2015.
- [148] Z. Hu, P. Yu, G. Du, W. Wang, H. Zhu, N. Li, H. Zhao, Z. Dong, L. Ye, and J. Tian, “PCC0208025 (BMS202), a small molecule inhibitor of PD-L1, produces an antitumor effect in B16-F10 melanoma-bearing mice,” *PLoS One*, vol. 15, no. 3, pp. 1–15, 2020.
- [149] S. M. Oba-Shinjo, M. Correa, T. I. Ricca, F. Molognoni, M. A. Pinhal, I. A. Neves, S. K. Marie, L. O. Sampaio, H. B. Nader, R. Chammas, and M. G. Jasiulionis, “Melanocyte

- transformation associated with substrate adhesion impediment,” *Neoplasia*, vol. 8, no. 3, pp. 231–241, Mar. 2006.
- [150] P. S. Bacchi, A. C. Bloise, S. O. Bustos, L. Zimmermann, R. Chammas, and S. R. Rabbani, “Metabolism under hypoxia in Tm1 murine melanoma cells is affected by the presence of galectin-3, a metabolomics approach,” *Springerplus*, vol. 3, no. 1, p. 470, Dec. 2014.
- [151] T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko, and P. A. Bunn, “Determination of the immunoreactive function of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess,” *J. Immunol. Methods*, vol. 72, no. 1, pp. 77–89, 1984.
- [152] S. Heskamp, W. Hobo, J. D. M. Molkenboer-Kuenen, D. Olive, W. J. G. Oyen, H. Dolstra, and O. C. Boerman, “Noninvasive imaging of tumor PD-L1 expression using radiolabeled Anti-PD-L1 antibodies,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 14, pp. 2928–2936, 2015.
- [153] L. Zhang, S. Zhao, H. Jiang, R. Zhang, M. Zhang, W. Pan, Z. Sun, D. Wang, and J. Li, “Radioimmunotherapy study of ¹³¹I-labeled Atezolizumab in preclinical models of colorectal cancer,” *EJNMMI Res.*, vol. 12, no. 1, 2022.
- [154] W. G. Lesniak, S. Chatterjee, M. Gabrielson, A. Lisok, B. Wharram, M. G. Pomper, and S. Nimmagadda, “PD-L1 Detection in Tumors Using [⁶⁴Cu]Atezolizumab with PET,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, no. 9, pp. 2103–2110, 2016.
- [155] M. Li, R. Zhao, J. Chen, W. Tian, C. Xia, X. Liu, Y. Li, S. Li, H. Sun, T. Shen, W. Ren, and L. Sun, “Next generation of anti-PD-L1 Atezolizumab with enhanced anti-tumor efficacy in vivo,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2021.
- [156] X. Zhao, Y. Bao, B. Meng, Z. Xu, S. Li, X. Wang, R. Hou, W. Ma, D. Liu, J. Zheng, and M. Shi, “From rough to precise: PD-L1 evaluation for predicting the efficacy of PD-1/PD-L1 blockades,” *Front. Immunol.*, vol. 13, no. August, pp. 1–17, 2022.
- [157] R. Huss, C. Schmid, M. Manesse, J. Thagaard, and B. Maerkl, “Immunological tumor heterogeneity and diagnostic profiling for advanced and immune therapies,” *Adv. Cell Gene Ther.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–9, 2021.

