



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Físico-química

**INFLUENCIA DE LOS AGENTES QUELANTES BIFUNCIONALES
Y DE LOS MÉTODOS DE MARCACIÓN EN EL
COMPORTAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE BIOMOLÉCULAS
MARCADAS CON RADIONUCLEÍDOS EMISORES GAMMA Y
BETA NEGATIVOS DE USO POTENCIAL EN DIAGNÓSTICO Y
TERAPIA EN MEDICINA NUCLEAR.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Químicas.

José Luis Crudo

Director: Lic. Silvia Gómez de Castiglia
Director Asistente: Dr. Marco Chinol
Consejero de Estudios: Dr. Luis Baraldo

Lugares de trabajo:
División Radiofarmacia, Centro Atómico Ezeiza, Comisión Nacional de Energía
Atómica, Argentina.
División Medicina Nuclear, Instituto Europeo de Oncología, Milán, Italia.

Buenos Aires, Diciembre de 2007

Influencia de los agentes quelantes bifuncionales y de los métodos de marcación en el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de biomoléculas marcadas con radionucleídos emisores gamma y beta negativos de uso potencial en diagnóstico y terapia en medicina nuclear.

Resumen:

Se radiomarcaron IgG con Tecnecio-99m, UBI 29-41 con Tecnecio-99m, Anticuerpos monoclonales con Renio-188 y biotina con Ytrio-90 y Renio-188 (todos estos radiofármacos de uso potencial en diagnóstico y terapia en Medicina Nuclear) por diferentes métodos y con diferentes quelantes. En algunos casos se optimizó el método de marcación. En todos los casos se evaluó la pureza radioquímica por HPLC o ITLC, la actividad específica, la estabilidad *in vitro*, y la capacidad de reconocimiento biológico *in vitro* contra el blanco correspondiente (microorganismos, antígeno CD20 y avidina). En los casos en que fue posible se evaluó la estabilidad *in vivo*, el reconocimiento biológico *in vivo*, la biodistribución en ratones infectados o tumorados y se obtuvieron imágenes en cámara gamma. La comparación y el análisis de los resultados obtenidos permite concluir que dependiendo del tipo de biomolécula y del radionucleído a utilizar, el agente quelante y el método de marcación juegan un rol importantísimo a tal punto que modifican sustancialmente la pureza radioquímica, la actividad específica, la estabilidad, la acumulación en el blanco y las vías de eliminación del radiofármaco. Y que todos estos parámetros deben ser tenidos en cuenta para en diseño de nuevos radiofármacos para diagnóstico y terapia en Medicina Nuclear.

Palabras claves:

^{99m}Tc -IgG

^{99m}Tc -UBI 29-41

^{99m}Tc -MAG₃-UBI 29-41

^{188}Re -MAG₃-IgG

^{188}Re -Rituximab

^{188}Re -MAG₃-Norbiotinamina

^{90}Y -DOTA-Biotina

Biomoléculas radiomarcadas con emisores gamma

Biomoléculas radiomarcadas con emisores beta negativos.

Bifunctional chelating agents and labelling methods influence on the *in vitro* and *in vivo* behaviour of gamma and beta negative radiolabelled biomolecules with potential use in Nuclear Medicine imaging and therapy

Abstract:

IgG, UBI 29-41, monoclonal antibodies and biotin derivatives were radiolabelled with ^{99m}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{188}Re and ^{90}Y (^{188}Re) respectively by different methods and with different chelators. All these radiopharmaceuticals have potential use for imaging and therapy in Nuclear Medicine. In some cases the labelling method was optimized. The radiochemical purity, the specific activity, the *in vitro* stability and the biological recognition test against the target (bacteria, CD20 and avidin) were done in all cases. The *in vivo* stability, the biological recognition *in vivo*, the biodistribution in infected or tumored mice and the imaging studies were done in some cases. The comparison and analysis of the obtained results show that the BFCA and the labelling method play an important role in the radiolabelled biomolecules with a radionuclide, affecting and modifying the radiochemical purity, the specific activity, the stability, the accumulation on the target and the elimination pathways of the radiopharmaceutical. The most important conclusion is that all these parameters have to be taken into account for the design of new radiopharmaceuticals for imaging and therapy in Nuclear Medicine.

Key words:

^{99m}Tc -IgG

^{99m}Tc -UBI 29-41

^{99m}Tc -MAG₃-UBI 29-41

^{188}Re -MAG₃-IgG

^{188}Re -Rituximab

^{188}Re -MAG₃-Norbiotinamine

^{90}Y -DOTA-Biotin

Radiolabelled biomolecules with gamma emitters

Radiolabelled biomolecules with beta negative emitters

Agradecimientos:

A la Lic. Silvia Gómez de Castiglia, mi ex-jefa técnica, por la inmensa generosidad de transmitirme durante 15 años todo sus conocimientos, experiencia y su pasión por la investigación.

A los Dres. Giovanni Paganelli y Marco Chinol del IEO (Milán, Italia) por abrirme las puertas de la Div. Medicina Nuclear durante cuatro años consecutivos (1998-2001) y hacerme sentir como en mi propia casa.

A la Dra. Guissepina Sabatino (Grupo de Síntesis de Péptidos, Univ. de Florencia, Italia) por transmitirme su experiencia en la síntesis de derivados de DOTA-biotina.

A mis colaboradores de la Div. Radiofarmacia:

Magíster Noemí Nevaes por su permanente buena disposición

Sr. Alfredo Zapata por la realización de las biodistribuciones que figuran en 3.2, 3.4.3.1, 3.4.3.2 y 3.5.6.1

A los Dres. Ernest Pauwels y Mick Welling por su colaboración y en especial a este último por el excelente trato en la visita científica al LUMC.

Sr. Juan Pérez por la preparación del kit liofilizado de AcMo anti CD20 y la realización de los controles de estabilidad del mismo.

Al Lic. Jorge Arashiro (Div. Medicina Nuclear, CNEA-Roffo) por su excelente disposición para la adquisición de imágenes en cámara gamma.

A la Dra. Mabel Viaggi (†) (antigua colega de la Div. Radiofarmacia, CNEA) por los ensayos de biodistribución que figuran en 3.3.5.

Al Lic. Martín Edreira (ex-becario de la Div. Radiofarmacia, CNEA) por los ensayos de biodistribución que figuran en 3.5.6.2 y 3.5.6.3.

A la Dra. María del Rosario Pérez y a la Lic. Diana Dubner (Lab. Radiofisiopatología de la Gerencia de Apoyo científico, ARN) por permitirme la utilización del autorradiógrafo digital a su cargo.

A M. Bronzi y E. Sorge (Sector Bacteriología, Instituto Roffo) por la provisión de *S.a.*

A la Bioq. Patricia Silva Paulo (Grupo Pecuário, CNEA) por el conteo en placa de las UFC / mL de *S.a.*

Al Sr. Darío Rodrigues (Div. Metrología, CNEA) por su colaboración para la medición dual de muestras radiactivas en un detector de Ge hiperpuro que figuran en 3.2.

Dedicatoria:

A las tres personas que me conocen desde antes de nacer y que se han preocupado y se preocupan personalmente de mí

A la humilde mujer a cuyo corazón sin mancha he consagrado mi vida

A mi esposa y a mis hijos que me soportaron durante estos 7 años

A mis padres

Glosario de términos empleados:

CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica

IEO: Instituto Europeo de Oncología

OMS: Organización Mundial de la Salud

⁶⁷Ga: Galio-67

¹¹¹In: Indio-111

^{99m}Tc: Tecnecio-99 metaestable

AcMo: Anticuerpo monoclonal

IgG: inmunoglobulina policlonal humana

⁹⁹Mo: Molibdeno-99

IL-2: Interleukina-2

UBI: ubiquicidina

RIT: radioinmunoterapia

PAGRIT®: pre-targeted antibody guided radioimmunotherapy

BIART®: Avidinación Intraoperativa en Vejiga para Terapia Radionucleídica

BFCA: agente quelante bifuncional

TAA: antígenos asociados al tumor

⁹⁰Y: Ytrio-90

CD-20: cluster de diferenciación número 20

LNH: linfoma no Hodkings

CEA: antígeno carcinoembrionario

AFP: alfa feto proteína

CD-22: Cluster de diferenciación número 22

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

DOTA: 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- *N,N',N'',N'''*-ácido tetraacético

DTPA: ácido dietilen-triamino-penta-acético

¹³¹I: Yodo-131

FDA: Food and Drug Administration, USA

SNM: Society of Nuclear Medicine, USA

HAMA: Human Anti-Murine Antibodies

Ka: constante de afinidad

Ai: Actividad inyectada

Bq: Becquerel es la unidad de actividad actual que reemplaza a la antigua llamada Curie

S-Bz-MAG₃: S-bencil mercapto-acetil-triglicina

MAS₃: mercapto-acetil-triserina

Gy: Gray es la unidad de dosis

MDP: ácido metilen difosfónico

HPLC: cromatografía líquida de alta performance

DPS: desintegración por segundo

T_{1/2}: período de semidesintegración del radionucleído

¹⁸⁸Re: Renio-188

¹⁸⁸W: Tungsteno-188

¹⁸⁸Os: Osmio-188

CPM: cuentas por minuto

DPM: desintegraciones por minuto

PRRT: terapia radionucleídica por receptores peptídicos

MTD: dosis máxima tolerable o suministrable

ICRP: International Committee of Radiation Protection

ADN: ácido desoxiribonucleico

LET: transferencia lineal de energía
IFN- γ : interferón γ
S.a.: Staphiloccocus aeureus
UBI 29-41: fragmento 29-41 de la UBI
NHS-S-acetil-MAG₃: N-hidroxisuccinidimil éster del S-acetil-MAG₃
NHS- HYNIC: N-hidroxisuccinidimil éster de hidrazino nicotinamida
ITLC: cromatografía instantánea en capa delgada
SF: solución fisiológica o salina
MEC: metil-etil-cetona
GPC: cromatografía por permeación de geles
RP: cromatografía en fase reversa
FPLC: cromatografía líquida de rápida performance
EDTA: ácido etilen-diamino tetra-acético
¹⁷⁷Lu: Lutecio-177
Ae: actividad específica
RA-3: Reactor de producción de radionucleídos del Centreo Atómico Ezeiza
MURR: Missouri University Research Reactor
RIAR: Research Institute of Atomic Reactors
BNL: Brookhaven National Laboratory
ORNL: Oak Ridge National Laboratory
At: Actividad total
DADT: diaminoditiol
TFP: tetrafluorofenol
EDDA: ácido etilendiamino-N,N-diacético
2-ME: 2-Mercaptoetanol
t-BOC: di-ter-butil-dicarbonato
DTT: ditiotreititol
UV: ultravioleta
ROIs: regiones de interés
PI / PN: relación pata infectada pata normal
Sc UBI 29-41: scrambled UBI 29-41
LEHR: baja energía y alta resolución
MEHR: media energía y alta resolución
DMF: di-metil formamida
TFA: ácido tri-fluoro acético
% D.I./g: porcentaje de dosis inyectada por gramo
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
Ca: concentración de actividad
PAMs: péptidos antimicrobianos
PET: tomografía por emisión de positrones
UMMC: University of Massachussets Medical Center
LUMC: Leiden University Medical Center
INIM: Instituto Mexicano de Investigaciones Nucleares
OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica

Tabla de Contenido

D)	<i>INTRODUCCIÓN</i> -----	<i>Pag. 13</i>
1.1	Antecedentes	
1.1.1	Importancia del diagnóstico de infecciones / inflamaciones en Medicina Nuclear	
1.1.2	Importancia de la RIT en Medicina Nuclear	
1.1.3	Surgimiento de la PAGRIT® y de la BIART® en Medicina Nuclear	
1.2	Reseña histórica	
1.3	Nociones básicas de radioquímica, química nuclear, química de las radiaciones y dosimetría	
1.3.1	Desintegración γ y β^- .	
1.3.2	Relaciones genéticas entre radionucleídos	
1.3.3	Medición de radiación γ .	
1.3.4	Interacción de la radiación con la materia.	
1.3.5	Dosimetría	
1.3.6	Química de las radiaciones	
1.3.7	Efectos biológicos de las radiaciones.	
1.4	Radiofármacos de ^{99m}Tc de uso potencial en la localización de sitios de infección / inflamación y de tumores.	
1.5	Radiofármacos de ^{188}Re de uso potencial en RIT de tumores y linfoma	
1.6	Radiofármacos de ^{90}Y y ^{188}Re uso potencial en PAGRIT® y en BIART®	
II)	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> -----	<i>Pag. 27</i>
2.1	Selección del radionucleído	
2.1.1	Exclusión de ^{177}Lu y de parte del trabajo con ^{90}Y inicialmente propuestos en el Plan de Tesis	
2.1.2	Par ^{99m}Tc y ^{188}Re . Obtención a partir de generadores de ^{99}Mo / ^{99m}Tc y $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.	
2.1.2.1	Obtención a partir de generador de $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$.	
2.1.2.2	Obtención a partir de generador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$	
2.1.3	Generalidades	
2.1.4	Química del Tc y del Re.	
2.1.5	Determinación de impurezas radioquímicas de ^{99m}Tc y ^{188}Re	
2.1.6	Biodistribución dual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 y 2 h p.i. usando un detector de germanio hiperpuro.	
2.2	Agentes quelantes utilizados en el diseño de radiofármacos de ^{99m}Tc , ^{188}Re e ^{90}Y de alta actividad específica.	
2.2.1	Requerimientos	
2.2.2	Quelantes para Tc	
2.2.3	Quelantes para Re	
2.2.4	Quelantes para Y	
2.3	Métodos de radiomarcación de biomoléculas	
2.3.1	Métodos directos	
2.3.2	Métodos indirectos.	
2.3.2.1	Técnica del quelante premarcado o marcación pre-conjugación	
2.3.2.2	Técnica de marcación post-conjugación:	
2.4	IgG policlonal humana radiomarcada con ^{99m}Tc por métodos directos	

- 2.4.1 Optimización de la marcación de IgG por reducción de puentes disulfuro usando 2-ME y DTT.
 - 2.4.1.1 Preparación de la columna de Sephadex G-50 para purificación de la IgG reducida
 - 2.4.1.2 Reducción de la IgG, purificación de la IgG reducida y medición de absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS
 - 2.4.1.3 Marcación de IgG reducida purificada con ^{99m}Tc
- 2.4.2 Optimización de la marcación de IgG por fotoactivación con radiación UV.
- 2.4.3 Determinación de los rendimientos de marcación por GPC-HPLC e ITLC-SG
- 2.4.4 Ensayo de competencia con cisteína
- 2.4.5 Biodistribución de ^{99m}Tc -IgG en ratones portadores de un sitio de inflamación a 4 y 24 h p.i.
- 2.4.6 Cálculo del tiempo de residencia en sangre
- 2.4.7 Adquisición de imágenes en cámara γ
- 2.5 UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc por métodos directos e indirectos
 - 2.5.1 Método con KBH_4
 - 2.5.2 Método con NaOH pH 10
 - 2.5.3 Conjugación de NHS-S-acetil-MAG₃ y posterior marcación
 - 2.5.4 Determinación de la pureza radioquímica por RP-HPLC e ITLC-SG
 - 2.5.5 Ensayos *in vitro*
 - 2.5.5.1 Estabilidad en PBS
 - 2.5.5.2 Ensayo de competencia con cisteína
 - 2.5.5.3 Ensayo de unión de ^{99m}Tc -UBI 29-41 a S.a.
 - 2.5.6 Estudios *in vivo*
 - 2.5.6.1 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de infección con S.a.
 - 2.5.6.2 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de inflamación estéril
 - 2.5.7 Adquisición de imágenes por autorradiografía digital y cálculo computerizado de la relación SI / SN a partir de las autorradiografías
- 2.6 Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re por métodos directos e indirectos
 - 2.6.1 Marcación de AcMo anti-CD20 por método directo
 - 2.6.1.1 Reducción del AcMo anti-CD20
 - 2.6.1.2 Marcación del AcMo anti-CD20 reducido
 - 2.6.1.3 Producción y marcación de un kit liofilizado de AcMo anti-CD20 reducido conteniendo reductor y transquelante
 - 2.6.2 Marcación de IgG y AcMo 14F7 por método indirecto
 - 2.6.2.1 Optimización de la marcación con ^{188}Re -MAG₃ usando como modelo IgG
 - 2.6.2.2 Marcación de AcMo 14F7 usando ^{188}Re -MAG₃
 - 2.6.3 Determinación de los rendimientos de marcación por RP-HPLC, GPC-HPLC e ITLC-SG
 - 2.6.4 Estudios *in vitro*
 - 2.6.4.1 Estabilidad en SF y en suero
 - 2.6.4.2 Ensayo de unión de ^{188}Re -MAG₃-AcMo anti-CD20 a linfocitos.

- 2.6.5 Estudios *in vivo*
 - 2.6.5.1 Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ y $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 en ratones normales
 - 2.6.5.2 Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo}$ 14F7 en ratones portadores de un tumor.
- 2.6.6 Adquisición de imágenes en cámara γ
- 2.7 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y
 - 2.7.1 Marcación de Biocitina y Norbiotinamina usando $^{188}\text{Re-MAG}_3$
 - 2.7.2 Marcación de conjugado DOTA-biotina con ^{90}Y
 - 2.7.3 Determinación de la pureza radioquímica por HPLC, FPLC e ITLC-SG
 - 2.7.4 Estudios *in vitro*
 - 2.7.4.1 Estabilidad en SF y en suero
 - 2.7.4.2 Ensayo de unión de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ a avidina
 - 2.7.4.3 Ensayo de unión de $^{90}\text{Y-DOTA-biotina}$ a avidina

III) **RESULTADOS**----- Pag. 46

- 3.1 Generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$
 - 3.1.1 Perfil de elución del generador
 - 3.1.2 Curva experimental de elución del generador
- 3.2 Biodistribución simultánea de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 y 2 h p.i. y detección dual usando un detector de germanio hiperpuro
- 3.3 IgG policlonal humana radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por métodos directos.
 - 3.3.1 Optimización de la marcación de IgG por reducción de puentes disulfuro usando 2-ME y DTT
 - 3.3.1.1 Reducción de la IgG con 2-ME y DTT, purificación por columna y medición de la absorbancia a 280 nm
 - 3.3.1.2 Marcación de IgG reducida con $^{99\text{m}}\text{Tc}$
 - 3.3.2 Optimización de la marcación de IgG por fotoactivación con radiación UV.
 - 3.3.3 Determinación de la pureza radioquímica por GPC-HPLC e ITLC
 - 3.3.4 Ensayo de competencia con cisteína
 - 3.3.5 Biodistribución de $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$ reducida con 2ME y $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$ fotoactivada en ratones balb/c con inflamación inducida a 4 y 24 h p.i.
 - 3.3.6 Tiempo de residencia en sangre para $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$ reducida con 2ME, $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$ fotoactivada y $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$
 - 3.3.7 Adquisición de imágenes en cámara γ
- 3.4 UBI 29-41 radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por métodos directos e indirectos
 - 3.4.1 Determinación de los rendimientos de marcación por RP-HPLC e ITLC-SG
 - 3.4.1.1 Método con KBH_4
 - 3.4.1.2 Método con NaOH pH 10
 - 3.4.1.3 Conjugación de $\text{NHS-S-acetil-MAG}_3$ y posterior radiomarcación
 - 3.4.2 Ensayos *in vitro*
 - 3.4.2.1 Estabilidad en PBS
 - 3.4.2.2 Ensayo de competencia con cisteína
 - 3.4.2.3 Ensayo de unión de $^{99\text{m}}\text{Tc-UBI 29-41}$ a *S.a.*

- 3.4.3 Estudios *in vivo*
 - 3.4.3.1 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de infección con *S.a.*
 - 3.4.3.2 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de inflamación estéril.
 - 3.4.3.3 Cuantificación de los valores PI/PN para ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) a 2 h p.i. y de ^{99m}Tc -IgG a 4 h p.i. en ratones con *S.a.* no viables obtenidos por irradiación.
- 3.4.4 Adquisición de imágenes por autorradiografía digital y cálculo computerizado de la relación SI / SN.
- 3.5 Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re por métodos directos e indirectos
 - 3.5.1 Marcación de AcMo anti-CD20 por método directo
 - 3.5.1.1 Reducción del AcMo con 2-ME, purificación por columna y medición de la absorbancia a 280 nm.
 - 3.5.1.2 Optimización del rendimiento de radiomarcación de ^{188}Re -Rituximab en función de la variación del pH
 - 3.5.1.3 Marcación de un kit liofilizado de AcMo anti-CD20 reducido conteniendo reductor y transquelante
 - 3.5.2 Optimización de la marcación con ^{188}Re -MAG₃ (método indirecto) usando como modelo IgG
 - 3.5.2.1 Marcación de S-Bz-MAG₃ con ^{188}Re
 - 3.5.2.2 Esterificación de ^{188}Re -MAG₃ con TFP
 - 3.5.2.3 Conjugación de ^{188}Re -MAG₃-TFP a IgG.
 - 3.5.3 Marcación de AcMo 14f7 usando ^{188}Re -MAG₃-TFP
 - 3.5.4 Determinación de los rendimientos de marcación por HPLC e ITLC-SG y de las Ae.
 - 3.5.5.1 Determinación de los rendimientos de marcación por HPLC y de las Ae.
 - 3.5.5.2 Análisis por ITLC-SG
 - 3.5.5 Estudios *in vitro*
 - 3.5.5.1 Estabilidad en SF y en suero
 - 3.5.5.2 Ensayo de reconocimiento biológico para ^{188}Re -AcMo anti-CD20 obtenido de AcMo reducido y de kit liofilizado.
 - 3.5.6 Estudios *in vivo*
 - 3.5.6.1 Biodistribución de ^{188}Re -AcMo anti-CD20 en ratones normales
 - 3.5.6.2 Biodistribución de ^{188}Re -MAG₃-IgG en ratones normales
 - 3.5.6.3 Biodistribución de ^{188}Re -MAG₃-AcMo 14f7 en ratones portadores de un tumor.
 - 3.5.7 Imágenes obtenidas por cámara γ
- 3.6 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y
 - 3.6.1 Marcación de Biotina y Norbiotinamina usando ^{188}Re -MAG₃-TFP
 - 3.6.2 Marcación de conjugado DOTA-biotina con ^{90}Y
 - 3.6.3 Determinación de la pureza radioquímica por HPLC, FPLC e ITLC-SG
 - 3.6.4 Estudios *in vitro*
 - 3.6.4.1 Estabilidad en SF y en suero
 - 3.6.4.2 Ensayo de unión de ^{188}Re -MAG₃-Norbiotinamina a avidina

3.6.4.3 Ensayo de unión de ^{90}Y -DOTA-biotina a avidina

IV)	<i>DISCUSIÓN</i> -----	<i>Pag. 82</i>
4.1	IgG radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$	
4.2	UBI 29-41 radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$	
4.3	Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re	
4.4	Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y	
4.5	Discusión general	
V)	<i>CONCLUSIONES</i> -----	<i>Pag. 98</i>
5.1	IgG radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$	
5.2	UBI 29-41 radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$	
5.3	Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re	
5.4	Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y	
5.5	Conclusiones generales	
VI)	<i>ANEXOS</i> -----	<i>Pag. 103</i>
6.1	Publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis	
6.2	Presentaciones realizadas relacionadas con el trabajo de tesis	
6.3	Premios recibidos relacionados con el trabajo de tesis	
VII)	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> -----	<i>Pag. 106</i>

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.

1.1.1 Importancia del diagnóstico de infecciones / inflamaciones en Medicina Nuclear

Los procesos infecciosos continúan encabezando la estadística de causas de muerte en el ámbito mundial. Según la OMS, el 25% de las muertes en el mundo son causadas por procesos infecciosos. La centellografía es un excelente método no invasivo, que permite la localización y la determinación de focos inflamatorios e infecciosos, basado en cambios funcionales (fisiológicos y /o bioquímicos) de los tejidos y en un aumento localizado de la concentración de células que participan de la respuesta inflamatoria, a diferencia de otras técnicas (radiológicas, resonancia magnética nuclear, ultrasonografía y tomografía computada) que solo detectan cambios anatómicos.

Las principales indicaciones de centellografía de infección e inflamación son fiebre de origen desconocido, las inflamaciones e infecciones musculoesqueléticas, abdominal, vascular y pulmonar, esta última en particular en los pacientes inmunodeprimidos.

Tradicionalmente se ha utilizado una amplia gama de radiofármacos que van desde el citrato de ^{67}Ga , los leucocitos radiomarcados con ^{111}In (i) o con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, los nanocoloides de albúmina o gelatina radiomarcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ii) y el fragmento Fab' de sulesomab (un AcMo murino recomendado para detección de osteomielitis que reconoce la glicoproteína de superficie NCA-90 de los granulocitos) radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, hasta los anticuerpos no específicos radiomarcados como ser $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG e ^{111}In -IgG (iii).

Numerosos estudios en pacientes han demostrado la factibilidad del uso de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG (iv) en la localización de inflamaciones / infecciones agudas y crónicas. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un kit liofilizado de IgG instantáneo de un solo paso, para marcar con el solo agregado del $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ eluido del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Actualmente está emergiendo una nueva clase de radiofármacos para detección de infección / inflamación muy promisorios: pequeñas proteínas y péptidos radiomarcados que son receptor específicos (como ser IL-2 que se une con alta afinidad a sus receptores específicos expresados en la superficie de linfocitos T activados) o que actúan por diferencia de carga con respecto a la superficie de la membrana bacteriana. Entre estos últimos cabe mencionar a los péptidos catiónicos antimicrobianos como ser la UBI (PM 6654) y sus fragmentos, que están siendo reconsiderados como potenciales agentes en la lucha contra las infecciones especialmente aquellas originadas por bacterias multi-resistentes a los antibióticos comunes.

1.1.2 Importancia de la RIT en Medicina Nuclear

Hace veinte años atrás, la radiofarmacia estaba basada en el balance hidrofílico-lipofílico, el potencial redox y el isomerismo, que hicieron posible la llamada era de los agentes de perfusión (cerebral y de miocardio) que impactaron fuertemente en el diagnóstico en Medicina Nuclear. Actualmente está basada en el reconocimiento molecular mediante el uso de moléculas radiomarcadas que presentan una elevada actividad biológica (AcMos, sistema avidina/biotina y péptidos sintéticos bioactivos) que han posibilitado el nacimiento de nuevas áreas dentro de la Oncología Nuclear como ser la RIT, la PAGRIT® y la PRRT. El principal objetivo de la RIT del cáncer es mejorar la efectividad del radionucleído por concentración de este en el tumor, lo cual presenta el beneficio de producir menores efectos tóxicos en órganos normales. El

concepto de usar fuentes radioactivas no selladas dirigidas hacia blancos moleculares para terapia no es nuevo, pero recién ahora con la disponibilidad de radionucleídos con propiedades terapéuticas (en particular ^{90}Y) y de AcMos quiméricos y humanizados que reconocen nuevos blancos moleculares de manera selectiva y específica, ha sido posible el surgimiento de la RIT en Medicina Nuclear.

Esta técnica que comenzó a aplicarse primeramente en pacientes, para el tratamiento de pequeñas lesiones múltiples diseminadas en el cerebro (glioblastomas y astrocitomas) y /o micrometástasis secundarias, combina la elevada capacidad de reconocimiento antigénico (especificidad) y de unión (afinidad) a determinados TAA (CEA, Tenascina y antígeno de cáncer de ovario) que tiene la región hipervariable de los AcMos con la capacidad de producir un daño celular que poseen los radionucleídos emisores β - y α .

Durante la década pasada algunas terapias nuevas basadas en varios AcMos no radiomarcados y radiomarcados con distintos radionucleídos (^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu y ^{186}Re) comenzaron a estar disponibles para el tratamiento de LNH, mostrando algunos estudios que la RIT es una nueva modalidad de tratamiento efectiva contra esa enfermedad.(v)

Posteriormente en el año 2002, la FDA aprobó la aplicación clínica de Rituximab no radiomarcado (IgG1, anti-CD20 quimérico) conjuntamente con ^{131}I tositumomab (IgG2a, anti-CD20 murino) o ^{90}Y -Ibritumomab Tiuxetan (IgG1, anti-CD20 murino) para el tratamiento de LNHs de células B (linfoma folicular y linfoma del manto) que expresan el antígeno CD20, mostrando resultados exitosos.

En la actualidad hay una serie de AcMos radiomarcados con ^{90}Y que se encuentran en las primeras fases de ensayos clínicos a saber: hPAM4 (anti-MUC1 humanizado) para cáncer de páncreas, hAFP (anti-AFP humanizado) para cáncer primario de hígado, Epratuzumab (IgG1 anti-CD-22 humanizado) para LNH indolente y agresivo y Labetuzumab (anti-CEA humanizado) para tumores sólidos metastáticos inoperables.

Se especula con la aplicación de AcMos (humanizados) radiomarcados específicos contra el dominio extracelular de receptores de EGF y VEGF sobre expresados en las células tumorales. Estos AcMos (entre los que figuran Cetuximab y Panitumumab) ya han sido aprobados por la FDA para su uso sin radiomarcado, dado que inhiben el crecimiento tumoral y la angiogénesis bloqueando los receptores y la consecuente señalización tumoral intracelular.

1.1.3 Surgimiento de la PAGRIT® y de la BIART® en Medicina Nuclear

A pesar de terapias agresivas como cirugía, radioterapia y quimioterapia, el pronóstico de los gliomas de alto grado es muy pobre y en la mayoría de los casos la recurrencia ocurre invariablemente en un corto período de tiempo. La RIT de tumores sólidos con AcMo radiomarcados está limitada por la farmacocinética lenta y una baja relación tumor / tejido sano. Con el objeto de mejorar su performance, se desarrolló la PAGRIT® (Sigma-tau, Milán) o sistema RIT de 3 pasos, un approach terapéutico antitumoral basado en el pretargeting con el sistema avidina/ biotina (vi), que emplea DOTA-biotina (NeoRx Corp., USA) radiomarcada con ^{90}Y ($T_{1/2}$ 64.1 h, E_{β} - 2.3 MeV) y AcMo-biotinado, administrados separadamente de acuerdo al siguiente esquema:

1er día AcMo biotinado específico para el antígeno que expresa la lesión que se desea tratar. 2do día Avidina (PM 65.000), que es una proteína tetramérica altamente glicosilada y cargada positivamente (cada una de cuyas subunidades se une a una biotina) que muestra una afinidad por biotina extremadamente elevada ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) 3er día Conjugado ^{90}Y -DOTA-biotina (vía intravenosa o locoregional por un catéter colocado en la cavidad quirúrgica reseca).

De esta forma se disocia el reconocimiento y la unión del AcMo al tumor, del transporte del emisor β - que es realizado por la biotina, una molécula pequeña (PM 244), que

permite la administración de altas dosis de ^{90}Y (Ai de 3.33 GBq) en forma segura sin producir radiotoxicidad en médula ósea.

Esta técnica mejora significativamente la relación tumor / fondo amplificando la dosis entregada al tumor (ya que por cada molécula de avidina se unen cuatro de biotina) y disminuyendo la dosis en órganos no blanco debido a la rápida farmacocinética de la biotina radiomarcada. Actualmente son tratados por PAGRIT® varios tipos de tumores entre los cuales se incluyen carcinomas metastásicos (vii), melanoma y tumores neuroendócrinos (viii) pero el blanco más explotado lo constituye la molécula de matriz extracelular tenascina sobre expresada en gliomas de alto grado.

Otra terapia basada en el sistema avidina / biotina radiomarcada (ix), que se está ensayando clínicamente en el tratamiento de cáncer de vejiga se denomina BIART® (la sigla inicial proviene de Bladder). En la mayoría de los casos, este tipo de cáncer se presenta en forma superficial pudiendo ser tratado por administración intravesical de avidina y biotina radiomarcada que se acumula selectivamente en el tejido tumoral respecto del urotelio normal.

1.2 Reseña histórica

1937 Segré y Perrier descubren el elemento Tecnecio

1936 Kögl y Tönnis aislaron a partir de la yema de huevo un factor en forma cristalina que llamaron biotina

1940 Eakin y colaboradores aislaron la avidina de la clara de huevo

1950-55 Shellabarger y Richards: desarrollo del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

1965-75 Eckelman y Richards: desarrollan kits de radiofármacos instantáneos empleando SnCl_2 .

Subramanian: utiliza $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP.

1975 Loberg: comienza la aplicación del HPLC.

Marzilli y Burns: comienza la utilización de técnicas cromatográficas para estimar la relación metal-ligando en complejos.

1980-85: Descubrimiento de Tc (V) oxo complejos (fosfinas, isonitrilos, aminas y oximas).

Uso del MAG_3 para la marcación de péptidos y proteínas en particular AcMo .

1990 Archer y Linder: desarrollan agentes para la detección de hipoxia.

2002 La FDA aprueba el uso en pacientes del primer AcMo marcado con un emisor beta negativo para RIT de LNH.

1.3 Nociones básicas de radioquímica, química nuclear, química de las radiaciones y dosimetría

1.3.1 Desintegración γ y β^-

La desintegración radiactiva es un fenómeno por el cual un núcleo inestable de un átomo (núcleido padre) se transforma espontáneamente (desintegración) en otro (núcleido hijo). Existen distintos mecanismos de desintegración que se clasifican según el tipo de emisión de radiación (γ) o de partículas (α , β^- , β^+ , neutrones). La ley fundamental de la desintegración radiactiva enuncia

$$-dN = \lambda * N * dt$$

donde λ es la constante de desintegración radiactiva propia de cada radionucleído, N es el número de átomos radiactivos, dN el número de átomos que se desintegran en un diferencial de tiempo (dt). El valor $\lambda \cdot N$ se conoce como actividad, cuyas unidad Bq equivale a una dps. La ecuación integrada se expresa

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

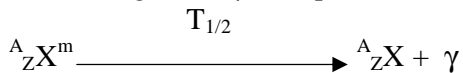
Donde N_0 representa el número de átomos presentes en el instante $t = 0$. Es decir que la desintegración radiactiva tiene la forma de una función exponencial negativa. Multiplicando la anterior ecuación por λ obtenemos que

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

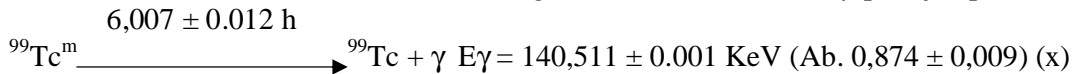
Es común trabajar con el $T_{1/2}$ que corresponde al tiempo necesario para que la actividad de un radionucleído disminuya a la mitad, es decir cuando $A = A_0/2$. Reemplazando se deduce que

$$T_{1/2} = \ln 2 / \lambda = 0.693 / \lambda$$

La desintegración γ se esquematiza así



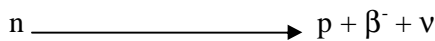
Es decir un radionucleído en un estado excitado metaestable pasa a su estado fundamental liberando la diferencia de energía en forma de un fotón γ , por ejemplo



La desintegración beta negativa se esquematiza de la siguiente manera



Representando de izquierda a derecha el radionucleído padre, período de semidesintegración, nucleído hijo, símbolo de la emisión beta negativa y un neutrino. Este tipo de desintegración obedece a una transformación a nivel de nucleones simbolizada por



donde n representa un neutrón y p un protón. Dado que la energía de la desintegración se reparte entre el β^- y el ν , habrá para una población de un dado radionucleído una distribución de energías para el β^- que tendrá un valor máximo y un valor medio.

Debemos mencionar que existen radionucleídos emisores β^- puros (por ejemplo ${}^{90}Y$) que no poseen ninguna emisión γ asociada y otros como ${}^{188}Re$ que si la tienen.

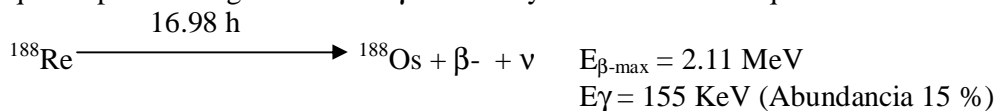
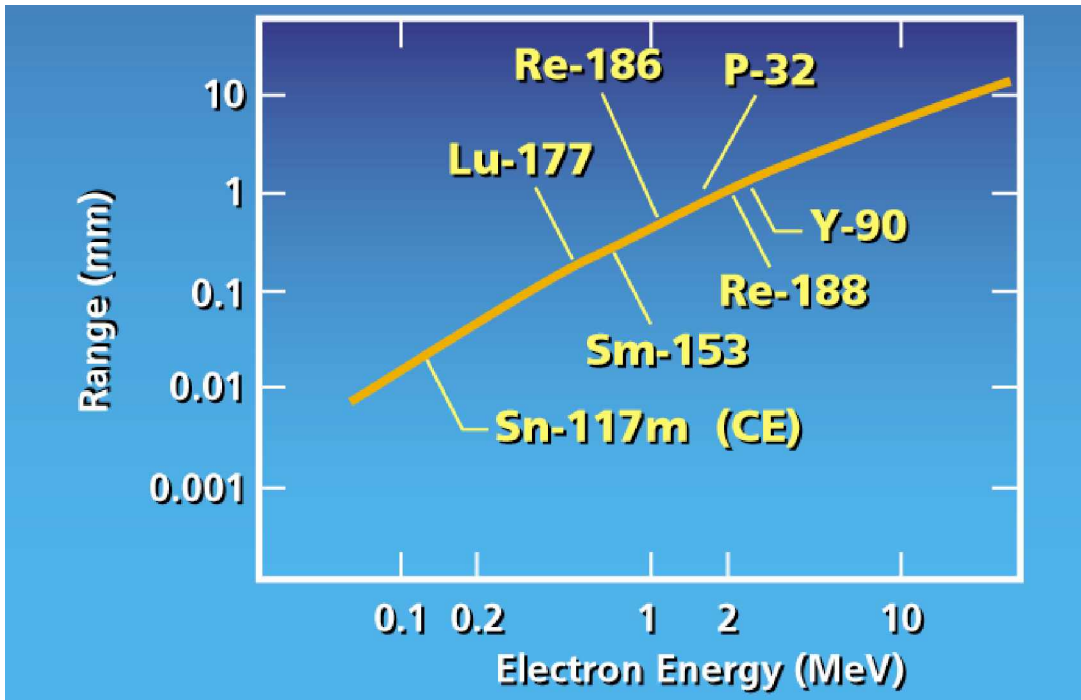


Fig. 1 Rango de electrones en tejido blando en función de la energía (extraído de página web del ORNL)



1.3.2 Relaciones genéticas entre radionucleidos

La velocidad de aparición del radionucleido 2 (hijo) a partir del radionucleido 1 (padre) está dada por la siguiente ecuación

$$dN_2/dt = \lambda_1 * N_1 - \lambda_2 * N_2$$

Reordenando

$$dN_2/dt + \lambda_2 * N_2 - \lambda_1 * N_1 * e^{-\lambda_1 * t} = 0$$

$$N_2 = (\lambda_1 / (\lambda_2 - \lambda_1)) * N_1 * (e^{-\lambda_1 * t} - e^{-\lambda_2 * t}) + N_2 * e^{-\lambda_2 * t} = 0$$

Tomando como condición inicial a $t = t_0$, que no existe radionucleido hijo presente es decir que $N_2 = 0$, entonces la ecuación anterior se reduce a

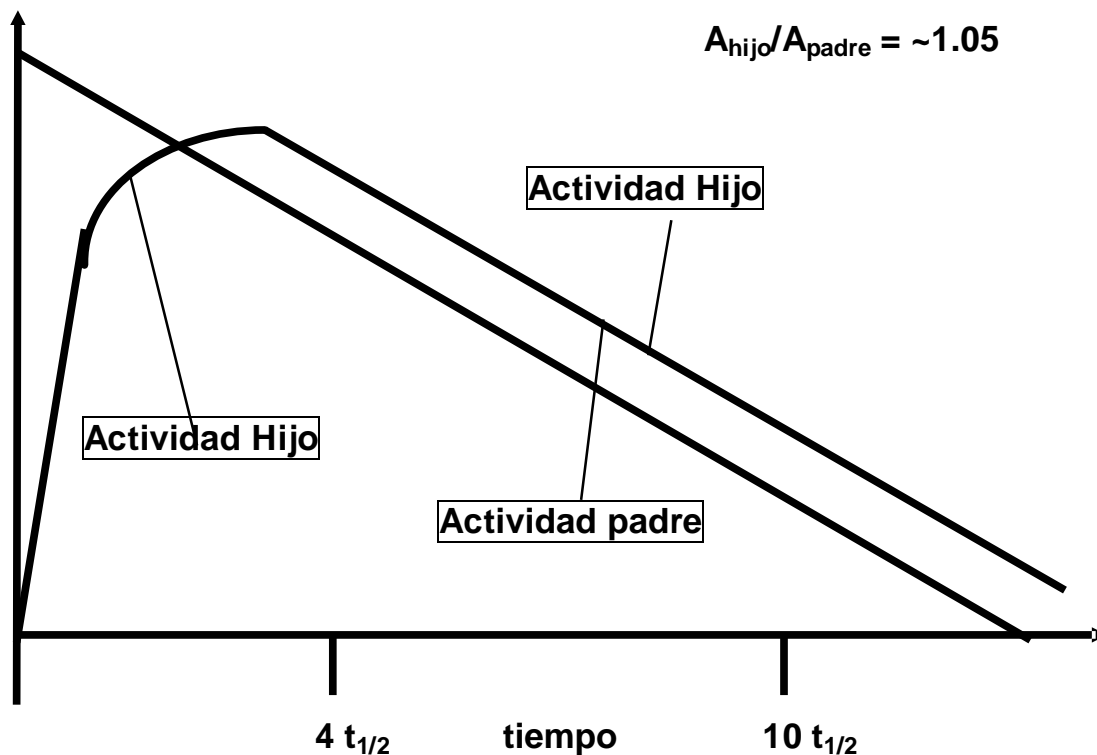
$$N_2 = (\lambda_1 / (\lambda_2 - \lambda_1)) * N_1 * (e^{-\lambda_1 * t} - e^{-\lambda_2 * t})$$

Si se hace $dN_2/dt = 0$ la condición de máximo de una función puedo conocer el tiempo al cual A_2 es máxima ($t = t_{max}$)

$$t_{max} = (2.303 / (\lambda_2 - \lambda_1)) * \log (\lambda_2 - \lambda_1) \quad \text{Ecuac. de A máxima}$$

Esta ecuación permite calcular en un sistema generador, a que tiempo se alcanza la máxima actividad del radionucleido hijo desde la última elución (Fig. 2).

Fig.2 Equilibrio en tránsito. Se alcanza en aproximadamente $4 t_{1/2}$ del hijo



1.3.3 Medición de radiación γ .

La cuantificación de radiación requiere de sistemas detectores que generen a partir de ella algún tipo de señal (eléctrica) que procesada adecuadamente brinde información cualitativa o cuantitativa acerca de las radiaciones de origen.

Durante la realización de este trabajo fueron utilizados: i) detectores por cámara de ionización (gaseosos) para la medición de la actividad total eluida de los generadores de ^{99m}Tc y ^{188}Re ; y ii) detectores por centelleo sólido INa(Tl) (por excitación) para la medición de actividades pequeñas en un contador γ automático y del flujo continuo a la salida de un HPLC (cuantificación de radiocromatogramas).

i) Los detectores gaseosos poseen un recinto conteniendo un gas, sometido a un campo eléctrico producido por una diferencia de potencial aplicada entre dos electrodos (uno de los cuales es el recinto). Al interaccionar las partículas ionizantes con el gas se generan pares iónicos de carga opuesta que sometidos al campo eléctrico son acelerados hacia los electrodos polarizados eléctricamente y las cargas eléctricas circulan por el circuito exterior configurando una señal eléctrica. Cuando un detector gaseoso se polariza (aplicando un cierto valor de tensión) en forma tal que todos los iones primarios generados en su interior son recolectados, entonces opera en forma de cámara de ionización. ii) Uno de los detectores mas apropiados para la detección y cuantificación de rayos γ es el detector de centelleo sólido formado por un cristal de NaI (impurificado con Tl), seguido de un fototubo multiplicador, un amplificador de pulsos y un espectrómetro monocanal capaz de clasificar y contar los pulsos correspondientes a la ventana de energía seleccionada. Los cristales centelladores transforman una pequeña fracción de la energía cinética de las partículas secundarias cargadas en energía luminosa que incide sobre un tubo fotomultiplicador y se transforma en señales

eléctricas. El cristal de NaI (impurificado con Tl) tiene alta eficiencia de centelleo y una respuesta prácticamente lineal a la radiación para un rango amplio de energías por lo que se utiliza en espectrometría γ . Posee como desventajas una alta higroscopicidad (se los encapsula debido a que se opacan al hidratarse) y un t decaimiento del impulso luminoso (10^{-7} seg.) que genera saturación en el conteo de actividades elevadas.

Los fotomultiplicadores son válvulas multielectrónicas capaces de producir sobre un ánodo, avalanchas de 10^5 - 10^6 e^- a partir de un único e^- generado por un fotón incidente en su fotocátodo, a través de un sistema de 10 dinodos con una diferencia de potencial aplicada entre ellos.

El valor de actividad medida por el instrumento en CPM corresponde a un porcentaje (eficiencia) del valor de actividad absoluta de la fuente radioactiva que se expresa en DPM.

1.3.4 Interacción de la radiación con la materia

Las radiaciones constituidas por partículas cargadas eléctricamente como las partículas α y β , pueden ionizar directamente los átomos del material con el que interactúan y se denominan radiaciones directamente ionizantes. Estas son poco penetrantes, el alcance es de algunos mm para partículas β - cuando interactúan con agua o tejidos biológicos. Las β - tienen varios modos de interacción clasificadas como colisiones elásticas (1) e inelásticas (2), subdividiéndose estas en interacción con los electrones (a) o con el núcleo atómico (b).

1.a Este tipo de interacción es importante para rangos de energía inferiores a 100 KeV, donde la partícula es desviada por el campo eléctrico de los electrones orbitales cediendo muy poca energía cinética. No es el caso de las emitidas por ^{188}Re que son de alta energía.

1.b La partícula β - se desvía por el campo de las cargas positivas nucleares, cediendo una parte de su energía cinética.

2.a Parte de la energía de la partícula excita los electrones del átomo elevando su nivel de energía y volviendo posteriormente estos a su estado fundamental emitiendo fotones de una determinada energía como consecuencia de la desexcitación. Si la energía es suficientemente grande puede arrancar un electrón quedando el átomo ionizado.

2.b La partícula es acelerada o frenada por interacción con el campo del núcleo, cediendo parte de su energía que se emite en forma de radiación electromagnética llamada "de frenamiento" o Bremsstrahlung. Esta es considerable en el caso de que se utilicen blindajes de plomo para fuentes β - de alta energía como ser ^{188}Re .

Las radiaciones electromagnéticas (por ej. los rayos γ) y los haces de neutrones, no poseen carga eléctrica y al interactuar con la materia liberan partículas cargadas (electrones) que son las que a su vez ionizan los átomos del material, estas radiaciones se denominan indirectamente ionizantes. La radiación γ es de baja LET y no tienen un alcance máximo en la materia sino que su intensidad se atenúa exponencialmente en función de la penetración, los fotones sufren choques menos frecuentes y en ellos son absorbidos o dispersados del haz. El alcance de dichas partículas se define como la distancia mínima que se necesita para detenerlas y la cantidad de interacciones para detenerlas depende de la sustancia, de la partícula en cuestión y de su energía.

De los tres mecanismos generales de interacción a saber Efecto fotoeléctrico, Dispersión Compton y Formación de pares solo mencionaremos el primero que es el que se produce preferentemente al nivel de energía (140 y 155 KeV) correspondiente a los rayos γ emitidos por ^{99m}Tc y ^{188}Re respectivamente. Dicho efecto consiste en la interacción del fotón incidente con la nube electrónica del átomo, el fotón es absorbido

y hace que emerja un electrón (fotoelectrón), cuya energía es la diferencia entre la energía del fotón incidente y la energía de unión del electrón en el nivel desde el que fue removido. La probabilidad del efecto aumenta con la energía de unión, por lo que habitualmente el fotoelectrón pertenece los niveles más próximos al núcleo (mayor E de unión). Esto origina una vacancia que es cubierta por otro electrón proveniente de niveles superiores, originándose una emisión de radiación X característica de la estructura electrónica del átomo.

La microdistribución o cantidad de iones que se producen en volúmenes comparables con la estructura del núcleo celular puede ser muy diversa y depende del tipo de radiación y de la energía media que sus partículas ceden por unidad de recorrido. Por esta razón, la irradiación de un determinado tipo de tejido u órgano a igual dosis absorbida pero diferente tipo de radiación, provoca un efecto biológico de diverso (Eficiencia Biológica Relativa).

1.3.5 Dosimetría

El concepto de Dosis absorbida se define como

$$D = dE / dm$$

donde E es la energía en Joule y m la masa en Kg y su unidad en el S.I. es el Gray (Gy).

La Dosis Equivalente (H) se define

$$H = \sum_R W_R * D_{TR}$$

donde W_R es un factor de corrección para cada tipo de radiación W_R vale 1 para rayos X, γ y partículas β^- y vale 20 para partículas α . Otro elemento a tener en cuenta es la radiosensibilidad del órgano o tejido irradiado. Por ello, a los efectos de posibilitar la evaluación del riesgo en irradiaciones parciales del cuerpo se define la Dosis Efectiva (E) mediante la expresión:

$$E = \sum_T W_T * \sum_R W_R * D_{TR}$$

donde W_T (Tabla 1) es un factor adimensional que depende del tejido irradiado.

Tabla 1. Factores de ponderación de los tejidos en seres humanos, w_T

Tejido u órgano	w_T
Gónadas	0,20
Médula ósea (roja)	0,12
Colon	0,12
Pulmón	0,12
Estómago	0,12
Vejiga	0,05
Mamas	0,05
Hígado	0,05
Esófago	0,05
Tiroides	0,05
Piel	0,01
Superficie ósea	0,01
Resto	0,05

Otro parámetro importante a calcular es la Actividad acumulada o integrada \tilde{A} en un órgano dado para un dado radiofármaco que se toma como la integral en el tiempo de la ecuación de retención para ese órgano, si esa ecuación de retención está representada por una función exponencial simple:

$$\tilde{A} = \int_0^{\infty} A(t) dt$$

Este valor de \tilde{A} en un órgano dado dividido la Actividad inyectada nos da el tiempo de residencia τ en ese órgano que tiene unidades en segundo pero que representa la actividad acumulada normalizada por la actividad inyectada.

$$\tau = \frac{\tilde{A}}{A_0}$$

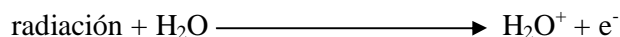
A través del sistema MIRD (empleado por la SNM desde 1960) es posible estimar la fracción de dosis absorbida por un órgano blanco de masa conocida producida por la actividad presente en órganos fuente utilizando modelos matemáticos. Esto resulta de particular importancia porque para la aplicación clínica de radiofármacos en RIT, PAGRIT y PRRT es necesario estimar la dosis absorbida por el tumor y los órganos no blanco en función de la actividad suministrada (mGy/MBq), individuar los órganos críticos y determinar la MTD en función de los límites de dosis a órganos propuesta por el ICRP. Para ello se deben conocer las características físicas del radionucleído, las características metabólicas de la biomolécula, las vías de eliminación del organismo, las características específicas del paciente (tipo, tamaño y localización del tumor) y calcular los τ en cada órgano.

Estos valores permiten establecer una relación dosis/ respuesta en una variedad inmensa de tratamientos con radiofármacos terapéuticos. Otra de las utilidades de la dosimetría interna consiste en la optimización de las terapias donde se busca por diversos medios disminuir la dosis absorbida por órganos críticos de manera tal de aumentar la MTD.

1.3.6 Química de las radiaciones

En este punto mencionaremos solamente las reacciones que se producen en la radiólisis del agua debido al efecto que tienen sobre las soluciones acuosas que contienen los radiofármacos (principalmente los que contienen radionucleídos emisores β^-) y también sobre los tejidos dado su elevado contenido de agua.

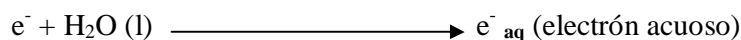
La ionización es una reacción clave en todos los mecanismos de radiólisis incluyendo la radiólisis del agua.



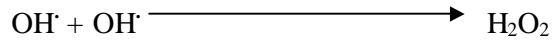
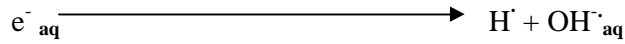
Posteriormente a la ionización se forman los radicales libres que se describen seguidamente.



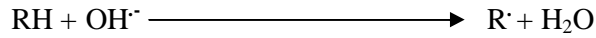
Reacción ion-molécula donde se produce la sustracción de hidrógeno por parte del ion, con la formación de un radical hidroxilo.



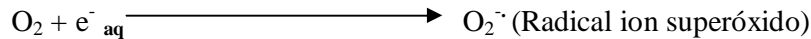
Reacción de adición electrónica a agua líquida, del electrón formado a partir de la acción de la radiación.



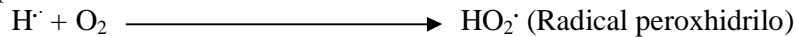
Reacción de combinación de radicales libres hidroxilos para dar peróxido de hidrógeno



Si consideramos un medio acuoso en el que hay oxígeno presente, vemos que este último tiene un importante efecto potenciador en la formación de radicales libres (R[·]), lo cual explica entre otras cosas el porqué de la mayor resistencia a la radiación de baja LET de las células tumorales en su mayoría hipóxicas (requieren de una dosis 2.5 a 3 veces superior) respecto de las células normalmente oxigenadas.



Reacción de adición electrónica al oxígeno gaseoso, de un electrón acuoso formando un ion superóxido.



Reacción de captura de un radical H por el oxígeno.

Los peróxidos e hidroperóxidos son compuestos estables que pueden conducir a lentas oxidaciones en el medio en que se encuentran, tiempo después de su formación (xi).

1.3.7 Efectos biológicos de las radiaciones

Las radiaciones ionizantes producen tanto excitación como ionización de los átomos que componen las moléculas de las estructuras biológicas y pueden alterar las mismas en su estructura físico-química y función biológica. Todas las moléculas (por ej. agua) y macromoléculas (ADN, proteínas, etc) que constituyen la materia viva son susceptibles de ser ionizadas y sufrir algún tipo de efecto biológico. Las radiaciones ionizantes pueden ionizar al ADN directamente (especialmente las de alta LET) o indirectamente a través de la producción de radicales libres originados en la radiólisis de sistemas acuosos (ver 1.3.6) en especial las de baja LET.(xii).

Algunas de los efectos de la radiación ionizante sobre el ADN son: frecuentemente la ruptura de cadenas de la doble hélice (simple o doble), alteración de las bases (deleción o hidroxilación), oxidación e hidrólisis de los azúcares (puede conducir a deleción) y con menor frecuencia la formación de puentes anómalos intra o intercatenarios (cross links). Las mutaciones del ADN que escapan a los mecanismos de reparación pueden conducir a la muerte de la célula mutada (por necrosis celular, por apoptosis celular, o por impedimento de la reproducción normal de la célula por mitosis o meiosis) y también a la transformación neoplásica (reparación incorrecta, que conserva mutaciones que son compatibles con la vida y la división celular).

Los efectos biológicos se clasifican en determinísticos y estocásticos xiii. La mayoría de los órganos y tejidos del cuerpo humano no ven afectada su funcionalidad por la muerte de un escaso número de células, pero si la pérdida es lo suficientemente elevada se producirá un daño susceptible de ser observado. Estos efectos relacionados con la muerte celular se denominan determinísticos. Se caracterizan porque la probabilidad de que se produzcan es nula a dosis pequeñas, pero por encima de un determinado nivel de dosis denominado "umbral" aumenta su frecuencia y severidad. Ejemplos de efectos somáticos determinísticos son las cataratas del cristalino, la aplasia medular radioinducida y el síndrome cutáneo radioinducido. Dada la existencia de una dosis umbral bien definida, la prevención de efectos determinísticos se logra haciendo que las

dosis no excedan ciertos límites, seleccionados suficientemente debajo del umbral siguiendo las recomendaciones del ICRP. La protección en este caso puede ser absoluta. Existe otro tipo de efectos biológicos de naturaleza aleatoria o estadística que no se relacionan con la muerte celular sino que se producen como consecuencia de la modificación del genoma de una célula, convirtiéndola en una célula viable pero transformada. Estos efectos se denominan estocásticos, y se caracterizan por no presentar umbral de dosis, por tener un largo período de latencia (carcinogénesis inducida) y por que la frecuencia es una función de la dosis, en un amplio rango de dosis. Si la célula somática es modificada en un subgrupo específico de genes (proto-oncogenes y genes supresores), la falta de reparación de este daño puede generar mutaciones que crean un potencial para el desarrollo neoplásico (efecto estocástico somático). Si la célula modificada es germinal el efecto será observable en la descendencia (efectos estocásticos hereditarios).

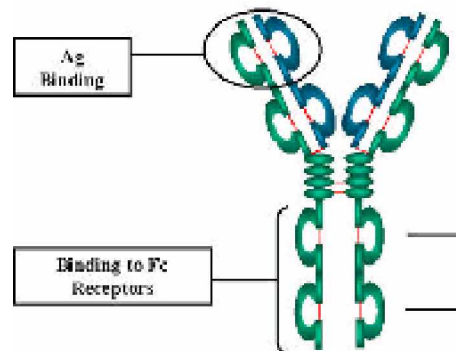
Hasta 1990 se suponía que los efectos de la dosis estaban directamente relacionados con el daño al ADN del núcleo celular, sin embargo trabajos posteriores (xiv) mostraron la primera evidencia *in vitro* de que el daño celular provocado por irradiación con partículas α a bajas dosis podía ser transmitido a las células vecinas que no fueron irradiadas (efecto bystander). Otros estudios pusieron en evidencia que la irradiación citoplasmática induce cambios locales en el ADN probablemente a través de la acción de radicales libres.

1.4 Radiofármacos de ^{99m}Tc de uso potencial en la localización de sitios de infección/ inflamación y de tumores

Diferentes radionucleídos han sido usados para la radiomarcación de biomoléculas con la finalidad de localizar pequeños tumores (xv) y sitios de infección/ inflamación. El ^{99m}Tc es el radionucleído más popular para diagnóstico por imágenes porque tiene propiedades nucleares ideales, como ser un único fotón de energía de 140 KeV, un período de semidesintegración de 6 h y esta fácilmente disponible a partir de un generador de $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$.

La obtención de compuestos radiomarcados con ^{99m}Tc para diagnóstico, se desarrolló hace tiempo luego de la aparición del generador de $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$. Entre las proteínas mas estudiadas, se encuentra la IgG (Fig. 3), una glicoproteína (150.000 PM) compuesta de dos cadenas pesadas (50.000 PM) en color verde y dos livianas (aprox. 22.000 PM) en color azul, unidas por puentes disulfuro (en color rojo), que radiomarcada por diferentes métodos y con distintos resultados comenzó a utilizarse para la localización de inflamaciones y diferenciación de grados en patologías inflamatorias (por ej. artritis reumatoidea) en Medicina Nuclear (xvi) y también en la localización de infecciones en forma inespecífica.

Fig. 3. Representación esquemática de la estructura de una IgG. Se señala la región de unión a antígeno y la región Fc que se une a receptores específicos presentes en los leucocitos



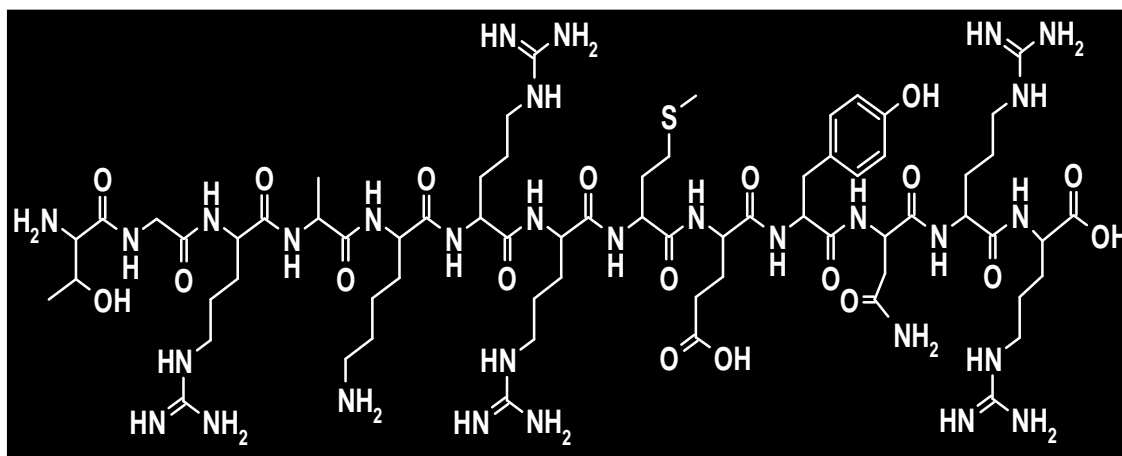
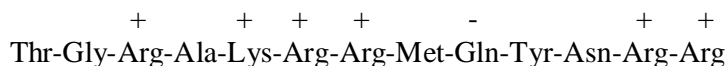
Otros potenciales fármacos para infección recientemente aislados y caracterizados de tejidos de animales, plantas y seres humanos, constituyen los péptidos catiónicos antimicrobianos. Se ha probado su actividad microbicida contra una gran variedad de microorganismos. Su composición de aa, carga positiva (dada por los residuos de arginina) y tamaño les permite unirse primero e insertarse después en las membranas biológicas formando poros.

La UBI es un péptido catiónico (PM 6648) lineal que se encuentra en baja concentración como primera línea de defensa en el interior de células epiteliales y en la mucosa del colon en seres humanos(xvii). Hiemstra et al. (xviii) identificaron, aislaron y caracterizaron la UBI de la fracción citosólica de macrófagos murinos activados con IFN- γ y mostraron que tiene actividad antimicrobiana contra *Lysteria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Posteriormente ha mostrado ser un microbicida de amplio espectro contra patógenos, que tiene una marcada actividad antimicrobiana contra *E.coli* y *S.aureus*. Existe evidencia de que sería una proteína catiónica murina equivalente a uno de los componentes del complejo calprotectina presente en la fracción citosólica de los neutrófilos humanos.

Recientemente la unión de un fragmento sintético específico radiomarcado del UBI (UBI 29-41) a varios tipos de bacterias y hongos(xix,xx) y la visualización de infecciones experimentales ha sido establecida.

El UBI 29-41 (PM 1693) es un péptido sintético antimicrobiano. Como se observa en la Fig. 4, presenta una estructura lineal formada por 13 aa, de los cuales 6 poseen residuos con carga positiva (5 argininas y una lisina) y uno con carga negativa (ácido glutámico). Esta particularidad le permite unirse a la membrana plasmática de las bacterias (que tienen densidad de carga negativa) y atravesarla para posteriormente unirse a moléculas del citosol del microorganismo.

Fig. 4. Estructuras lineal y desarrollada del UBI 29-41 (gentileza de M. Welling)



Debido a que el UBI 29-41 posee el grupo NH_2 libre de la lisina (posición 5 de la cadena peptídica) es posible conjugar en ese sitio BFCAs como ser NHS-S-acetil-MAG₃ o NHS-HYNIC para luego ser radiomarcados con ^{99m}Tc. De esa forma fue posible obtener los diferentes radiocomplejos para estudiar la influencia de los BFCAs y los métodos de marcación en su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, incluyendo los radiocomplejos de IgG para detección de sitios de inflamación estéril.

1.5 Radiofármacos de ^{188}Re de uso potencial en RIT de tumores y linfomas

Los radiofármacos para RIT serán exitosos si la dosis de radiación entregada al tejido enfermo (blanco) imparte un daño celular y si la dosis a los órganos no blanco (como ser médula ósea, hígado, riñones y estómago) es minimizada. Es decir que hay que maximizar la relación dosis órgano blanco / no blanco.

La orientación del desarrollo radiofarmacéutico ha sufrido un gran cambio, sustentado principalmente por avances producidos en el área de ingeniería genética aplicada a la producción de AcMos quiméricos y humanizados y en el descubrimiento de nuevos blancos moleculares presentes en células cancerosas.

Las dificultades que se presentan en este desarrollo son considerables dado que es necesario:

- i) Identificar un blanco molecular promisorio en células cancerosas
- ii) Diseñar moléculas que tengan alta afinidad por el antígeno y/o receptor blanco
- iii) Realizar la síntesis orgánica de diversos BFCAs apropiados para complejar el radionucleído seleccionado
- iv) Seleccionar el radionucleído en función de la Ae, pureza radioquímica, contaminantes metálicos, número de átomos de metal que pueden unirse por bioconjugado sin afectar la actividad biológica y la estabilidad *in vivo* del bioconjugado radiomarcado.
- v) Radiomarcas dichas moléculas con elevada Ae
- vi) Buscar que las características fisicoquímicas de la molécula le permitan llegar al sitio blanco en cantidad suficiente mostrando al mismo tiempo una mínima captación en tejido no blanco.
- vii) Compatibilizar estos criterios con la farmacocinética del bioconjugado que tiene que ver con el $t_{1/2}$ biológico en el tumor.

Teniendo en cuenta las dificultades antes mencionadas, por razones de disponibilidad y conveniencia para la realización de esta parte del trabajo de tesis se han seleccionado, de entre las potenciales biomoléculas IgG policlonal humana, AcMo 14F7 y AcMo anti-CD20, de entre los BFCAs S-Bz-MAG₃, de entre los radionucleídos terapéuticos ^{188}Re , optimizándose dos técnicas de marcación (directa e indirecta), haciéndose estudios de reconocimiento biológico *in vitro*, estudios de biodistribución en animales normales y tumorados y adquisición de imágenes en cámara γ .

El empleo de AcMos radiomarcados con ^{188}Re para terapia de tumores sólidos y LNH está siendo estudiado en varios centros de investigación. Pero la mayor expectativa está depositada en el tratamiento de LNH probablemente entre otras razones, debido a que los linfomas son radiosensitivos y a que en ellos las células cancerosas están relativamente accesibles al AcMo radiomarcado.

En cambio para la RIT de tumores sólidos, a pesar de que existen AcMos radiomarcados (xxi) que reconocen distintos TAAs (CEA, Tenascina, antígeno prostático, antígeno de cáncer de ovario, etc), la difícil accesibilidad al tumor permite que solo alrededor del 2% de la Ai se acumule en el mismo, implicando la administración de actividades elevadas para obtener dosis que tengan un efecto terapéutico considerable. La MTD para este tipo de radiofármacos de ^{188}Re no está limitada por la dosis recibida en médula ósea como es el caso de los radiofármacos de ^{90}Y , lo que significa una ventaja en cuanto a su potencial aplicación clínica.

1.6 Radiofármacos de ^{90}Y y ^{188}Re de uso potencial en PAGRIT® y en BIART®

El radiofármaco más utilizado clínicamente para tal fin ha sido ^{90}Y -DOTA-biotina. La ventaja de usar ^{90}Y como radionucleído está basada en la fácil y rápida radiomarcación (su complejación no requiere reducción previa ni purificación posterior) y en que el complejo formado con DOTA (xxii-xxiii) ha mostrado ser el más estable desde el punto de vista cinético y termodinámico para la unión al derivado de biotina, evitando su liberación *in vivo*. Una desventaja es que ^{90}Y es un emisor β - puro (no emite radiación γ) siendo imposible por tanto obtener imágenes de calidad en cámara γ (las obtenidas a través de la radiación de frenamiento son muy pobres) ni tampoco hacer estimaciones dosimétricas, para lo cual se emplea ^{111}In -DTPA-biotina (xxiv). Otra desventaja es su costo relativamente elevado y su disponibilidad limitada a consecuencia de no haber producción local de un generador de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ optimizado para uso clínico.

A pesar de no existir radiofármacos comerciales de ^{188}Re para estas dos técnicas, el uso potencial de un derivado de biotina radiomarcado con ^{188}Re con el grupo amido invertido desarrollado en este trabajo de tesis presenta algunas ventajas. Entre ellas la estabilidad *in vitro*, el reconocimiento biológico de avidina, la posibilidad de obtener imágenes en cámara γ y de hacer estudios dosimétricos utilizando la emisión γ de 154 KeV y la disponibilidad diaria si se posee un generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. La principal desventaja es el laborioso procedimiento de radiomarcación y purificación que insume a un profesional experimentado alrededor de 6 h.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección del radionucleído

2.1.1 Exclusión de ^{177}Lu y de parte del trabajo con ^{90}Y inicialmente propuestos en el Plan de Tesis

A pesar de que el ^{177}Lu posee condiciones físicas ideales para su uso en RIT y PAGRIT® ($E_{\beta\text{ max}} = 0.5 \text{ MeV}$; $E_{\gamma} = 208 \text{ KeV}$, 11 %) el empleo de un blanco natural (al 2.6 %) de ^{176}Lu y el limitado flujo de neutrones del RA-3 antes de su aumento de potencia, permitieron alcanzar una Ae de 3.47 GBq / mg de Lu (93.8 mCi / mg) insuficiente para la radiomarcación de biomoléculas de aplicación clínica, debido a que solo se encuentra presente ^{177}Lu en un 0.0000027 %. La Ae del producto comercial necesaria para marcar AcMo y péptidos es de 1665 GBq / mg (45 Ci / mg) es decir 480 veces mayor. Para alcanzar esa Ae, se debería irradiar por alrededor de 14 días un blanco de ^{176}Lu enriquecido al 74 % con un alto flujo de neutrones (ambos, blanco y flujo, inexistentes al momento de realizar la tesis). Lamentablemente solo hay en el mundo 2 reactores de alto flujo ($3 \cdot 10^{15} \text{ n / cm}^2 \cdot \text{seg.}$) capaces de alcanzar esa Ae con blancos naturales, el MURR (Columbia University, USA) y el RIAR (Federación Rusa). La baja Ae del ^{177}Lu insuficiente para obtener elevados rendimientos de marcación de DTPA-IgG (xxv) y para la aplicación clínica de cualquier producto, obligaron a excluir este radionucleído (inicialmente propuesto en el Plan de Tesis) del presente trabajo.

El ^{90}Y es actualmente el radionucleído más utilizado en RIT. El suscripto realizó gran parte de su entrenamiento en el IEO (período 1998-2001) radiomarcando derivados de biotina conjugados con DOTA con este radionucleído. Su utilización también fue propuesta inicialmente en el Plan de Tesis, pero debido a la imposibilidad de su producción con alta Ae en CNEA y su elevado costo (compra e importación desde Canadá) nunca pudo ser utilizado en nuestro Laboratorio, siendo excluido del trabajo propuesto a ser realizado en Argentina. Por ende se presentan solo los resultados obtenidos en el extranjero, que sirven de comparación con el derivado de biotina radiomarcado con ^{188}Re .

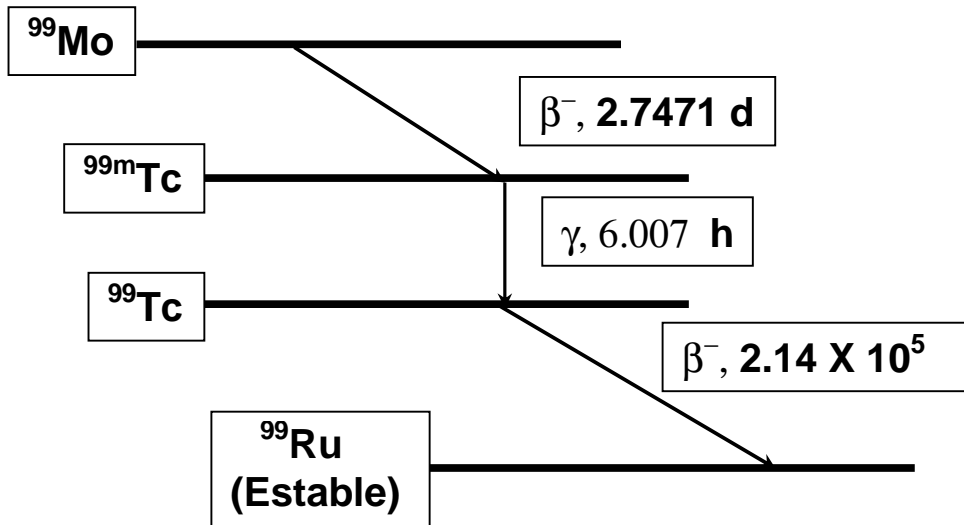
La condición más importante para la selección de los radionucleídos a utilizar fue la disponibilidad de los mismos cumpliendo con los requerimientos de Ae necesarios para su aplicación clínica diagnóstica y / o terapéutica. La idea original incluía ^{177}Lu e ^{90}Y pero las circunstancias enunciadas mas arriba, hicieron necesario excluir ambos radionucleídos del trabajo a realizar en Argentina y restringirlo solamente a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{188}Re .

2.1.2 Par $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{188}Re . Obtención a partir de generadores de ^{99}Mo / $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{188}W / ^{188}Re

2.1.2.1 Obtención a partir de generador de ^{99}Mo / $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

El ^{99}Mo ($T_{1/2} = 2.7471 \pm 0.0008 \text{ d}$) (xxvi) puede obtenerse por irradiación de Mo natural (o enriquecido en ^{98}Mo) con neutrones o por separación de los productos de fisión de uranio. Se transforma por decaimiento β^- (Fig. 5) en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2} = 6.007 \pm 0.012 \text{ h}$).

Fig.5. Esquema simplificado de decaimiento para ^{99}Mo

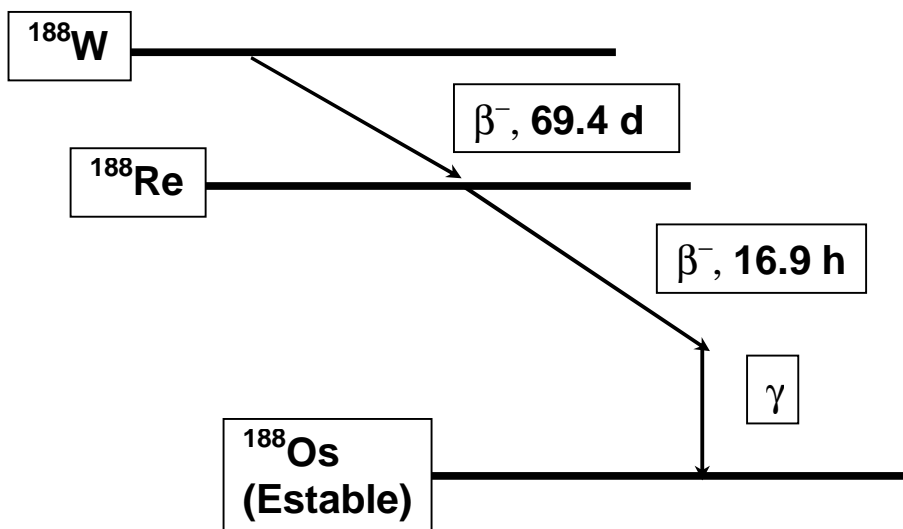


Dado que el $T_{1/2}$ del padre es alrededor de once veces mayor que el del hijo (condición de caída en equilibrio o equilibrio en tránsito), este sistema es aplicable a la construcción de un sistema generador, desarrollado originalmente en el BNL (USA) en 1965. Planteando la condición inicial ($t = 0$ h) en que solo hay presente ^{99}Mo y no hay $^{99\text{m}}\text{Tc}$, a $t = 22.87$ h se alcanza la actividad máxima de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Es decir que es posible obtener diariamente una elución fresca de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ con actividad máxima a partir de una masa de ^{99}Mo adsorbida en una columna de alúmina. Para una elución de 150 mCi (5.55 GBq) en 5 mL de SF esto equivale a una $[^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-] = 5.72 \times 10^{-8}$ M.

2.1.2.2 Obtención a partir de generador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.

El ^{188}W ($T_{1/2} = 69$ d) obtenido por irradiación de ^{186}W enriquecido en un reactor de alto flujo de neutrones (10^{15} n * seg / cm^2), es el radionucleído padre que por decaimiento β^- (Fig. 6) se transforma en ^{188}Re ($T_{1/2} = 16.98$ h).

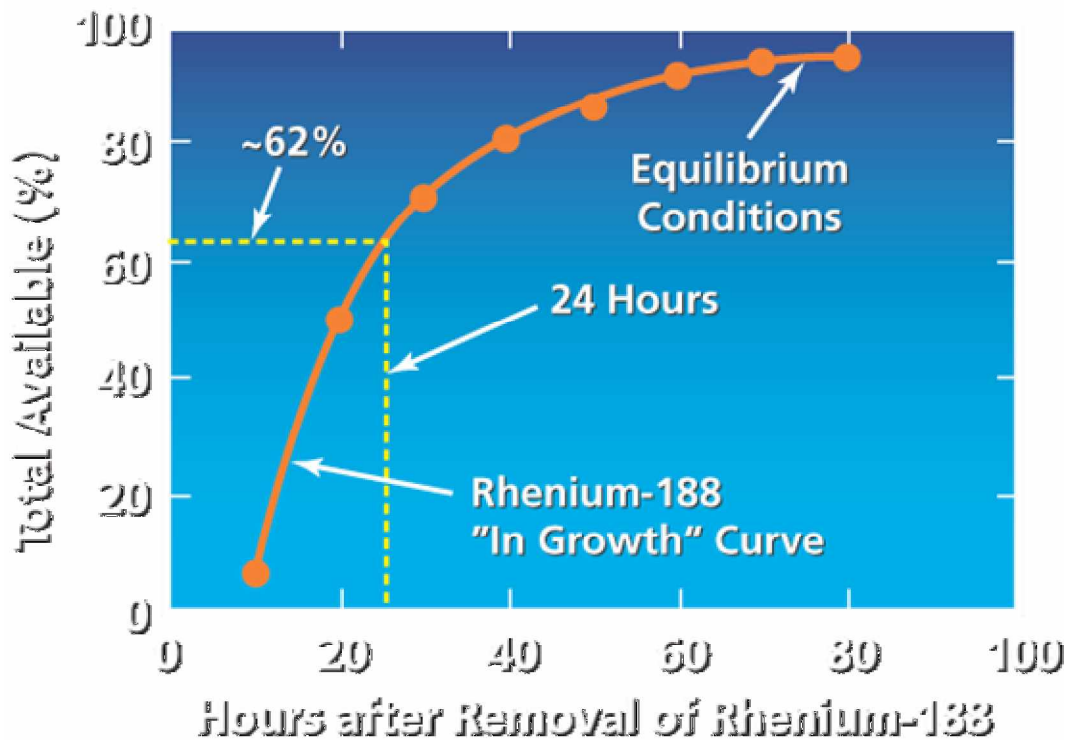
Fig. 6. Esquema simplificado de decaimiento para ^{188}W



En este caso el $T_{1/2}$ del padre es alrededor de 97 veces mayor que el del hijo, y por tanto también cumple con la condición de equilibrio en tránsito y puede construirse un sistema generador.

Si tomamos como condición inicial la ausencia de ^{188}Re a $t = 0$ podemos calcular que la actividad máxima de dicho radionucleído se alcanza a $t = 114$ h. Es decir que solo se puede diariamente un porcentaje de la actividad total (Fig. 7) del generador a diferencia de lo que sucede con el generador de $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$. El radionucleído es eluido bajo la forma química de anión tetraoxo (perrenato) que es la más estable en solución acuosa, siendo el estado de oxidación del metal en ese anión +7.

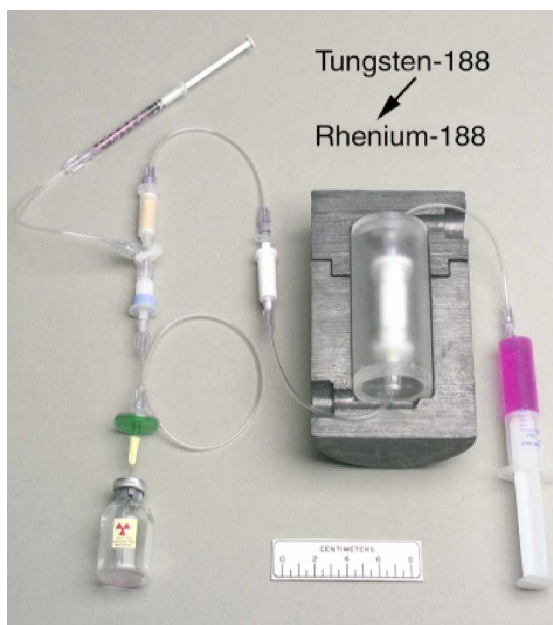
Fig. 7. Niveles de %A de ^{188}Re obtenidos por elución diaria (extraído de página web del ORNL)



2.1.3 Generalidades

El generador (Fig. 8) utilizado en el presente trabajo ORNL (USA) se produce a partir de ^{188}W que por diferentes procesos químicos es transformado primero en $^{188}\text{WO}_3$, luego en $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ y finalmente en $\text{H}_2^{188}\text{WO}_4$ forma química en la que es cargado y adsorbido en una columna de alúmina. Desde allí se eluye el $\text{Na}_2^{188}\text{ReO}_4$ con 10 mL de SF (flujo 1mL/min.) con un rendimiento del 70 % de la At de ^{188}W en equilibrio y un 50 % para eluciones diarias secuenciales. Para una elución de 150 mCi (5.55 GBq) la concentración de $^{188}\text{ReO}_4^-$ en el eluato es $8.11 \cdot 10^{-8}$ M. Se sobreentiende que para uso clínico la elución obtenida a la salida del generador debe ser estéril y libre de pirógenos.

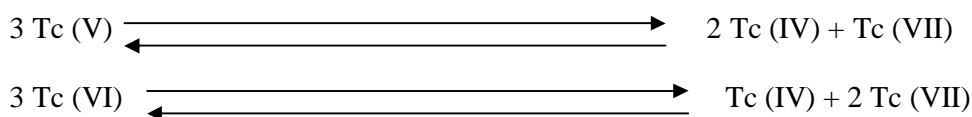
Fig. 8. Fotografía del corte longitudinal del generador ORNL (extraído de página web del ORNL)



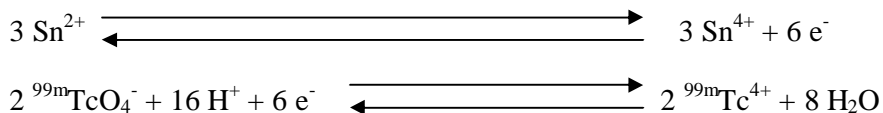
2.1.4 Química del Tc y del Re.

La baja concentración (nanomolar) de ^{99m}Tc en los compuestos marcados con este radionucleído, constituye un problema para la determinación de la química del Tecnecio. La mayor parte de la información se obtuvo del ^{99}Tc que está disponible en concentraciones de 10^{-4} M mediante espectrometría de masa, difracción de rayos x, cristalografía, etc.

Los estados de oxidación heptavalente (VII) y tetravalente (IV) son los más estables para el Tc. Las especies penta (V) y hexavalentes (VI) sufren desproporción formando mezclas de (IV) y (VII), por ej.



La preparación de agentes de uso diagnóstico y terapéutico depende en gran parte de la posibilidad de aplicar un procedimiento eficiente de reducción de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y de $^{188}\text{ReO}_4^-$ a un estado de oxidación inferior, seguida de la estabilización de esta nueva especie por unión a un quelante débil o de transferencia, antes de complejarse al BFCA. El reductor más ampliamente utilizado para tal fin es el $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, pero también se emplean exitosamente SnF_2 , KBH_4 y ditionito de sodio. En el primer caso se produce la siguiente reacción en medio ácido:



Otros estados de oxidación pueden favorecerse modificando el pH del medio, como ser el caso de $^{99m}\text{Tc(V)}$.

Cabe mencionar que para los radiofármacos de ^{188}Re es necesario agregar en la formulación, estabilizadores como el ácido ascórbico para prevenir la reoxidación inducida por radicales libres formados a partir de la radiólisis del agua.

Existe la posibilidad de que el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) reducido pueda sufrir hidrólisis en solución acuosa, reaccionando con agua para formar diversas especies dependiendo del pH por ej., $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$, $^{99\text{m}}\text{TcO}^{2+}$ y $^{99\text{m}}\text{TcOOH}^+$. El uso de $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ presenta como desventaja que sufre hidrólisis fácilmente en solución acuosa a pH 6-7 (para evitarla se debe acidificar la solución) dando coloide insoluble, el cual se une al $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) reducido.

En la preparación de un compuesto marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re), el radionucleído puede estar presente en tres formas: i) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) "libre" bajo la forma química de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($^{188}\text{ReO}_4^-$) que no ha sido reducido por el Sn^{2+} cuya biodistribución se menciona en 2.1.6; ii) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) reducido-hidrolizado comunmente llamado "coloide", presente como $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ($^{188}\text{ReO}_2$) y que comprende también al $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) unido al Sn^{2+} hidrolizado que se concentra en hígado, bazo y en el sistema retículo endotelial de la médula ósea; iii) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) "unido", es decir el que esta en el complejo formado entre el quelante y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) reducido. Obviamente la formación de i) y ii) compite con el proceso de quelación disminuyendo el rendimiento de marcación e interfiriendo con el estudio diagnóstico o terapéutico por tener distinta biodistribución que iii).

Tc y Re son metales del Grupo VIIA de la tabla periódica y su pertenencia al mismo sugiere que sus propiedades químicas serán similares. Este hecho ha sido usado efectivamente en la síntesis de nuevos complejos de Re, basados en los desarrollados para química del Tc, ampliamente utilizados como agentes de diagnóstico en Medicina Nuclear. Complejos análogos de Tc y Re tienen las mismas propiedades físicas (tamaño, radio casi idéntico, forma, carga, momento bipolar, lipofilicidad, etc.). Sin embargo, medidas de biodistribución de ciertos complejos análogos $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$, determinadas cuantitativamente para ambos isótopos usando las emisiones de los rayos γ demuestran que pueden exhibir diferente distribución *in vivo*. Las diferencias observadas pueden ser explicadas por las diferencias en las propiedades químicas entre los dos elementos. La más relevante es que los complejos de Re son más difíciles de reducir que sus análogos de Tc, diferencia que va de 100 a 300 mV y es independiente del estado de oxidación del metal. Además, los complejos de Re son más estables termodinámicamente en sus estados de oxidación elevados que sus análogos de Tc. Esta diferencia en las propiedades redox se manifiesta en un diferente comportamiento *in vivo*. Radiofármacos de Re son más fácilmente reoxidados a perrenato *in vivo* que sus análogos radiomarcados con Tc a pertecnetato. Es ésta reoxidación *in vivo* la que altera la biodistribución del agente y la captación del anión perrenato es vista en órganos no blanco como ser tiroides y estómago. La diferencia en las propiedades redox, hace que la reducción del Re (VII) a un estado de oxidación inferior (paso previo a su complejación) requiera una cantidad de agente reductor (SnCl_2) cientos de veces mayor que la reducción del Tc (VII) y condiciones de marcación más drásticas como ser calentamiento.

2.1.5 Determinación de impurezas radioquímicas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{188}Re .

Diferentes parámetros pueden afectar la pureza radioquímica de los radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (^{188}Re) entre otras las características del eluato, el pH final de la marcación y la composición de los kits, siendo necesario su control mediante distintas técnicas separativas (ITLC y HPLC). Por ejemplo debido al decaimiento y a las características de equilibrio del ^{99}Mo y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, el número de átomos de Tc por MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ puede variar un factor de 20, dependiendo del momento de elusión del generador

y de la edad del eluato. 37 MBq (1 mCi) corresponden a $1.2 \cdot 10^{12}$ átomos de ^{99m}Tc que están acompañados por $1.14 \cdot 10^{12}$ o $1.52 \cdot 10^{13}$ átomos de ^{99}Tc si el generador es eluido a 1 o 72 h después de la última elución y es un factor de 2 más elevado si el eluato es usado 6 h post elución. Esto hace que la relación quelante :Tc y Sn (II) :Tc pueda variar en un factor de 1000. El defecto de Sn (II) ocasiona pertechnetato (perrenato) libre como impureza radioquímica por la reducción incompleta del Tc (Re) y el exceso de Sn (II) produce Tc (Re) reducido-hidrolizado (en forma coloidal), lo cual implica que la concentración de Sn(II) debe ser optimizada en cada método de marcación. Ambas impurezas pueden separarse fácilmente por ITLC (xxvii). Usando SF como solvente de corrida, el coloide permanece en el sitio de siembra mientras que el radionucleído libre y el radionucleído unido a un ligando (por ejemplo MDP) se mueven con el frente de corrida. Usando MEC como solvente de corrida, tanto el radionucleído en forma coloidal como el unido a un ligando permanecen en el sitio de siembra mientras que el radionucleído libre corre con el frente.

Para la cuantificación del coloide se hace una corrida en ITLC embebida en albúmina al 5 % con una mezcla de solvente de corrida de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$. En este sistema el coloide permanece en el sitio de siembra, mientras que todas las demás impurezas a saber radionucleído libre y unido a ligando corren con el frente.

En el caso de GPC-HPLC se puede separar proteína radiomarcada del radionucleído libre por diferencia en el tiempo de retención de la columna, que es de aproximadamente 7.8 y 13.5 min. respectivamente. El coloide se determina calculando el porcentaje de recupero de la columna, dado que este queda retenido en la misma. En el caso de RP-HPLC usando como fase móvil un gradiente de solvente con polaridad decreciente, se puede separar radionucleído libre (más polar) de péptido radiomarcado (menos polar) aprovechando la diferencia de polaridad entre ambos y determinar coloide calculando el porcentaje de recupero.

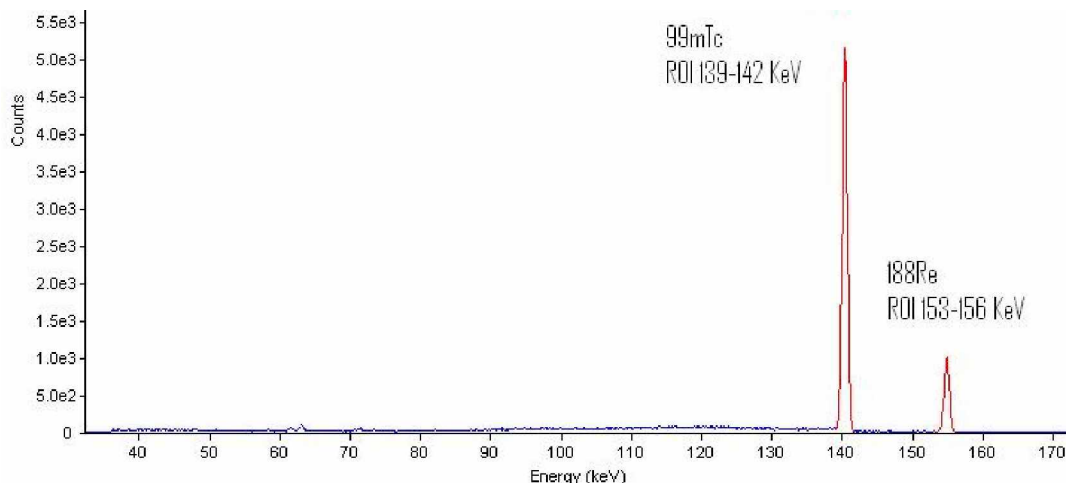
2.1.6 Biodistribución dual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 y 2 h p.i. usando un detector de germanio hiperpuro

Como se mencionó anteriormente (2.1.4) la reoxidación *in vivo* de los complejos de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ puede llegar hasta el máximo estado de oxidación (VII) que se da en la forma química $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$. Su biodistribución simultánea en un mismo animal y su cuantificación dual a través de un detector de alta resolución en energía, no solo permite una comparación más precisa de la acumulación de cada radionucleído en los distintos órganos en función del tiempo, sino que sirve como parámetro base para estimar la inestabilidad *in vivo* de complejos de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$, obviamente para los casos cuando el radionucleído no solo se libera del complejo sino que además es reoxidado al estado VII como a veces ocurre. Por tal motivo se realizaron biodistribuciones en ratones normales NIH, (aprox. 25-30 g de peso) inyectándose por la vena de la cola 45 μl de una solución conteniendo 0,185 MBq (5 μCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y 0,185 MBq (5 μCi) de $^{188}\text{ReO}_4^-$. Se midió la actividad de la jeringa pre y post-inyección, con el propósito de conocer la dosis inyectada en cada ratón. A 1 y 2 h post inyección dos animales fueron sacrificados y se prosiguió según 2.6.5.1. Los resultados fueron expresados como % D.I. / g de tejido. Con los resultados obtenidos se realizaron 4 test apareados para ver si existían diferencias significativas entre la captación de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ en estómago a 1 h p.i., en tiroides a 1 h p.i., en estómago a 2 h p.i. y en tiroides a 2 h p.i.

El procedimiento de medición dual de actividad se realizó en un sistema compuesto por un fotodetector de estado sólido coaxial de germanio ultrapuro (Gem30, Ortec) y un espectrómetro digital para rayos gamma (DSPEC, Ortec) con programa GammaVision for Windows v. 6.01 (Ortec). La resolución (FWHM) en energía de este detector 0.73

KeV permitió cuantificar simultáneamente la actividad neta (CPM) correspondiente al ^{99m}Tc ($E_{\text{max}} = 140.5 \text{ KeV}$) en una ventana de energía de 139-142 KeV y la actividad neta del ^{188}Re ($E_{\text{max}} = 155.0 \text{ KeV}$) en otra ventana de 153-156 KeV, sin que haya superposición entre los espectros de ambos del radionucleídos como se aprecia en la Fig. 9.

Fig. 9. Espectro de emisión de una mezcla de ^{99m}Tc y ^{188}Re , en escala lineal de CPM versus energía del fotón gamma (KeV).



La cuantificación simultánea de dos radionucleídos emisores gamma con picos de máxima emisión de energía tan cercanos es imposible de realizar con un detector gamma con cristal de INa(Tl) como el usado en otras determinaciones de biodistribución para un único radionucleído, dado que su baja resolución en energía no permite la cuantificación por superposición de los espectros de cada radionucleído. Esta misma limitación impide la adquisición de imágenes duales de ^{99m}Tc y ^{188}Re en cámara gamma.

2.2 Agentes quelantes utilizados en el diseño de radiofármacos de ^{99m}Tc y ^{188}Re de alta actividad específica

2.2.1 Requerimientos

Las condiciones que deben cumplir los agentes quelantes son las siguientes

- Rápida y eficiente marcación con elevada Ae.
- Alta estabilidad de la unión radionucleído-BFCA-biomolécula bajo condiciones fisiológicas.
- Preservación de la actividad biológica de la biomolécula después de la conjugación y marcación.
- Adecuada biodistribución preferentemente con excreción renal (BFCA hidrofílicos).
- Baja unión a proteínas de suero humano (rápida depuración sanguínea).

2.2.2 Quelantes para Tc:

La formación de complejos con Tc(I) (isonitros, tricarbonilos), Tc(III) (mezcla de ligandos, BATOs), Tc(V)-oxo (nitrido, difosfinas, aminooximas, hidrazino) y Tc(V)-dioxo se produce con compuestos que poseen grupos funcionales carboxilo, amino,

mercapto, hidroxilo, fosfato e isonitrilo que poseen una estructura molecular adecuada para favorecer uniones de coordinación entre el metal y el agente quelante en forma estable. Este último punto es de mayor importancia dado que el complejo formado debe ser lo suficientemente inerte para impedir la reoxidación del Tc *in vivo*. Avanzando hacia las estrategias de marcación se observa la utilidad de los BFCAs que permiten por un lado unirse a una biomolécula y por otro complejar el radionucleído con alta Ae. Desafortunadamente, relativamente pocos quelantes han mostrado efectividad para la preparación de compuestos de Tc de alto rendimiento de marcación usando pequeñas cantidades de ellos (< 50 μ moles). Los más empleados son cDTPA, NHS-DTPA, NHS-S-acetil-MAG₃ (xxviii), tiolactona de DADT (Ae = 0.5 Ci/ μ mol), NHS-HYNIC (Ae = 3 Ci/ μ mol) y diversos ésteres activos de compuestos tetradentados con el core N₃S como ser TFP-SBz-MAG₃ (Ae = 3.3 Ci/ μ mol) y con el core N₂S₂, N₃P y N₂P₂. La presencia del grupo tiol en el core del quelante promueve alta estabilidad y rápida cinética de formación de complejos con Tc(V)-oxo por marcación directa usando Sn(II) o por transquelación usando [^{99m}TcO(V)-(glucoheptanato)₂] (xxix) o ^{99m}TcO(V)-MDP. El ligando ^{99m}Tc(V)-oxo [^{99m}Tc=O]³⁺ forma el core más común para agentes de diagnóstico. Los coligandos que rodean este core determinan la biodistribución, estabilidad y geometría del complejo, que en la mayoría de los casos es cuadrado-piramidal con el oxígeno en la posición axial. También existe el core ^{99m}Tc(V)-dioxo [^{99m}TcO₂]⁺ que forma complejos hexa-coordinados y el core hidrazido-Tecnecio que se forma con HYNIC (quelante monodentado) donde se forma una unión Tc=N y los sitios vacantes de la esfera de coordinación del Tc son completados con diferentes coligandos (EDDA que es tetradentado o tricina) resultando un complejo estable. Modificaciones en el tipo de coligando utilizado permiten cambiar algunas de las propiedades del complejo.

2.2.3 Quelantes para Re

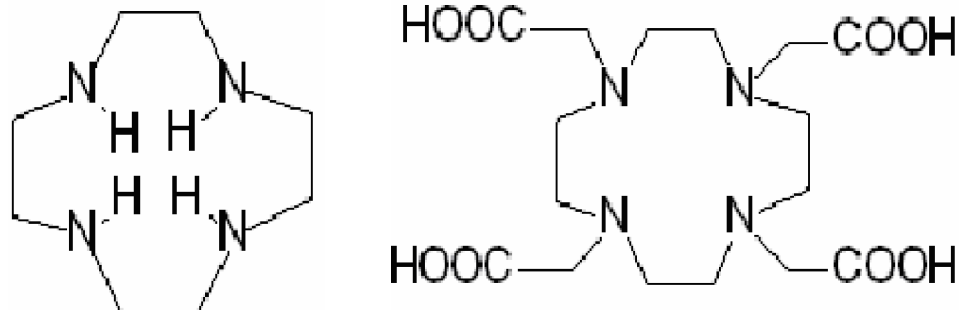
De todos los mencionados anteriormente el S-Bz-MAG₃, quelante tetradentado con el core N₃S y con el azufre protegido por un grupo bencilo (que forma [¹⁸⁸Re(V)O(MAG₃)]²⁻ de estructura cuadrada piramidal), el MAG₂GABA (xxx) y algunos otros quelantes del tipo N₃S han mostrado capacidad para unirse al [¹⁸⁸Re=O]³⁺ con alto rendimiento de marcación y elevadas Ae y estabilidad. Debido a las dificultades en la reducción de Re (VII) a Re (V) previamente a la reducción para obtener el complejo deseado se forma un intermediario como el ¹⁸⁸Re-citrato. El tetrafluorofenil-éster del ¹⁸⁸Re(V)O(MAG₃) tiene capacidad para conjugarse a AcMos a través de la acilación del grupo amino de las lisinas.

Algunos investigadores han aplicado la tecnología HYNIC para la marcación con Re (xxxi) usando tricina y diferentes clases de fosfinas solubles en agua como coligandos, pero las condiciones de reacción a saber 2h de calentamiento a 100 °C hacen imposible su aplicación a la marcación de AcMos.

2.2.4 Quelantes para Y

Los compuestos macrocíclicos multidentados poseen la capacidad de quelar metales de transición y otros iones metálicos. Entre los que poseen cuatro átomos de nitrógeno se destacan (Fig. 10) el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (ciclen) y su correspondiente ácido 1,4,7,10,-tetraazaciclododecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético

Fig. 10. Se representan las estructuras de los quelantes ciclen (izquierda) y DOTA (derecha)



(DOTA) (xxxii, xxxiii) que presenta gran importancia por la capacidad complejante de sales In(III) e Y(III). Específicamente la estabilidad del complejo ^{90}Y -DOTA en condiciones fisiológicas resulta muy elevada. Sin embargo para actuar como BFCA y poder unirse a biomoléculas con grupos amino libres, este quelante tiene que ser activado en uno de sus ácidos carboxílicos con N-hidroxi-succinimida dando NHS-DOTA. Mas recientemente fue sintetizado *p*-nitrobencil-DOTA un derivado con el grupo 2-(*p*-nitrobencil) unido a la cadena carbonada.

2.3 Métodos de radiomarcación de biomoléculas

2.3.1 Métodos directos

Proteínas y péptidos son fácilmente radiomarcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{188}Re usando Sn(II) para reducir pertecnato y perrenato, si hay disponibles sitios de unión apropiados. El grupo tiol de la cisteína forma un complejo estable con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y con ^{188}Re reducidos en los llamados métodos directos. Constan de dos pasos secuenciales: la reducción de los grupos disulfuro endógenos de la proteína o péptido mediante un agente reductor y el uso de un ligando débil (como ser MDP o tartrato de sodio) que actúa como agente transquelante del radionucleído reducido a los grupos sulfhidrilos producidos (xxxiv'xxxv'xxxvi). Normalmente, cuando se utilizan 2-ME y DTT como agentes reductores es necesario un paso de purificación posterior para separar el exceso de agente reductor de la proteína reducida.

Sykes et al (xxxvii) han desarrollado un método de reducción por fotoactivación basado en la irradiación de anticuerpos con luz UV con el objeto de reducir los puentes disulfuro. La ventaja de este método consiste en que no es necesario el paso de purificación, ya que el agente reductor se elimina interrumpiendo la irradiación.

2.3.2 Métodos indirectos

2.3.2.1 Técnica del quelante premarcado o marcación pre-conjugación:

En ésta técnica el radionucleído reducido (por ejemplo ^{188}Re o $^{99\text{m}}\text{Tc}$) es complejoado por un BFCA como ser S-Bz-MAG₃ y luego de ser esterificado, se conjuga a la biomolécula.

2.3.2.2 Técnica de marcación post-conjugación:

En ésta técnica el BFCA (NHS-S-acetil-MAG₃ o NHS-HYNIC) es previamente conjugado a la biomolécula obteniéndose según el caso MAG₃-IgG, MAG₃-UBI 29-41 o HYNIC-UBI 29-41 que posteriormente es radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reducido formando complejos estables (xxxviii, xxxix).

2.4 IgG policlonal humana radiomarcada con ^{99m}Tc por métodos directos

El propósito de esta parte del trabajo fue la marcación de IgG con ^{99m}Tc usando el método de fotoactivación y evaluar el comportamiento radioquímico y biológico del producto radiomarcado y compararlo con el método de reducción química con 2-ME también llamado método de Schwarz (xl), el cual fue aplicado en forma de kit instantáneo liofilizado, apirógeno y estéril.

Todas las radiomarcaciones que figuran en el presente trabajo de tesis fueron realizadas en cumplimiento de la normativa vigente de la ARN para el manejo de material radioactivo, monitoreo dosimétrico personal y gestión de residuos, en el ámbito del Laboratorio de Radiofarmacia (instalación de clase III con licencia de operación específica para docencia e investigación) incluyendo el permiso individual para el manejo de emisores gamma y beta negativo.

2.4.1 Optimización de la marcación de IgG por reducción de puentes disulfuro usando 2-ME y DTT.

2.4.1.1 Preparación de la columna de Sephadex G-50 para purificación de la IgG reducida

El relleno hidratado suspendido en solución acuosa contenido en un kitasato con agitación magnética fue degaseado durante 15 min. haciendo vacío con una bomba para tal fin. De esta forma se evita la formación de burbujas en la columna. La suspensión del relleno se vierte gota a gota lentamente en la columna y una vez asentado para equilibrarlo se hace pasar buffer fosfato 10 mM pH 5.8 purgado con N_2 , en un volumen equivalente a 4 veces el volumen de la columna. Se determina el volumen muerto de la columna rellena sembrando 50 μL de azul dextrano, agregando solvente y midiendo en un tubo graduado el solvente colectado hasta que eluye la primera gota de color azulado.

2.4.1.2 Reducción de la IgG, purificación de la IgG reducida y medición de absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS

Dado que se obtuvieron resultados poco reproducibles cuando se utilizó DTT como agente reductor (resultados no publicados en esta tesis) se tomó la decisión de emplear 2-ME. Se utilizó IgG (Sandoz) de concentración inicial 30 mg/ml la cual fue reducida con 2-ME a relaciones molares (1000 : 1 y 500 : 1, 2-ME : IgG). Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se purificó a través de una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia, Sweden) de 10 x 1 cm preparada como se indica en 2.4.1.1. Se tomaron fracciones de 1 ml, se midió la concentración de diluciones correspondientes a las fracciones colectadas en un espectrofotómetro U-2001 UV/VIS (Hitachi, Japón) a 280 nm (longitud de onda de absorbancia del aa Trp presente en proteínas) y se mezclaron las de mayor concentración determinándose la concentración final y el rendimiento obtenidos.

2.4.1.3 Marcación de IgG reducida purificada con ^{99m}Tc

Se reconstituyó un kit de reactivos conteniendo 1mg de MDP y 68 μg de SnCl_2 por mL y se agregaron distintos volúmenes del mismo por cada mg de proteína reducida. Se fraccionó esta mezcla en alícuotas de 1 mg de IgG reducida. Se liofilizaron los viales y se guardaron a 4 °C hasta su utilización. Cada vez que fue necesario se marcó un kit liofilizado con 187 MBq (5 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en un volumen de 1-2 ml y se incubó durante 10 min.

2.4.2 Optimización de la marcación de IgG por fotoactivación con radiación UV.

Se llevaron a cabo experiencias con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de marcación de IgG con ^{99m}Tc . Se usó un reactor fotoquímico Rayonet RMR 3000 (Southern New England Ultraviolet Company, Connecticut) con ocho lámparas UV gentilmente provisto por Stephen Mather (St. Bartolomew's Hospital, Londres, Reino Unido).

100 μl de una solución de IgG (5mg/ml) en PBS 50mM pH 7 se inyectaron dentro de un vial de 10 ml y se purgaron con N_2 gaseoso. Una solución fresca conteniendo SnF_2 (18 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) y MDP fue purgada con nitrógeno por 10 min. y 100 μl de esta solución fueron inyectados dentro del vial conteniendo la proteína. El vial fue irradiado por 20 min. en el reactor fotoquímico. 100 μl (555 MBq) de Pertecnetato [^{99m}Tc] de sodio (CNEA, Argentina) fueron adicionados al vial y la solución fue incubada por 30 min. a temperatura ambiente.

Diferentes parámetros de la reacción de marcación fueron evaluados como ser: a) relación de estaño, b) concentración de proteína y c) efecto del almacenamiento sobre la eficiencia de marcación. Una irradiación en batch fue realizada en un vial conteniendo 10 mg de IgG (10mg/ml) y 2 ml de una solución de MDP/ estaño (43 μg de Sn /mg de proteína). Una alícuota fue inmediatamente radiomarcada con el radionucleído y las otras alícuotas fueron almacenadas a -20°C y -70°C y radiomarcadas a diferentes intervalos de tiempo.

2.4.3 Determinación de los rendimientos de marcación por GPC-HPLC e ITLC-SG

Los mismos fueron realizados en un HPLC (Waters 486) equipado con un detector radiométrico (cristal de NaI(Tl) con espectrómetro integrador) y un detector UV monocanal (con $\lambda = 280\text{nm}$), usando una columna SW300 (permeación de geles). Como solvente de corrida se usó PBS 10 mM pH 7.4 degaseado y filtrado con un filtro de poro de 0.22 μm . El porcentaje de recupero fue rutinariamente determinado.

También fueron determinados por ITLC-SG, usando tiras de 1.5x15 cm. Se sembró en cada una de ellas alrededor de 4 μl de muestra en la línea de base, y luego de 5 min. se corrieron en cubas de cromatografía conteniendo SF y MEC como solvente. Finalizada la corrida, se dejó secar las tiras, se las cortó en 2 mitades (siembra y frente), se las colocó en tubos de hemólisis y se midió su actividad en un contador gamma automático (Cobra II, Packard) durante 1 min. con una ventana de 40% centrada en $E = 140 \text{ KeV}$. La actividad en la línea de base (correspondiente a ^{99m}Tc -IgG) y en el frente (correspondiente a ^{99m}Tc libre) se expresó como porcentaje de la actividad total.

En SF los Rf son respectivamente 0.0 para ^{99m}Tc -IgG y ^{99m}Tc coloidal y 1.0 para ^{99m}Tc libre y ^{99m}Tc -MDP. En MEC, Rf = 0.0 para ^{99m}Tc -IgG, ^{99m}Tc -MDP y para ^{99m}Tc -coloidal y Rf = 1.0 para ^{99m}Tc libre. En $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$ (3:1:5) para tiras previamente embebidas en solución de Albúmina humana al 0.5%, los Rfs son 0.0 para ^{99m}Tc -coloidal y Rf 1.0 para el resto de las impurezas y el compuesto radiomarcado.

2.4.4 Ensayo de competencia con cisteína

La transquelación con cisteína fue hecha a diferentes concentraciones de cisteína 1000, 500, 50, 5 y 0.5 μM . Cada uno de los tres radiocomplejos fue enfrentado con cisteína a diferentes relaciones molares cisteína: complejo (5:1 a 500:1). Para ello alícuotas de cada complejo fueron llevadas a $c = 2.2 \mu\text{M}$ (dilución 1:50) en PBS 0.2 M pH 7.2 y posteriormente fueron preparadas soluciones de cisteína ($c = 10 \text{ mg / ml}$) y sus

correspondientes diluciones. La incubación fue realizada por 1h a 37 ° C. El porcentaje de disociación o de ^{99m}Tc transquelado a la cisteína fue determinado por ITLC-SG en SF.

2.4.5 Biodistribución de ^{99m}Tc -IgG en ratones portadores de un sitio de inflamación a 4 y 24 h p.i.

Se utilizaron ratones Balb/c, de aproximadamente 25 g de peso, a los que se les produjo un proceso inflamatorio de 48 h con 50 μl de trementina en la pata posterior izquierda.

Los animales fueron divididos en dos grupos, inyectándose vía endovenosa 100 μl (50 μCi) de ^{99m}Tc -IgG (kit liofilizado) y de ^{99m}Tc -IgG fotoactivada a cada grupo respectivamente. En todos los casos se midió la actividad de la jeringa pre y post-inyección, con el propósito de conocer la dosis inyectada por ratón. Pasadas 4 y 24 h post i.v. cinco animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical (previamente anestesiados con pentobarbital), tomándose por punción cardíaca muestras de sangre y separando en tubos prepesados hígado, bazo riñones, intestinos, pulmones, pata normal y pata inflamada. Los tubos fueron pesados nuevamente, para conocer el peso del órgano y sus actividades fueron medidas en un contador γ automático (Cobra II, Packard) junto con un estandar de aproximadamente la misma actividad que la inyectada de ^{99m}Tc -IgG. La actividad medida en cada tejido fue normalizada por la actividad total inyectada en cada ratón (% A.I.) y referida por masa de tejido (% A.I. / g de tejido). La media del % A.I. / g y la desviación estandar de cada tejido fueron calculadas para cada grupo de animales. Un grupo de cuatro ratones normales Balb/c fue inyectados i.v. con 100 μl de cada ^{99m}Tc -IgG y cada ratón fue contado dentro de una cámara de ionización durante 4-5 h a intervalos de 1 h. Se asume que la disminución de la actividad de cuerpo entero que no es debida al decaimiento físico es debida a la excreción urinaria.

2.4.6 Cálculo del tiempo de residencia en sangre

Se asume que la A_0 en sangre es igual a la A_{iny} a tiempo 0 h, que la densidad de la sangre es de 1.06 g /ml y que el volumen sanguíneo total para ratones de 25 g es de 95 ml / Kg (xli). De esta forma la masa total de sangre en un ratón de 25 g es de 2.5175 g. La función $A(t)$ fue aproximada por una función exponencial negativa $a \cdot e^{-b \cdot t}$ usando el programa CurveExpert 1.3 a partir de A a tiempo 0, 4 y 24 h y A a tiempo 0, 1 y 2 h obtenidos de los resultados de biodistribución en ratones de ^{99m}Tc -IgG y de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ respectivamente. También se calculó el τ en sangre de ^{99m}Tc -MAG₃-IgG a partir de resultados de su biodistribución obtenidos en nuestro laboratorio.

La integral de $A(t)$ en sangre entre 0 e infinito se calculó como a/b . Luego dividiendo ese valor por A_0 se obtuvo el τ en sangre.

Reemplazando en el procedimiento anterior los valores de $A(t)$ por $A(t) +$ desviación estándar ($n = 5$) y $A(t) -$ desviación estándar, salvo para el caso de $t = 0$ h en el que se asume no hay error, se obtuvieron los valores correspondientes a τ máximo y τ mínimo. Finalmente el error de τ en sangre se expresó como la mitad de la diferencia entre estos dos últimos valores de τ .

2.4.7 Adquisición de imágenes en cámara γ

Se utilizó una cámara gamma rotatoria Orbiter (Siemens) con colimador LEHR. La ventana de energía fue centrada en 140 KeV, con un ancho de 15 %. Se adquirieron 300.000 cuentas sobre una matriz de 256*256 pixels y zoom de 2.5. Se dibujaron ROIs

sobre la pata inflamada (PI) (área de mayor actividad) y en el área contralateral homóloga (PN). Se calcularon las relaciones PI/PN utilizando el programa de procesamiento de imágenes IM512P (Alfanuclear).

2.5 UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc por métodos directos e indirectos

2.5.1 Método con KBH_4

Se agregaron 10 μl de una solución de UBI 29-41 (aprox. 17 μg) o Sc UBI 29-41 (1mM en ácido acético 0.01M pH 4) a 2 μl de una solución de pirofosfato de estaño (0.5 mg/ml) seguido de 4 μl de una solución de KBH_4 (10 mg/ml HONa). Finalmente se agregó el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y la mezcla (pH 5-6) fue agitada suavemente a temperatura ambiente durante 15 min.

2.5.2 Método con NaOH pH 10

Se agregaron 10 μl de una solución 1mM de UBI 29-41 (aprox. 17 μg) en SF a 2 μl de una solución recién preparada de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1mg/ml en HCl 10mM) seguido de 5 μl de HONa 0.1M. Después de la adición de 0.1ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ la mezcla (pH 8) se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 15 min.

Se protegieron 5 mg de UBI 29-41 y 5 mg de Sc UBI 29-41 disueltos en 100 μL de SF con 1,3 mg de t-BOC (PM 218,2) disueltos en 25 μL de DMF anhidro respectivamente (relación molar 1:1) y se incubó la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se purificaron los t-BOC-péptidos por cartucho Sep-Pak C18 según lo descrito en 2.5.4, obteniéndose en 2 mL de una solución de etanol al 85 % en SF. Se evaporó el etanol bajo corriente de nitrógeno y luego se diluyeron 1:15 con SF.

Se realizó una marcación de 10 μL de la solución diluída de t-BOC-UBI 29-41 (aprox. 10 μg) y 10 μL de la solución diluída de t-BOC-Sc UBI 29-41 (aprox. 10 μg) siguiendo las condiciones descritas mas arriba, de forma tal de corroborar experimentalmente la hipótesis de que la formación del complejo con ^{99m}Tc necesita del NH_2 de la Lys y que si este grupo está protegido no puede producirse la complejación.

2.5.3 Conjugación de NHS-S-acetil-MAG₃ y posterior marcación

Una solución de NHS-S-acetil-MAG₃ (generosamente provisto por Donald Hnatowich, UMMC) (xlii) (40 mg/ml en DMF) se agregó gota a gota con agitación a una solución de UBI 29-41 en HEPES 0.1M pH 8:0 (relación molar quelante / péptido 3:1). Después de 30 min. de incubación, el péptido conjugado fue purificado en una columna de Sephadex G-15 eluída con 0.25 M buffer acetato de amonio pH 5.2. Se colectaron fracciones y se midió la absorbancia a 280nm (espectrofotómetro U-2001, UV/VIS, Hitachi). 200 μl de la solución de MAG₃-UBI 29-41 se mezclaron con 40 μl de un buffer consistente en una solución de 50mg/ml de tartrato de sodio en bicarbonato 0.5M, 0.25 M acetato amonio y 0.18M de hidróxido de amonio a pH 9.2. Finalmente se agregó 0.1ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y 5 μl de una solución recién preparada de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1mg/ml HCl 10mM). El tiempo de incubación fue de 30 min. a temperatura ambiente. Se realizó una marcación inespecífica con UBI 29-41 sin conjugar con el quelante, manteniendo el resto de las condiciones de marcación constantes, de forma tal de evaluar que porcentaje de actividad del radionucleído se unía al péptido (blanco de marcación).

2.5.4 Determinación de la pureza radioquímica por RP-HPLC e ITLC-SG

^{99m}Tc -UBI 29-41 y ^{99m}Tc -Sc-UBI 29-41 se analizaron mediante un HPLC asociado a un detector radiométrico bajo las condiciones mencionadas en 2.1.3, pero usando una columna de fase reversa C18 Delta Pack. El gradiente utilizado fue: 0% B por 3 min., 0-100% B en 10 min., 100% B por 5 min., 100-0% B en 5 min., 0% B por 5 min. Solvente A (agua / TFA 0.1%) y solvente B (agua / TFA 0.1%- acetonitrilo 40:60) a un flujo de 1ml/min. El porcentaje de recupero fue medido con el objeto de calcular la eficiencia de marcación. Previamente se realizó una inyección y posterior corrida en HPLC de una solución concentrada de UBI 29-41 para registrar el RT en un detector de arreglo de diodos, prestando particular atención a la absorbancia a 274 nm (longitud de onda asociada a la absorbancia del aa Tyr, presente en la posición 10 de la cadena peptídica).

Para la determinación con ITLC-SG, se aplicó la metodología descrita en 2.4.3 usando SF como solvente de corrida. La actividad en la línea de base (correspondiente al péptido radiomarcado) y en el frente (correspondiente a tecnecio libre) se expresó como porcentaje de la actividad total.

Se determinó el porcentaje de coloide en los péptidos radiomarcados usando cartucho C18. El procedimiento empleado consistió en: i) Activación con 5mL de etanol al 85 % en SF, 5mL de agua bidestilada y 5mL de ácido acético 0.1% respectivamente. ii) Remoción del exceso de solvente haciendo pasar 10 mL de aire con una jeringa. iii) Inyección de 50ul de ^{99m}Tc -UBI 29-41 o ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 según corresponda. En la primera elución con 5mL de agua bidestilada, se eluye el ^{99m}Tc libre y en la segunda elución con 5mL de etanol (85 %) en fracciones de 1 mL, se eluye el péptido radiomarcado permaneciendo el coloide de ^{99m}Tc en el cartucho. Se mide la actividad inicial en el cartucho, la de las fracciones eluidas y la remanente del Sep-Pak C18. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad total.

2.5.5 Ensayos *in vitro*

2.5.5.1 Estabilidad en PBS

Aproximadamente 15 μg de cada uno de los complejos fueron adicionados a 200 μl de PBS 0.2 M pH 7.2, siendo incubados a 37 ° C. El porcentaje de actividad total unida al péptido fue determinado por HPLC e ITLC a 0, 24 y 48 h.

2.5.5.2 Ensayo de competencia con cisteína

Cada uno de los cuatro complejos fueron enfrentados con cisteína a diferentes relaciones molares cisteína: complejo (5:1 a 500:1). Para ello alícuotas de cada complejo fueron llevadas a $c = 2.2 \mu\text{M}$ (dilución 1:50) en PBS 0.2 M pH 7.2 y posteriormente fueron preparadas soluciones de cisteína ($c = 10 \text{ mg / ml}$) y sus correspondientes diluciones en PBS 0.2 M pH 7.2. La incubación fue realizada por 1h a 37 ° C. El porcentaje de disociación o de ^{99m}Tc transquelado a la cisteína fue determinado por ITLC en SF.

2.5.5.3 Ensayo de unión de ^{99m}Tc -UBI 29-41 a *S.a.*

Aproximadamente 2 μg de cada uno de los complejos de ^{99m}Tc -UBI 29-41 y ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 fueron transferidos a un vial Eppendorf. Seguidamente le fueron agregados 0.8 ml de ácido acético 0.01 M 50% (v/v) en Na-PB conteniendo Tween-80 0.01% (v/v) y 0.1 ml de Na-PB conteniendo 1×10^7 UFC de *S. a.* (ATCC 25923). La mezcla fue incubada por 1 h a 4 ° C (de manera de inhibir el crecimiento bacteriano por temperatura y de obtener una medida correspondiente solo a la unión del péptido radiomarcado y no a su incorporación) y los viales fueron centrifugados a 2000 g por 5

min. para separar el pellet (bacterias con el péptido unido) del sobrenadante (péptido no unido). Posteriormente fue aspirado el sobrenadante, y el pellet resuspendido en PBS y vuelto a centrifugar y a reaspirar el sobrenadante. Las actividades del pellet y del sobrenadante medidas en un cristal de INa(Tl) conectado a un espectrómetro monocanal sirvieron para calcular el porcentaje de péptido radiomarcado unido a la bacteria.

2.5.6 Estudios *in vivo*

2.5.6.1 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de infección con *S.a.*

Una alícuota de 50 μL de una suspensión de *S.a.* (ATCC 25923) en fase de crecimiento exponencial, conteniendo 2×10^8 UFC / mL, fue inyectada i.m. en el muslo derecho del ratón para producir la infección. Los cuatro complejos de ^{99m}Tc -UBI 29-41 y ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 (control negativo) fueron inyectados a las 18 h de producida la infección. 2h p.i. los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y a los tejidos de interés aislados les fue medida su radiactividad y determinado su peso según lo descrito en 2.1.5.2. Finalmente fueron calculados los % D.I. / g de tejido para cada órgano y las relaciones PI / PN para cada animal.

2.5.6.2 Biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de inflamación estéril.

Una alícuota de 50 μL de trementina, fue inyectada i.m. en el muslo derecho del ratón para producir la inflamación estéril. El radiofármaco ^{99m}Tc -UBI 29-41 radiomarcado por el método descrito en 2.2.1.1 fue inyectado a las 18 h de producida la inflamación. 2h p.i. los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tejidos de interés aislados fueron tratados como en 2.1.5.2. Posteriormente fueron calculados los % D.I. / g de tejido para cada órgano y las relaciones PI / PN correspondientes a cada animal.

2.5.7 Adquisición de imágenes por autorradiografía digital y cálculo computerizado de la relación SI / SN a partir de las autorradiografías

Previamente a la cuantificación de actividad en contador gamma automático de cada órgano, se realizaron adquisiciones simultáneas de las patas derechas e izquierda de cada ratón en un autorradiógrafo digital. El mismo posee un detector de 20,0 cm x 24,0 cm de área, pero se seleccionó una de 6,0 x 3,5 cm. La resolución empleada fue de 0.5 mm píxel. Se hicieron adquisiciones hasta colectar alrededor de 100.000 cuentas totales de las patas de ratones NIH con *S.a.* viables y con inflamación estéril inyectados con ^{99m}Tc -UBI 29-41 y ^{99m}Tc -IgG.

Las regiones de interés (ROI) fueron generadas sobre el sitio de inflamación o infección (SI) por escrutinio de la imagen sobre el monitor. Un área igual en número de pixels del lado contralateral (pata normal), fue usada como ROI para la representación del sitio normal (SN). Se tomó como valor de fondo una ROI de igual área, seleccionada sobre la parte de la imagen que muestra la ausencia de tejidos (FDO). Las relaciones SI / SN fueron obtenidas para cada ratón usando ROIs de diferentes tamaños y fueron calculadas usando la ecuación (SI-FDO) / (SN-FDO).

2.6 Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re por métodos directos e indirectos

2.6.1 Marcación de AcMo anti CD20 por método directo

2.6.1.1 Reducción del AcMo anti CD20

Aproximadamente 10 mg ($c = 10 \text{ mg/ml}$) del AcMo (Rituximab, Roche) fueron reducidos con 2-ME manteniendo una relación molar de 1000:1 (reductor : AcMo) durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificaron a través de una columna de Sephadex G-50 de 10 x 1 cm previamente equilibrada con buffer fosfato 10 mM pH 5,8 purgado con N_2 . Se tomaron fracciones de 1 ml, se midió la concentración de todas ellas en un espectrofotómetro UV/VIS a 280 nm y se mezclaron las 3 de mayor concentración. Se fraccionó bajo campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad en alícuotas de 300 μL (aprox. 1 mg) que se mantuvieron a 4 ° C hasta el momento de su utilización.

2.6.1.2 Marcación del AcMo anti-CD20 reducido

Se toma una fracción del AcMo reducido 300 μL y se le adiciona 500 μL de una solución nitrogenada que contiene 2.4 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 83 mg de tartrato de sodio ($c_f = 7 \text{ M}$) y 0.25 mg de ácido genticónico. Inmediatamente se adicionan 2,2 ml (325 MBq) de una elución fresca de $^{188}\text{ReO}_4^-$ obtenida de un generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (ORNL, USA) incubándose todo en un vial durante 2h a temperatura ambiente.

2.6.1.3 Producción y marcación de un kit liofilizado de AcMo anti-CD20 reducido con conteniendo reductor y transquelante.

Se disuelven 21.6 mg de SnCl_2 en 25 μL de HCl cc. y se llevan a 5 mL con agua inyectable previamente nitrogenada, se adicionan 2.5 mg de ácido genticónico y luego 810 mg de tartrato de sodio hasta disolución. Por último se adicionan 3 mL (aprox. 9 mg) de la solución de AcMo anti-CD20 (xliv) reducido y purificado según se describe en 2.3.1.1. La solución se esteriliza por filtración a través de membrana (Millipore 0.22 μm), se fracciona 0.9 mL por frasco o vial estéril libre de pirógenos y se liofiliza en un ciclo de 24 h con una temperatura final de secado de 25 ° C. Concluida la misma los frascos se precintan bajo atmósfera de nitrógeno y se conservan en heladera a 4-8 ° C. El procedimiento de marcación consistió en la reconstitución del kit liofilizado con 800 μL de agua inyectable y la adición de 2.2 mL de una elución fresca del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ con 30 μL de HCl cc. El pH final fue de 3 y se dejó reaccionando por 2 h a temperatura ambiente.

2.6.2 Marcación de IgG y AcMo 14F7 por método indirecto

2.6.2.1 Optimización de la marcación con $^{188}\text{Re-MAG}_3$ usando como modelo IgG

Marcación de S-Bz-MAG₃ con ^{188}Re : Una elución fresca del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (MAP medical technologies, Finlandia) de 6.83 mCi en 10ml de SF, se redujo por evaporación a 1.0 ml. Por otra parte 1.5mg (4.25 μmol) de S-Bz-MAG₃ (gentilmente provisto por Cecilia Gil, CGM nuclear, Chile) se disuelven en 0.5 ml de $\text{CNCH}_3:\text{H}_2\text{O}$ (6:4) (sol. A). Una masa de 3mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 0.5 ml de buffer citrato 0.1M pH 5 (sol. B). Se agrega en un vial de 5 ml la sol. A a la sol. B y se marcan con la actividad total eluida de $^{188}\text{ReO}_4^-$. Se nitrogena el vial por un período de 5 min., se precinta y se incuba en un baño de agua a 90 °C durante 2h.

Esterificación del $^{188}\text{Re-MAG}_3$ con TFP: Se conjugan 400 μl de la solución de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ (0.85 μmol) con 50 μl de TFP ($c = 100 \text{ mg/ml}$) y 25 mg de EDC. Se incuba a temperatura ambiente durante 30'. La relación molar TFP:MAG₃ fue 35:1. También se usaron relaciones molares que van desde 7:1 a 70:1.

Conjugación del $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ a IgG: Se realizaron utilizando dos relaciones molares éster: IgG distintas (25:1) y (50:1). La concentración de IgG usada fue de 10mg/ml en buffer Na_2CO_3 0.1M pH 10. Para la relación molar 50:1, se tomaron 630 μl de solución de IgG (6.3 mg) y se incubaron durante 30 min., con 1 ml de la solución de éster activo.

2.6.2.2 Marcación de AcMo14F7 usando $^{188}\text{Re-MAG}_3$

La conjugación de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ a AcMo14F7 (CIM, Cuba), se realizó utilizando cuatro relaciones molares éster: AcMo distintas 42:1, 110:1, 145:1 y 309:1. La concentración de AcMo usada fue de 2.5 mg/ml en buffer NaHCO_3 0.1M pH 10. Para una experiencia típica se adicionaron 0.3-0.5 mg de AcMo 14F7 a la cantidad correspondiente de éster activo seco y la mezcla de reacción se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. El producto final fue purificado por GPC-HPLC.

2.6.3 Determinación de la pureza radioquímica y de los rendimientos de marcación por RP-HPLC, GPC-HPLC e ITLC-SG

La determinación de la pureza radioquímica y de los rendimientos de marcación de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20, $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CEA (IOR-CEA, CIM, Cuba), $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo14F7}$ fue realizada en un HPLC (Shimadzu) equipado con un detector radiométrico con cristal de centelleo de INa(Tl) conectado a un espectrómetro integrador y un arreglo de diodos, usando una columna SW300 (Waters) de permeación de geles. Como solvente de corrida se usó PBS de composición detallada en 2.1.3, con flujo isocrático de 1 mL / min.

La pureza radioquímica de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ se determinó utilizando el equipamiento anterior pero conectado a una columna de fase reversa Deltapak C18 (Waters) y con un gradiente de CNCH_3 : H_2O (curva 4) a un flujo de 1.0 mL / min.

La determinación de la pureza radioquímica del $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 radiomarcado según 2.6.1.2 y 2.6.1.3 se determinó además por ITLC-SG usando como solvente de corrida SF (producto y ^{188}Re -hidrolizado en Rf 0.0), usando como solvente de corrida MEC (producto, ^{188}Re -hidrolizado y ^{188}Re -tartrato en Rf 0.0) y usando el sistema etanol, amoníaco, agua (2:1:5) (producto en Rf 0.4-0.8). En este último caso se prepara una solución de HSA al 5 %, se embeben las placas de ITLC en esta solución por 2 min. se sumergen en agua 2-3 seg. y se secan al aire a temperatura 18-20 °C antes de ser empleadas.

2.6.4 Estudios *in vitro*

2.6.4.1 Estabilidad en SF y en suero

150 μL de cada producto radiomarcado se diluyeron 1:5 en SF y suero humano y fueron incubados a temperatura ambiente. Alícuotas de 35-70 μL de cada uno de los productos fueron analizadas por HPLC e ITLC a diferentes tiempos para determinar el porcentaje de actividad total unida a proteína.

2.6.4.2 Ensayo de unión de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 a linfocitos.

20 μL de cada uno de los complejos $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 y $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CEA fueron transferidos a un vial Eppendorf. Seguidamente le fueron agregados 0.5 ml de una suspensión conteniendo 10^6 leucocitos obtenidos de dadores voluntarios por leucoféresis (70 % de linfocitos). Se midió la actividad de la suspensión, se la incubó por 1 h a 37 ° C y los viales fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min. para separar el botón celular del sobrenadante. Posteriormente fue aspirado el sobrenadante y el botón resuspendido en SF y vuelto a centrifugar y a reaspirar el sobrenadante. La actividad del botón celular fue medida en un cristal de INa(Tl) conectado a un espectrómetro

monocanal y se calculó la fracción inmunoreactiva como la diferencia entre el porcentaje de unión del $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 y el porcentaje de unión del $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CEA (blanco de unión inespecífica). Todas las determinaciones de este ensayo se realizaron por duplicado.

2.6.5 Estudios *in vivo*

2.6.5.1 Biodistribución en ratones normales

Se realizaron biodistribuciones en ratones normales Balb/c, (aprox. 25 g de peso) inyectándose por la vena de la cola 50 μl de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 previamente filtrado por membrana de 0.02 μm . En todos los casos se midió la actividad de la jeringa pre y post-inyección, con el propósito de conocer la dosis inyectada en cada ratón.

A las 2, 4 y 24 h post inyección tres animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical (previamente anestesiados con pentobarbital), tomándose por punción cardíaca muestras de sangre y separando en tubos prepesados hígado, bazo riñones, intestinos, pulmones, pata, estómago y tiroides. Los tubos conteniendo los distintos órganos fueron pesados para calcular el peso del órgano y sus actividades fueron medidas en un contador γ automático junto con 50 μl de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 (estándar) en una ventana de energía correspondiente al pico de máxima energía del radionucleído. Los resultados fueron expresados como % D.I. / g de tejido. Además a un ratón de cada grupo (2, 4 y 24 h) se le recolectó la orina y se cuantificó su actividad relacionándola con el estándar para estimar la excreción urinaria. Asimismo las muestras fueron analizadas por ITLC para separar y cuantificar las distintas especies radiactivas presentes.

2.6.6 Adquisición de imágenes en cámara γ

Se utilizó la misma cámara que en 2.4.7 pero con un colimador MEHR para evitar la penetración septal. La ventana de energía fue centrada en 155 KeV energía de máxima emisión del ^{188}Re , con un ancho del 15 %. Se adquirieron imágenes de cuerpo entero y de órganos ex-vivo, de ratones normales inyectados con 200 μCi de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 a 2 h p.i., colectando 200.000 cuentas sobre una matriz de 256*256 pixels y zoom de 2.5.

2.7 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y

2.7.1 Marcación de Biotina y Norbiotinamina usando $^{188}\text{Re-MAG}_3$

Durante la conjugación del $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ (obtenida como en 2.6.2.1) a Biotina (Sigma, USA) y Norbiotinamina (xliv) (Molecular Probes Inc, USA) se ensayaron diferentes relaciones molares éster: derivado de (25:1, 65:1, 75:1 y 130:1) respectivamente. Para cada conjugación, 1 mg de biotina disuelto en $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (1:3) o 70 μl (0.51 mg) de una solución de Norbiotinamina (1.1 mg / 150 μl en acetonitrilo: agua 2:1) ajustados a pH 10 con Na_2CO_3 0.1M, fueron adicionados a la cantidad correspondiente de éster activo y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. La purificación del primer derivado conjugado se realizó por RP-HPLC y la del segundo conjugado radiomarcado por cartridge Sep-Pack C18, colectándose el producto principal en la fracción acuosa.

2.7.2 Marcación de conjugado DOTA-biotina con ^{90}Y

A 1 μl (12 μg) de una solución de DOTA-biotina ($c = 12 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) se le adicionan 75 μl (37 MBq) de $^{90}\text{YCl}_3$ en solución buffer acetato de amonio a pH 7.0. Se incubó la

mezcla a 85 °C durante 30 min. y luego de su enfriamiento a temperatura ambiente se diluye con 925 µl de SF para obtener una CA = 37 MBq /ml y una C_{biotina} = 12 µg/ml.

2.7.3 Determinación de la pureza radioquímica por HPLC, FPLC e ITLC-SG

La pureza radioquímica de ¹⁸⁸Re-MAG₃-Norbiotinamina se determinó utilizando la columna y el flujo mencionados en 2.6.3 pero con distinto gradiente: solvente A: SF, solvente B: metanol, 05min. 100% A, incremento lineal de B hasta 80%, 20-25 min. 80% B.

La pureza radioquímica de ⁹⁰Y-DOTA-biotina se determinó por ITLC-SG y también utilizando un FPLC unido a un detector radiométrico (Radiomatic flow-one, Packard), con columna de permeación de geles y SF como solvente a un flujo de 1 ml / min. Dado que el ⁹⁰Y es un emisor beta puro, el detector fue ajustado en ancho de ventana infinito para detectar la radiación de frenamiento del β-.

2.7.4 Estudios *in vitro*

2.7.4.1 Estabilidad en SF y en suero y **transferrina**

A 100 µl de solución de ⁹⁰Y-DOTA-biotina se adicionan 400 µl de suero humano o de transferrina (1mg / ml en SF) respectivamente y se determina por FPLC e ITLC la estabilidad a 23 y 136 h. Con el FPLC se probó primero sin y luego con agregado de EDTA-Avidina, para diferenciar el eventual ⁹⁰Y libre del unido a transferrina.

2.7.4.2 Ensayo de unión de ¹⁸⁸Re-MAG₃-Norbiotinamina a avidina

Se incubó una alícuota de 50 µL de la fracción acuosa de ¹⁸⁸Re-MAG₃-Norbiotinamina purificada (25 µg) con 50 µL de avidina nativa estéril apirógena (Biospa, Milán, Italia) en solución acuosa (c = 9.5 mg / ml). La fracción unida fue analizada por HPLC usando una columna Superdex 200 (Pharmacia) y por columna Sephadex G-25, tomando fracciones de 450 µl a partir del volumen muerto y midiéndolas en el contador gamma automático. La estabilidad del complejo ¹⁸⁸Re-MAG₃-Norbiotinamina-Avidina fue evaluada en SF durante 18 h a 37 °C usando el mismo sistema de HPLC.

2.7.4.3 Ensayo de unión de ⁹⁰Y-DOTA-biotina a avidina

Se tomaron 10 µl de la solución de ⁹⁰Y-DOTA-biotina (aprox. 0.12 µg de biotina) y se les agregaron 990 µl de SF y 100 µl de una solución de avidina (c = 9.5 mg / ml). Posteriormente se determina por FPLC el porcentaje de unión.

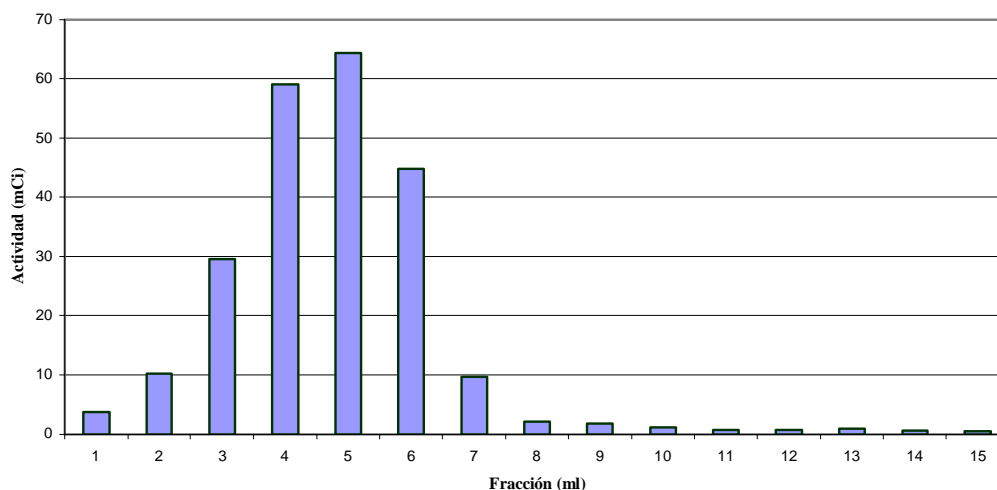
III. RESULTADOS

3.1 Generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$

3.1.1 Perfil de elución del generador

El perfil de elución del generador (Fig.11) muestra la actividad del radionucleído hijo eluída en función del volumen de solvente que sale de la columna que contiene el relleno donde se halla adsorbido el radionucleído padre, cuando se eluye el generador según las condiciones fijadas por el fabricante.

Fig. 11. Perfil de elución del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ de ORNL



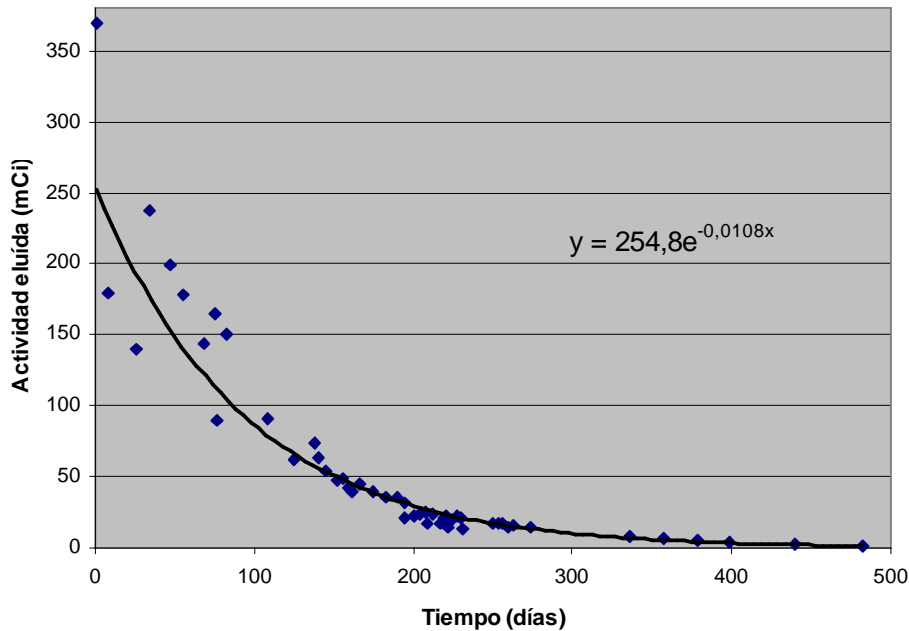
El conocimiento del perfil de elución permite aumentar la concentración de actividad que se necesita para una determinada marcación con el solo hecho de fraccionar el solvente a la salida del generador durante el procedimiento de elución y seleccionar la o las fracciones apropiadas, en este caso particular son la 3, 4, 5 y 6. Todas ellas con CA superior a 1073 MBq / ml (29 mCi / ml).

Existen otros procedimientos que permiten aumentar la concentración de actividad del eluído como ser la evaporación del solvente y el pasaje del eluído por columnas de intercambio iónico como sugiere el fabricante (xlv). La desventaja del primero consiste en el aumento de concentración de las impurezas radionucleídicas que posee el eluído. En cuanto al segundo método su elevado costo lo hace de difícil aplicación.

3.1.2 Curva experimental de elución del generador

La curva experimental de elución consiste en una gráfica de actividad eluída (Fig. 12) en función del tiempo de vida del generador. Los valores obtenidos no siempre son los teóricos debido a que las eluciones sucesivas realizadas diariamente no permiten que se reestablezca el equilibrio secular necesario para alcanzar el máximo.

Fig. 12. Curva experimental de elución del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ de ORNL



3.2 Biodistribución simultánea de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 y 2 h p.i. y detección dual usando un detector de germanio hiperpuro

A continuación se observan los resultados correspondientes a dos animales a 1h p. i. (Tabla 2), dos animales a 2h p.i. (Tabla 3) y los valores promedio con sus desviaciones estándar (tabla 4)

Tabla 2 Biodistribución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 h p.i.

Organo	Peso (g)	^{99m}Tc			^{188}Re		
		cpm	cpm/g	%DI/g	cpm	cpm/g	%DI/g
Sangre	0,6608	663	1003	3,78	156,00	236	4,46
Hígado	2,3071	1362	590	2,22	232,00	101	1,90
Bazo	0,1521	41	270	1,02	22,00	145	2,73
Riñones	0,6829	338	495	1,87	85,00	124	2,35
Estómago	0,6475	6613	10213	38,49	1296,00	2002	37,78
Intestino	3,9872	1839	461	1,74	156,00	39	0,74
Pulmones	0,2752	111	403	1,52	36,00	131	2,47
Tiroides	0,0240	249	10375	39,10	76,00	3167	59,77
Sangre	0,4967	577	1162	4,32	142,00	286	5,07
Hígado	2,6609	1337	502	1,87	206,00	77	1,37
Bazo	0,2862	109	381	1,42	16,00	56	0,99
Riñones	0,6973	349	501	1,86	68,00	98	1,73
Estómago	0,7974	6867	8612	32,00	1323,00	1659	29,43
Intestino	3,9416	1709	434	1,61	115,00	29	0,52
Pulmones	0,3146	191	607	2,26	38,00	121	2,14
Tiroides	0,0240	134	5583	20,75	36	1500	26,61

Tabla 3. Biodistribución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 2 h p.i.

Organo	Peso (g)	^{99m}Tc			^{188}Re		
		cpm	cpm/g	%DI/g	cpm	cpm/g	%DI/g
Sangre	0,6861	879	1281	3,94	188,00	274	3,98
Hígado	1,8004	1299	722	2,22	173,00	96	1,40
Bazo	0,2187	94	430	1,32	24,00	110	1,59
Riñones	0,5755	336	584	1,80	61,00	106	1,54
Estómago	0,3036	5194	17108	52,61	1072,00	3531	51,29
Intestino	2,6054	1876	720	2,21	105,00	40	0,59
Pulmones	0,2532	144	569	1,75	45,00	178	2,58
Tiroides	0,0240	169	7042	21,66	47,00	1958	28,45
Sangre	0,2645	234	885	3,76	60,00	227	4,45
Hígado	2,3850	1009	423	1,80	151,00	63	1,24
Bazo	0,1977	53	268	1,14	9,00	46	0,89
Riñones	0,6062	251	414	1,76	64,00	106	2,07
Estómago	0,6951	4508	6485	27,56	961,00	1383	27,11
Intestino	4,2188	1570	372	1,58	136,00	32	0,63
Pulmones	0,2909	116	399	1,69	26,00	89	1,75
Tiroides	0,0240	161	6708	28,51	55	2292	44,93

Tabla 4. Valores promedio de %D.I./g para la biodistribución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en ratones normales a 1 y 2 h p.i.

Órganos	^{99m}Tc		^{188}Re		^{99m}Tc		^{188}Re	
	%D.I./g 1 h		%D.I./g 1 h		%D.I./g 2 h		%D.I./g 2 h	
	media	desv.st	media	desv.st	media	desv.st	media	desv.st
Sangre	4,05	0,38	4,76	0,43	3,85	0,13	4,21	0,33
Hígado	2,05	0,25	1,64	0,37	2,01	0,30	1,32	0,11
Bazo	1,22	0,28	1,86	1,23	1,23	0,13	1,24	0,50
Riñones	1,86	0,00	2,04	0,44	1,78	0,03	1,80	0,37
Estómago	35,24	4,58	33,60	5,90	40,09	17,72	39,20	17,10
Intestino	1,67	0,09	0,63	0,16	1,90	0,45	0,61	0,03
Pulmones	1,89	0,52	2,31	0,23	1,72	0,04	2,17	0,59
Tiroides	29,92	12,97	43,19	23,45	25,08	4,84	36,69	11,66

La administración intravenosa de pertechnetato y perrenato muestra una pobre unión a proteínas y una rápida salida del compartimiento del plasma sanguíneo. La biodistribución a 1 y 2 h p.i. muestra una acumulación temprana en estómago y en glándula tiroides con valores promedio superiores a 30 y 25 % D.I./g respectivamente. Dichos valores obtenidos experimentalmente son útiles para estimar *in vivo* la reoxidación a pertechnetato o perrenato de radiofármacos de ^{99m}Tc o ^{188}Re , es decir para evaluar la estabilidad *in vivo* de esos radiofármacos.

Los cuatro test apareados (tanto paramétricos como no paramétricos) no detectan diferencias con un nivel de significación del 5 % entre los pares de valores para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en tiroides (1 h p.i.), para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en estómago (1 h

p.i.), para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en tiroides (2 h p.i.) y para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{188}\text{ReO}_4^-$ en estómago (2 h p.i.).

3.3 IgG policlonal humana radiomarcada con ^{99m}Tc por métodos directos

3.3.1 Optimización de la marcación de IgG por reducción de puentes disulfuro usando 2-ME y DTT

3.3.1.1 Reducción de la IgG con 2-ME y DTT, purificación por columna y medición de la absorbancia a 280 nm.

En una experiencia típica la IgG (20 mg) fue reducida con 2-ME y purificada por columna Sephadex G-50 (volumen muerto 2.2 mL) obteniéndose 6 fracciones. La primer fracción se tomó luego de eluir un volumen de solvente equivalente al volumen muerto de la columna. Alícuotas de 20 μL de cada fracción fueron diluidas a 1 mL (factor de dilución 50) y luego medidas en un espectrómetro UV/VIS a 280 nm obteniéndose los resultados que figuran en la tabla 5.

Tabla 5. Absorbancia correspondiente a diluciones 1:50 de cada fracción de IgG purificada por columna.

Fracción	Absorbancia
1	0,008
2	0,304
3	0,038
4	0,017
5	0,014
6	0,004

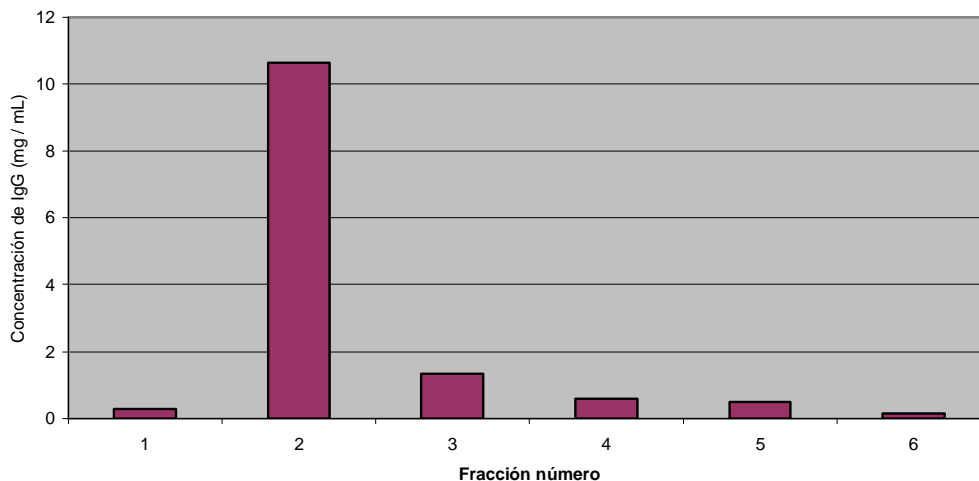
Para el cálculo de la concentración de proteína a partir de los valores de absorbancia se utilizó la ecuación 1.

$$C = \text{Absorbancia} * \text{Factor} * \text{Dilución} \quad \text{Ec. 1}$$

donde el factor para IgG es igual a 0.7 y la dilución 50.

Aplicando la ecuación 1 a los valores de la tabla 5 se obtienen los resultados de concentración de la figura 13.

Fig. 13. Concentración de IgG de las distintas fracciones obtenidas después de la purificación por columna



Se eligieron las fracciones 2, 3 y 4 dado que tienen una concentración mayor a 0.5 mg / ml y se hizo un pool con todas ellas, recuperándose una masa total de 16.28 mg de proteína reducida a partir de los 20 mg iniciales de IgG, es decir que el rendimiento de la purificación fue del 81.4 %.

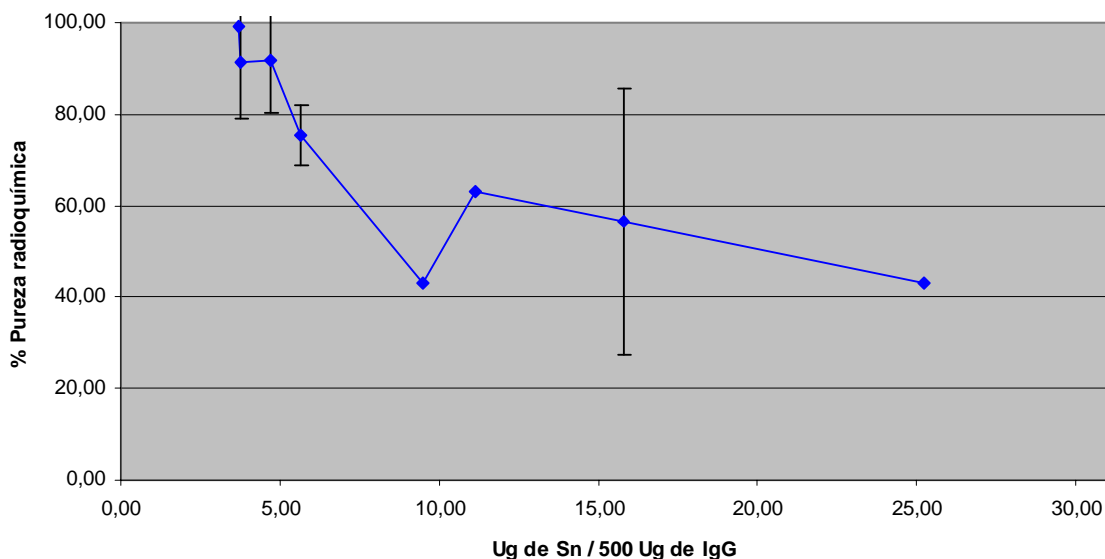
Se trabajó bajo idénticas condiciones experimentales cuando se realizó la reducción de IgG con DTT.

3.3.1.2 Marcación de IgG reducida con ^{99m}Tc

En la figura 13 se observan los resultados de pureza radioquímica de las distintas marcaciones ($n = 18$) con ^{99m}Tc para distintos volúmenes (20 a 100 μL) de kit de MDP + SnCl_2 adicionados por 1mg de proteína reducida. Se obtuvo la máxima pureza radioquímica (99 %) cuando se agregaron 50 μl del mismo (50 μg de MDP y 3.4 μg de SnCl_2) por mg de IgG reducida. Esta formulación fue la que finalmente se utilizó para todos los ensayos de comparación con la ^{99m}Tc -IgG obtenida por fotoactivación.

Se observa que para relaciones mayores de 5.7 μg de Sn / 500 μg de IgG los valores de pureza radioquímica disminuyen cayendo por debajo del 80 % (Fig. 14), debido a la formación de ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado. El blanco de radiomarcación o radiomarcación inespecífica es decir la marcación que en su formulación tiene IgG nativa a la cual no se le redujeron los puentes disulfuro, alcanzó un valor de 7.2 ± 4.25 ($n = 2$) de pureza radioquímica.

Fig. 14. Efecto de la relación Sn : IgG reducida sobre la pureza radioquímica de las distintas formulaciones ensayadas ($n = 18$) para la marcación de IgG con ^{99m}Tc .



3.3.2 Optimización de la marcación de IgG por fotoactivación con radiación UV.

Fueron realizadas experiencias de marcación para evaluar la unión del ^{99m}Tc a la IgG fotoactivada en presencia o ausencia de O_2 , con diferentes relaciones de Sn y para diferentes concentraciones de IgG fotoactivada con la misma relación de estaño (xlvi).

Los experimentos de control de marcación inespecífica es decir incubando los reactivos por 20 min. sin ser sometidos a irradiación UV y radiomarcados luego con ^{99m}Tc estuvieron en un rango de entre 7 y 10% de rendimiento de marcación. Controles donde la IgG fue irradiada sola, con el agregado del Sn y el MDP posteriormente a la irradiación produjeron muy bajos rendimientos.

Se obtuvieron grandes diferencias en cuanto a la pureza radioquímica determinadas por HPLC para una dada marcación por fotoactivación trabajando bajo atmósfera de nitrógeno y en condiciones atmosféricas normales, 80.0 y 15.8 % respectivamente.

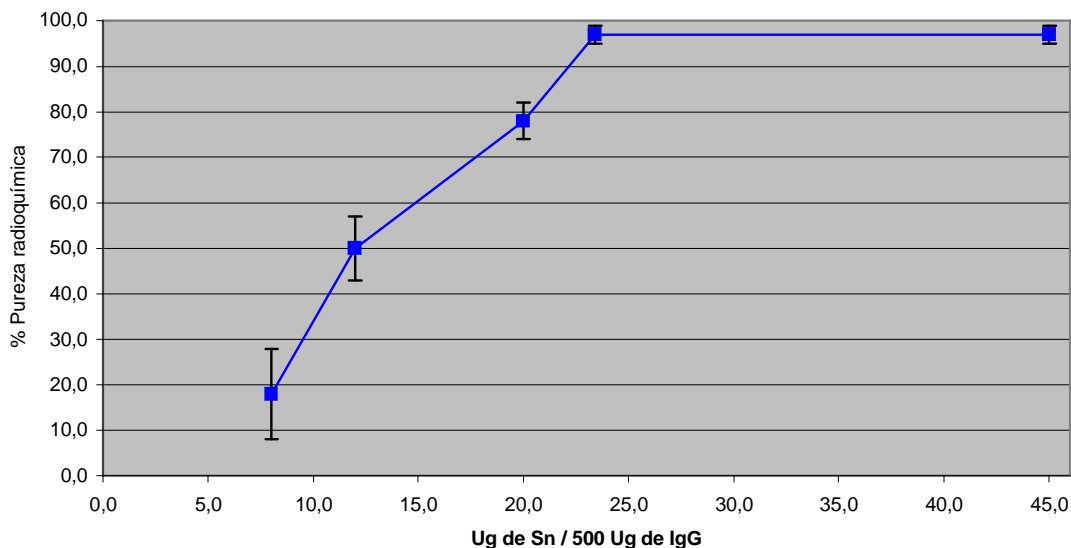
Cuando se irradió una muestra durante 40 min. se produjo un peligroso aumento de la temperatura (60°C) comprometiendo la integridad de la proteína.

La formulación empleada fue: 0.5mg (3.33 nmol) de IgG en 100 μL de PBS, 18 μg (114.6 nmol) de SnF_2 y 40 μg (227 nmol) de MDP. A la solución le fueron adicionados 111 MBq (3 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Como se observa en la Fig. 15, cantidades mayores que 23 μg de estaño por cada 500 μg de IgG (relación molar Sn : IgG, 58 : 1) produjeron rendimientos de marcación entre 90 y 97%.

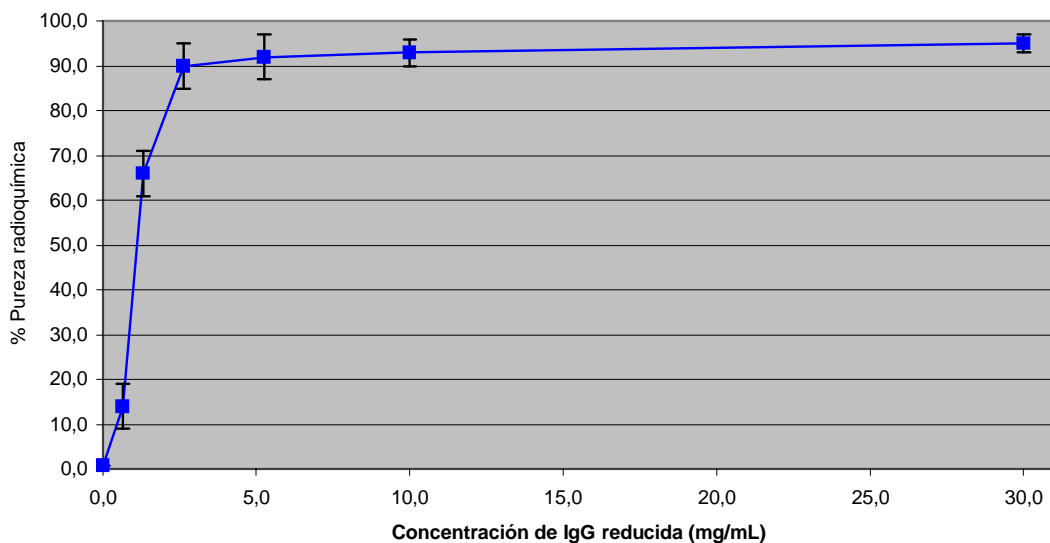
Un típico experimento de fotoactivación fue hecho en dos viales pero la marcación fue retrasada en un caso 30 min. y en otro caso 2 h. Cuando la IgG fotoactivada fue radiomarcada después de 2h, el rendimiento de marcación obtenido fue mayor al 95%. Esto muestra que con una baja concentración de estaño fue alcanzado un pre-estañado.

Fig. 15. Efecto de la relación Sn: IgG sobre la eficiencia de marcación.



Como vemos en la Fig. 16, concentraciones de IgG entre 2.6 y 5 mg/ml dieron rendimientos del 90%, pero resultados más reproducibles fueron obtenidos a concentraciones mayores que 5mg/ml.

Fig. 16. Efecto de la concentración de anticuerpo sobre la eficiencia de marcación.



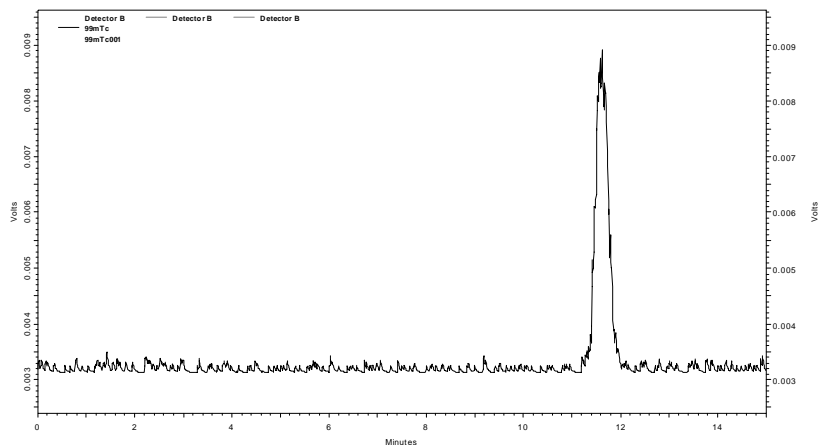
Eficiencias de marcación mayores al 95% fueron obtenidas por irradiación en batch y fueron más reproducibles que la irradiación en un vial simple. Alícuotas de irradiación en batch almacenadas a -20°C por más de 10 días y a -70°C por más de un mes pudieron ser radiomarcadas con elevada eficiencia (>95%).

3.3.3 Determinación de pureza radioquímica por GPC-HPLC e ITLC-SG

Las impurezas más comunes determinadas por GPC-HPLC (usando el detector radiométrico) fueron pertecnetato (RT 13.19 min.) (Fig. 16) y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP (11.27 min.).

En algunos casos agregados proteicos radiomarcados (RT 6.73 min.) con valores inferiores al 4.23 % y fragmentos proteicos radiomarcados (RT 8.9 min.). En todos los casos, el RT de ^{99m}Tc -IgG obtenida por reducción y por fotoactivación fue de 7.5 min.. El % de recupero de la columna fue del 95 % lo cual confirma la ausencia de coloide de ^{99m}Tc que en caso de existir quedaría retenido en columna disminuyendo por tanto el % de recupero.

Fig.17. Radiocromatograma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ inyectado en columna SW300



Las impurezas determinadas por ITLC-SG usando SF y MEC como solventes de corridas fueron pertecnetato y ^{99m}Tc -MDP. Los resultados de un experimento típico fueron los que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Mediciones de ITLC-SG de corridas cromatográficas correspondientes a ^{99m}Tc -IgG fotoactivada en SF y MEC.

	MEC		SF	
	CPM	% A total	CPM	% A total
Siembra	332799		373120	
S- fondo	332685	98,3	373006	84,4
Frente	5964		69142	
F-fondo	5850	1,7	69028	15,6
Total	338535		442034	

De donde se deduce que un 1.7 % de la At se encuentra como pertecnetato y 13.9 % corresponde a ^{99m}Tc -MDP. El restante 84.4 % de la actividad total se halla como ^{99m}Tc -IgG pero no se puede discriminar si la proteína se encuentra formando un agregado molecular o fragmentada usando ITLC-SG. Solamente en algunos casos de obtención de ^{99m}Tc -IgG por reducción química fue encontrado ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado como impureza usando ITLC con el sistema $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$.

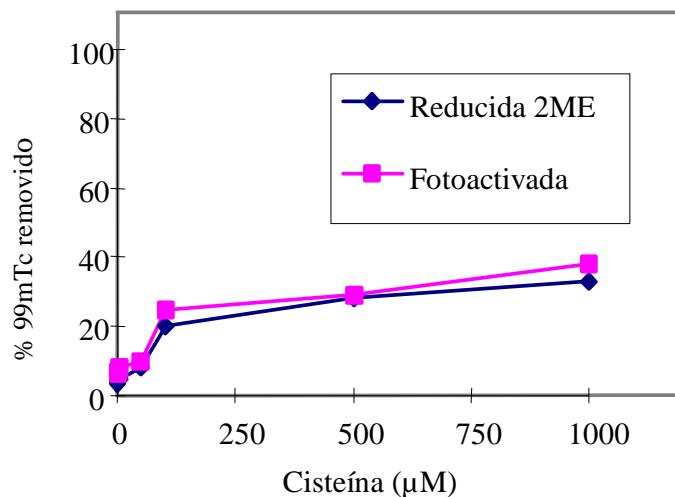
3.3.4 Ensayo de competencia con cisteína:

En la Fig.18 se observan los resultados correspondientes al desafío con cisteína de los dos productos radiomarcados: ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME (kit liofilizado desarrollado en nuestro laboratorio) y ^{99m}Tc -IgG fotoactivada (xlvi), donde se

comparan el porcentaje de ^{99m}Tc removido de cada compuesto marcado en función de la concentración de cisteína.

Ambas IgG radiomarcadas muestran un perfil similar. La estabilidad de la ^{99m}Tc -IgG fotoactivada fue similar a la de la ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME.

Fig. 18. Porcentaje de ^{99m}Tc removido de ^{99m}Tc -IgG versus concentración de cisteína a 37 ° C para ^{99m}Tc -IgG fotoactivada y ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME.



3.3.5 Biodistribución de ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME y ^{99m}Tc -IgG fotoactivada en ratones balb/c con inflamación inducida a 4 y 24 h p.i.

Cada valor de la tabla 7 corresponde a la media de % D.I./g de 5 animales.

Tabla 7. Biodistribución de ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME y ^{99m}Tc -IgG fotoactivada en ratones Balb/c con inflamación inducida a 4 y 24 h p.i.

Órgano	^{99m}Tc -IgG reduc. 2ME		^{99m}Tc -IgG fotoactivada	
	4h	24h	4h	24h
Sangre	30.5 ± 2.5	16.3 ± 1.8	20.7 ± 2.6	9.4 ± 1.5
Hígado	14.8 ± 1.6	8.2 ± 1.2	9.5 ± 1.2	4.6 ± 0.7
Bazo	10.3 ± 1.2	6.1 ± 0.9	4.9 ± 1.2	3.5 ± 0.3
Riñones	27.3 ± 1.8	15.2 ± 1.3	26.2 ± 3.7	11.5 ± 1.8
Intestino	8.3 ± 0.9	2.5 ± 0.5	5.1 ± 1.3	1.1 ± 0.1
Pulmón	9.5 ± 1.4	5.8 ± 1.2	9.3 ± 2.4	3.9 ± 1.2
P. Normal	4.6 ± 0.5	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.5	1.4 ± 0.2
P. Inflamada	10.8 ± 1.3	4.9 ± 0.8	5.5 ± 0.8	2.5 ± 0.4

Los niveles de captación en riñón fueron superiores a los de captación en hígado en ratones inflamados para ambos productos. Comparando con la biodistribución de ^{99m}Tc -IgG por el método directo (2-ME), las diferencias fueron evidentes, los niveles de captación en hígado como en riñones fueron mayores para la IgG radiomarcada por 2-ME.

La depuración sanguínea entre los dos puntos considerados 2 y 24 h p.i. fue 2.2 para ^{99m}Tc -IgG fotoactivada y 1.9 para ^{99m}Tc -IgG reducida con 2-ME (kit liofilizado) y en algunos tejidos fue mayor en la IgG fotoactivada respecto de la reducida por 2-ME.

El porcentaje de retención en cuerpo entero durante 5 h fue 70 ± 5.0 para ^{99m}Tc -IgG fotoactivada y 76 ± 6.7 para ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME (kit liofilizado). Esta diferencia también es una evidencia de una depuración más rápida para ^{99m}Tc -IgG fotoactivada.

Debido al corto $T_{1/2}$ del ^{99m}Tc , esta depuración puede ser una ventaja si no hay reducción en la captación del sitio de inflamación. En este caso (^{99m}Tc -IgG fotoactivada) la depuración de la radioactividad del sitio de inflamación fue a una tasa de 2.2. La relación de PI/PN (2 h p.i.) fue de 2.2, similar al método con 2-ME, por lo que es independiente del método de marcación.

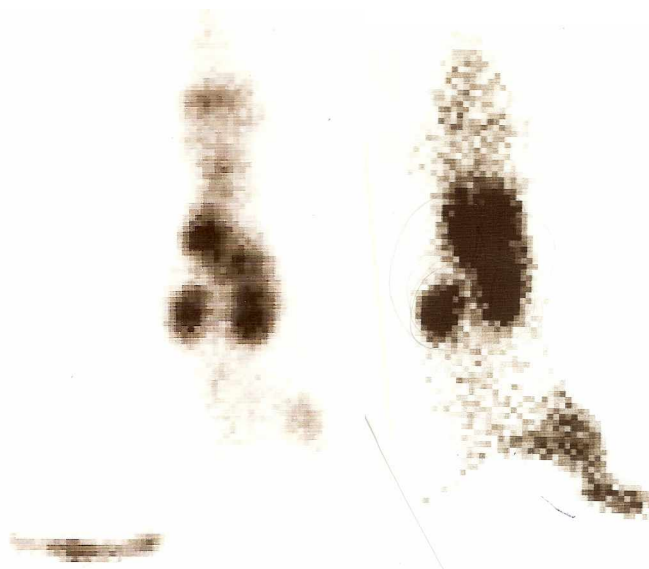
3.3.6 Tiempo de residencia en sangre para $^{99m}\text{TcO}_4^-$, ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME y ^{99m}Tc -IgG fotoactivada

Los tiempos de residencia en sangre para pertechnetato, ^{99m}Tc -IgG reducida con 2ME, ^{99m}Tc -IgG fotoactivada y ^{99m}Tc -MAG₃-IgG fueron 0.48 ± 0.03 , 25.6 ± 5.9 , 10.5 ± 6.2 y 26.7 ± 3.6 h respectivamente.

3.3.7 Adquisición de imágenes en cámara γ

En la Fig. 19 se observan las imágenes adquiridas en cámara gamma correspondientes a ratones portadores de un sitio de inflamación estéril en la pata izquierda, inyectados con ^{99m}Tc -IgG (kit liofilizado). La calidad de la imagen no es óptima debido a que la misma fue obtenida por escaneo de una imagen impresa en papel térmico. En ambas imágenes, izquierda (4 h p.i.) y derecha (24 h p.i.) se observa localización en una región de la pata inflamada y no se observa localización en la región contralateral de la pata normal.

Fig.19. Imágenes de adquisición en cámara gamma a 4 (izquierda) y 24 h (derecha) de **2** ratones inyectados con ^{99m}Tc -IgG (obtenido a partir de kit liofilizado).

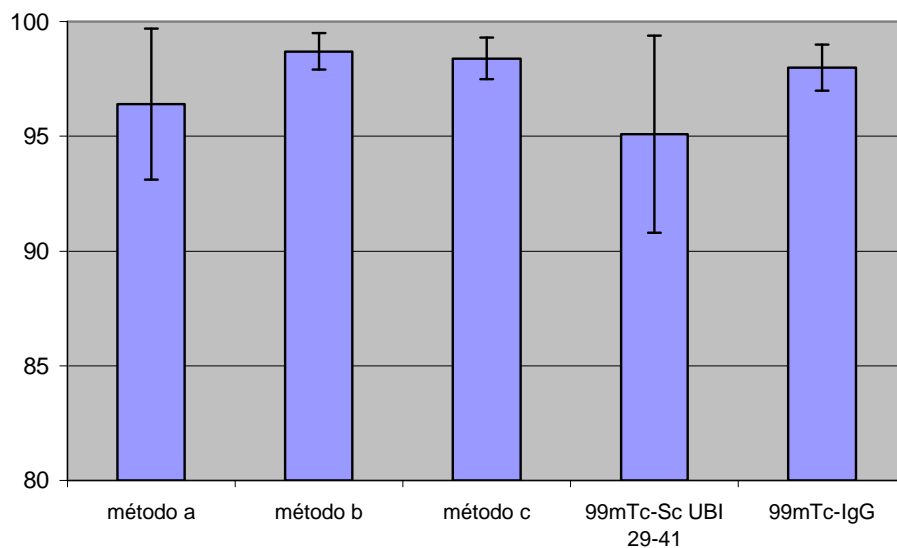


3.4 UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc por métodos directos e indirectos

3.4.1 Determinación de los rendimientos de marcación por RP-HPLC e ITLC-SG

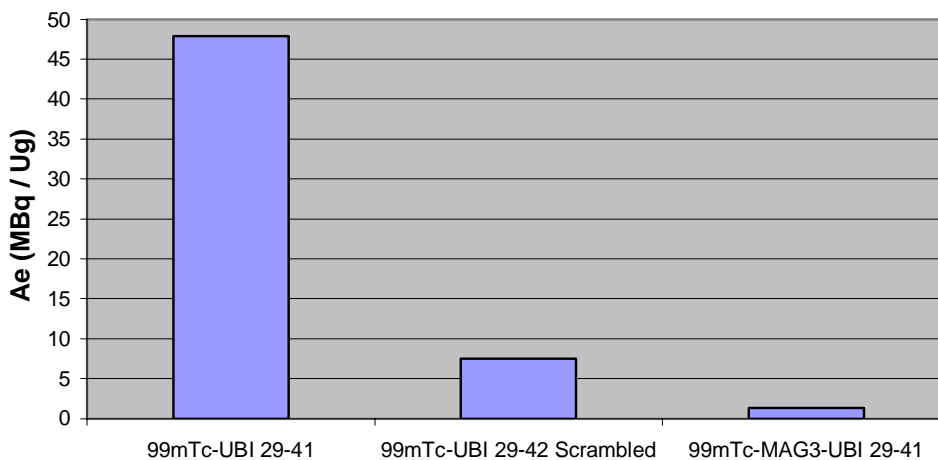
La pureza radioquímica de los tres ^{99m}Tc -UBI 29-41, del ^{99m}Tc -Sc-UBI 29-41 y de ^{99m}Tc -IgG determinada por RP-HPLC e ITLC-SG fue superior al 95% (Fig. 20). No se detectó la presencia de ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado en ninguno de los productos radiomarcados.

Fig. 20. Pureza radioquímica de UBI 29-41 marcado con ^{99m}Tc por 3 métodos diferentes y de Sc-UBI 29-41 (marcado por el método a) y de un kit de IgG también marcado con ^{99m}Tc usado como control para estudios *in vivo*.



El rango de Ae para esos productos fue 1.3-47.9 MBq / μg (Fig. 21).

Fig. 21. Ae máxima obtenida para UBI 29-41 radiomarcado por diferentes métodos



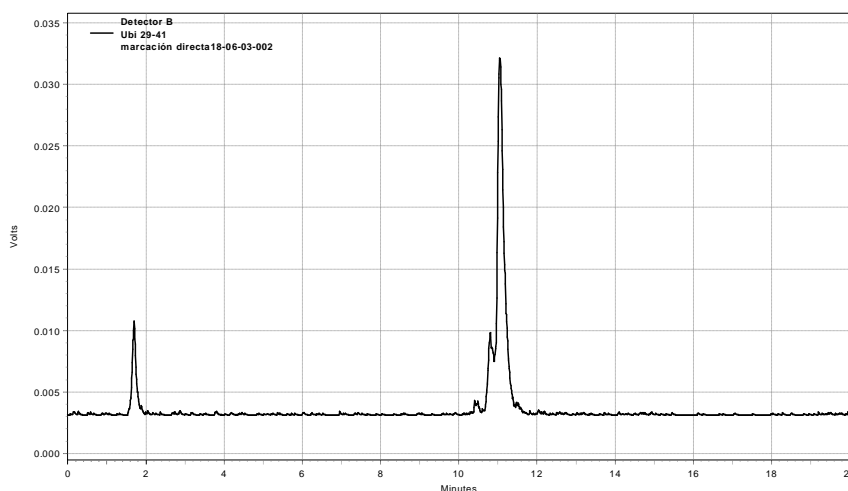
El análisis por HPLC en fase reversa de los péptidos antimicrobianos radiomarcados arrojó un tiempo de retención (RT) entre 10.21 min. y 11.87 min. para el gradiente

utilizado. El cromatograma UV HPLC a 274 nm de UBI 29-41 sin radiomarcarse mostró un pico ancho a RT = 11.52 min. con un hombro a RT = 12.45 min.

3.4.1.1 Método con KBH_4

Se realizaron 32 radiomarcaciones del UBI 29-41 y se determinó el % de marcación por ITLC-SG (n = 7) y RP-HPLC (n = 25) obteniéndose el siguiente resultado 96.4 ± 3.3 (rango 86.0-99.8) para actividades iniciales entre 1.48 y 777 MBq. La actividad específica máxima obtenida con este método fue 47.9 MBq / μg . En la Fig. 22 se observa el radiocromatograma HPLC de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 obtenido por el método directo con KBH_4 según las condiciones descritas en 2.5.1. En el mismo se observa una señal correspondiente a $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ a RT 1.70 min. (11.74 %) y el radiocomplejo que es una mezcla de isómeros a RT 10.80 min. (15.39 %) y 11.05 min. (72.86 %).

Fig. 22. Radiocromatograma HPLC de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41



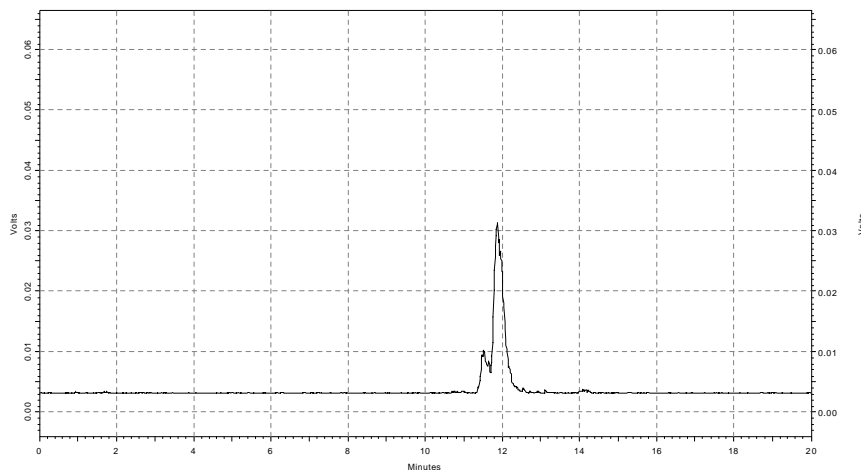
Se realizaron 4 radiomarcaciones de Sc UBI 29-41 por este método y se determinó el % de marcación por RP-HPLC obteniéndose el siguiente resultado 95.1 ± 4.3 (rango 92.5-99.0) para actividades iniciales de hasta 234 MBq. La actividad específica máxima obtenida con este método fue 7.5 MBq / μg y el RT a 10.35 min.

3.4.1.2 Método con NaOH pH 10

Se realizaron 11 radiomarcaciones y se determinó el % de marcación por ITLC-SG (n = 1) y RP-HPLC (n = 10) obteniéndose el siguiente resultado 98.7 ± 0.8 % (rango 97.0-99.9 %) para actividades iniciales entre 7.4 y 680.8 MBq. La actividad específica máxima obtenida con este método fue 41.9 MBq / μg . En la Fig. 23 se observa el radiocromatograma HPLC de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 obtenido por el método directo con NaOH pH 10 según las condiciones descritas en 2.5.2. En el mismo solo se observan dos señales correspondientes a la mezcla de isómeros del radiocomplejo a RT 11.51 min. (11.09 %) y a RT.11.87 min. (88.91 %).

La radiomarcación de t-BOC-UBI 29-41 y t-BOC-Sc UBI 29-41 por este método produjo resultados negativos, es decir ambos radiocromatogramas de HPLC mostraron un solo pico a RT 1.70 min. (99.9 %) correspondiente a $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, corroborando que no es posible la complejación del oxotecnecio sin el grupo amino de la lisina libre o dicho de otra manera que ese grupo participa de la esfera de coordinación del complejo con oxotecnecio.

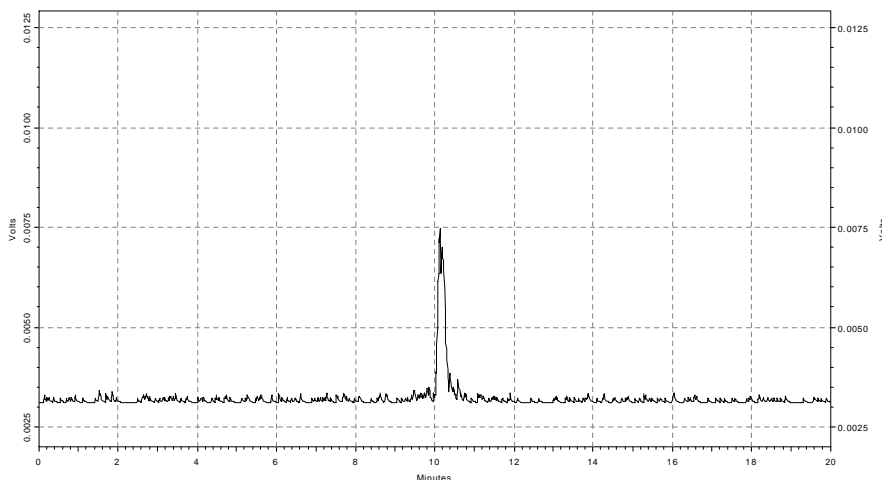
Fig. 23. Radiocromatograma HPLC de ^{99m}Tc -UBI 29-41



3.4.1.3 Conjugación de NHS-S-acetil-MAG₃ y posterior radiomarcación

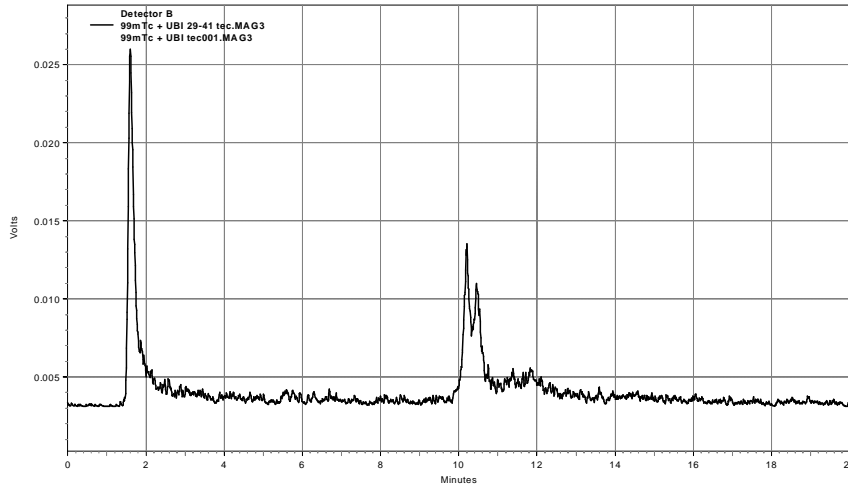
Se realizaron 5 radiomarcaciones y se determinó el % de marcación por RP-HPLC (n = 5) obteniéndose un valor de 98.4 ± 0.9 (rango 97.0-99.0) para actividades de marcación entre 51.4 y 111 MBq. La actividad específica máxima obtenida con este método fue 1.33 MBq / μg . En la Fig. 24. se observa el radiocromatograma HPLC para la marcación de MAG₃-UBI 29-41 con ^{99m}Tc según las condiciones de marcación descritas en 2.5.3., mostrando un pico a RT = 10.21 min (99.0 %) correspondiente al péptido radiomarcado. No se observa pico de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Fig. 24. Radiocromatograma HPLC de ^{99m}Tc -MAG₃-UBI 29-41



En la Fig. 25 se observa el radiocromatograma HPLC de la marcación inespecífica de UBI 29-41 con ^{99m}Tc aplicando las condiciones de la técnica para marcar MAG₃-UBI 29-41 descritas en 2.5.3, mostrando un pico a RT = 1.60 min. (57.31 %) correspondiente a $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y dos picos pequeños de ^{99m}Tc -UBI 29-41 a RT = 10.21 min. (22.29 %) y 10.45 min. (20.40 %) respectivamente.

Fig. 25. Radiocromatograma HPLC de marcación inespecífica de UBI 29-41

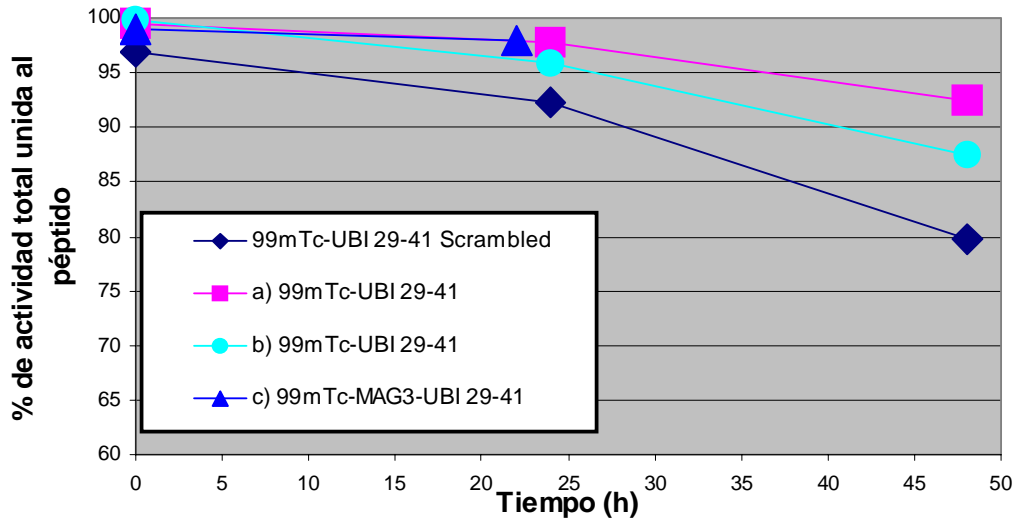


3.4.2 Ensayos *in vitro*

3.4.2.1 Estabilidad en PBS.

La estabilidad en PBS por 24 h fue mayor del 90 % en los tres complejos evaluados de UBI 29-41 radiomarcados y en el $^{99m}\text{Tc-Sc-UBI 29-41}$ (Fig. 26), mostrando los mejores resultados el $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) y el $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-UBI 29-41}$ (método c).

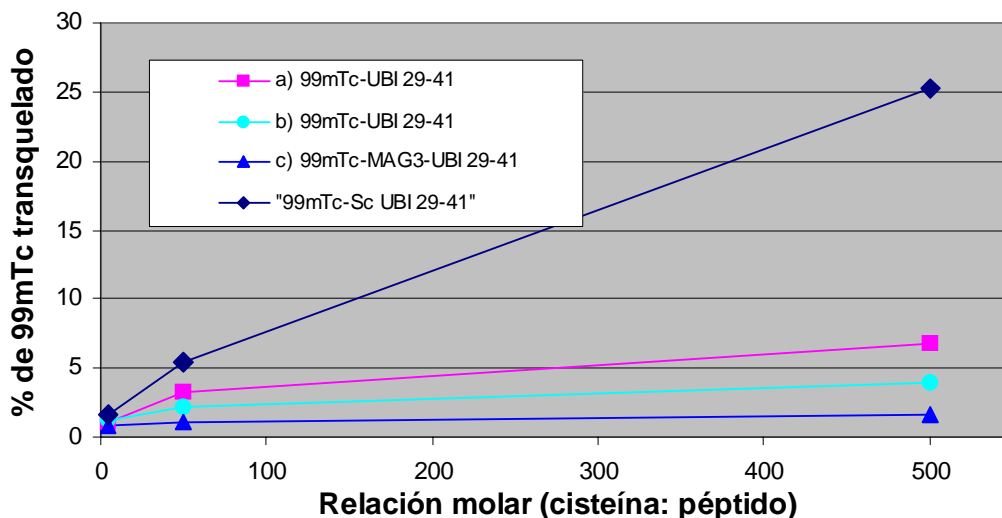
Fig. 26. Estabilidad en PBS a 48 h de UBI 29-41 (tres métodos) y Sc UBI 29-41 (método a) radiomarcados con ^{99m}Tc .



3.4.2.2 Ensayo de competencia con cisteína

Como se observa en la Fig. 27 el porcentaje de la actividad total transquelada a cisteína fue inferior al 10 % para los tres complejos de $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ evaluados y del 25 % para el $^{99m}\text{Tc-Sc UBI 29-41}$ a valores de relación molar cisteína: péptido de 500:1.

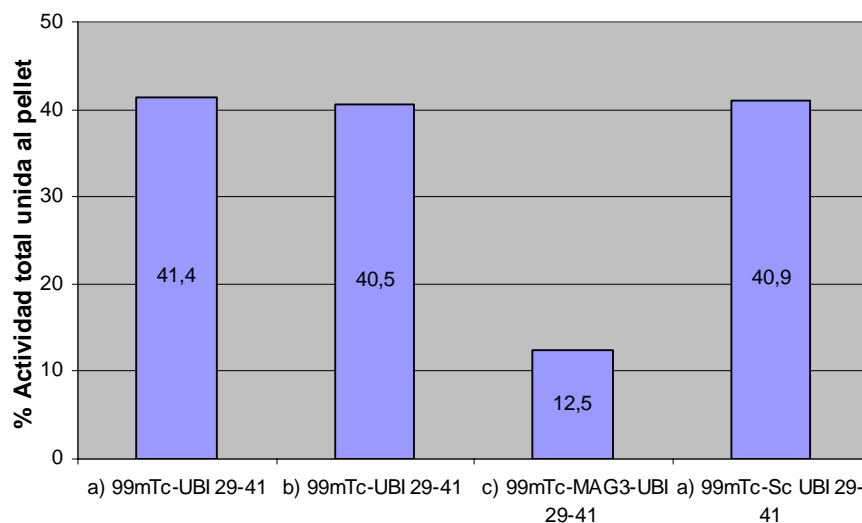
Fig. 27. Porcentaje de radioactividad total transquelada a cisteína para los tres complejos de UBI 29-41 radiomarcados y para el $^{99m}\text{Tc-Sc UBI 29-41}$.



3.4.2.3 Ensayo de unión de ^{99m}Tc-UBI 29-41 a *S.a.*

El conteo de colonias en placa correspondiente a las bacterias incubadas (*S.a.*) utilizadas en los estudios *in vitro* e *in vivo* arrojó un valor de $3 \cdot 10^8$ UFC / mL. Los ensayos de unión *in vitro* a *S.a.* mostraron diferencias significativas (Fig. 28) entre los métodos directos de radiomarcación (método a y b respectivamente) 41.4 y 40.5 % de la actividad total unida a bacterias y el método indirecto que produce ^{99m}Tc-MAG₃-UBI 29-41, 12,5 % de la actividad total unida a bacterias (método c). El valor para ^{99m}Tc-Sc UBI 29-41 (método a) fue de 40.9 %.

Fig. 28. Ensayo de unión *in vitro* de los complejos de ^{99m}Tc-UBI 29-41 a $1 \cdot 10^7$ UFC de *S.a.*



3.4.3 Estudios *in vivo*

3.4.3.1 Biodistribución de ^{99m}Tc-UBI 29-41 en ratones portadores de un sitio de infección con *S.a.*

La tabla 8 compara los resultados de las biodistribuciones de ^{99m}Tc -UBI 29-41 radiomarcado por tres métodos diferentes, dos directos y uno indirecto a 2 h p.i., en ratones NIH con un sitio de infección.

Organo	^{99m}Tc -UBI 29-41 mét. a	^{99m}Tc -UBI 29-41 mét. b	^{99m}Tc -MAG ₃ - UBI 29-41
Sangre	0,15 ± 0,11	0,12 ± 0,08	0,20 ± 0,03
Hígado	3,47 ± 2,50	2,00 ± 0,12	0,63 ± 0,17
Bazo	0,87 ± 0,82	0,19 ± 0,03	0,08 ± 0,01
Riñón	16,00 ± 5,33	13,64 ± 4,4	0,77 ± 0,13
Estóm.	0,20 ± 0,17	0,43 ± 0,35	0,37 ± 0,49
Intest.	1,23 ± 1,11	1,20 ± 0,39	3,43 ± 0,77
Pulmón	0,42 ± 0,36	0,21 ± 0,08	0,16 ± 0,05
P.N.	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
P.Infec.	0,14 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02

Tabla 8. Biodistribuciones de ^{99m}Tc -UBI 29-41 radiomarcado por tres métodos distintos en ratones infectados con *S.a.* viables (2 h p.i.).

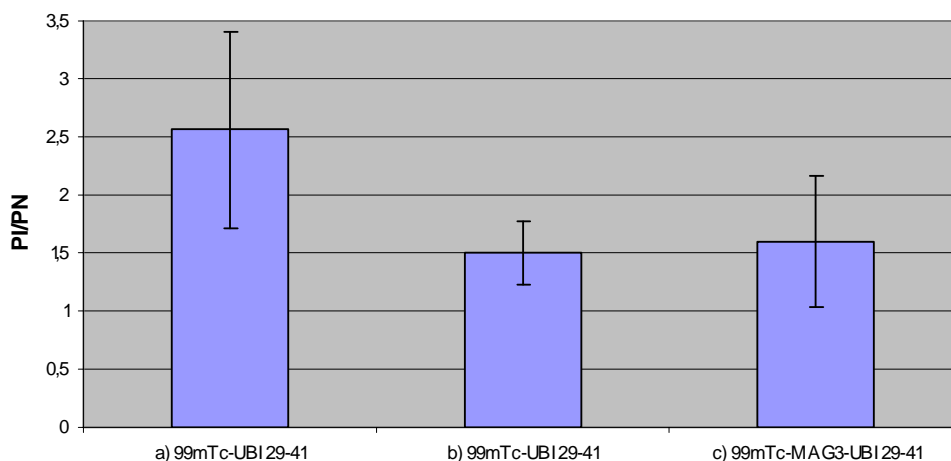
La tabla 9 muestra los resultados de la biodistribución de ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a), ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 (método a, control negativo) (2 h p.i.) y ^{99m}Tc -IgG (4 h p.i.) en ratones NIH infectados con *S.a.*

Organos	^{99m}Tc -UBI 29-41 met. a	^{99m}Tc -Sc UBI 29-41	^{99m}Tc - IgG
Sangre	0,15 ± 0,11	0,33 ± 0,08	6,70 ± 1,01
Hígado	3,47 ± 2,50	3,46 ± 0,45	2,95 ± 0,70
Bazo	0,87 ± 0,82	1,90 ± 0,12	1,43 ± 0,22
Riñón	16,00 ± 5,33	3,60 ± 0,71	8,03 ± 1,58
Estómago	0,20 ± 0,17	0,48 ± 0,10	1,70 ± 0,24
Intestino	1,23 ± 1,11	0,35 ± 0,06	2,20 ± 0,68
Pulmón	0,42 ± 0,36	0,47 ± 0,08	1,95 ± 0,18
P. normal	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,05
P. infectada	0,14 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,37 ± 0,13

Tabla 9. Biodistribuciones de ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) (2 h p.i.), ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 (2 h p.i.) y ^{99m}Tc -IgG (4 h p.i.) en ratones infectados con *S.a.* viables.

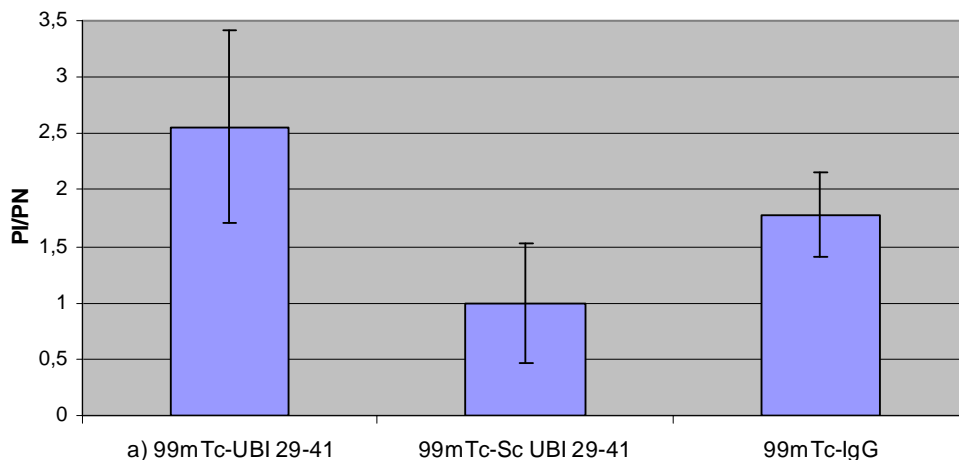
La figura 29 muestra la relación PI/PN (2 h p.i.) para infección con *S.a.* viables en ratones inyectados con UBI 29-41 radiomarcado ^{99m}Tc por tres métodos distintos. El valor PI/PN mas elevado (2.56) corresponde al ^{99m}Tc -UBI 29-41 radiomarcado por el método a.

Fig. 29. Relaciones PI/PN calculadas a partir de los valores de biodistribución de UBI 29-41 radiomarcado por tres métodos distintos, en ratones portadores de un sitio de infección con *S.a.* viables.



La figura 30 muestra la relación PI/PN para infección con *S.a.* viables usando $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) (2 h p.i.), $^{99m}\text{Tc-Sc UBI 29-41}$ (control negativo para infección) (2 h p.i.) y $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (control positivo para inflamación) (4h p.i.). Los resultados muestran que el valor PI/PN correspondiente al $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) (2.56 ± 0.27) es superior al PI/PN correspondiente al $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (1.78 ± 0.37). Además no se observan diferencias entre la acumulación en pata infectada y en pata normal para el péptido control $^{99m}\text{Tc-Sc UBI 29-41}$ (PI/PN 0.99).

Fig. 30. Relación PI/PN para $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a), $^{99m}\text{Tc-Sc UBI 29-41}$ (control negativo de infección) y $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (control positivo de inflamación).



3.4.3.2 Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ en ratones portadores de un sitio de inflamación estéril.

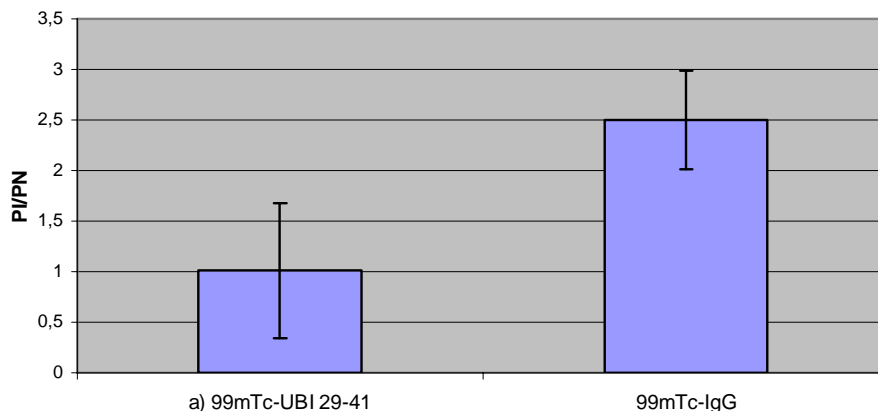
La tabla 10 muestra los resultados de la biodistribución de $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) (2 h p.i.) y $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (4 h p.i.) (control positivo para inflamación) en ratones NIH con inflamación estéril.

Órganos	^{99m} Tc-UBI 29-	^{99m} Tc-IgG.
Sangre	0,19 ± 0,09	9,58 ± 1,91
Hígado	2,75 ± 1,17	3,01 ± 0,57
Bazo	0,64 ± 0,59	2,87 ± 0,78
Riñón	20,91 ± 9,51	9,45 ± 1,36
Estómago	0,21 ± 0,10	2,26 ± 1,53
Intestino	1,35 ± 1,15	2,00 ± 0,58
Pulmón	0,42 ± 0,41	3,17 ± 0,80
Pata normal	0,36 ± 0,52	0,19 ± 0,04
Pata inflamada	0,30 ± 0,45	0,48 ± 0,26

Tabla 10. % D.I. /g de tejido para ^{99m}Tc-UBI 29-41 (método a) (2 h p.i.) y ^{99m}Tc-IgG (4 h p.i.) (control positivo para inflamación) en ratones NIH con inflamación estéril.

En la figura 31 se observa la relación PI/PN (2 h p.i.) para inflamación estéril en ratones inyectados con UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc por el método a y ^{99m}Tc-IgG (control positivo de inflamación)(4h p.i.).

Fig. 31. Relación PI/PN para ^{99m}Tc-UBI 29-41 (2 h p.i.) (método a) y ^{99m}Tc-IgG (4 h p.i.) en ratones NIH con inflamación estéril.



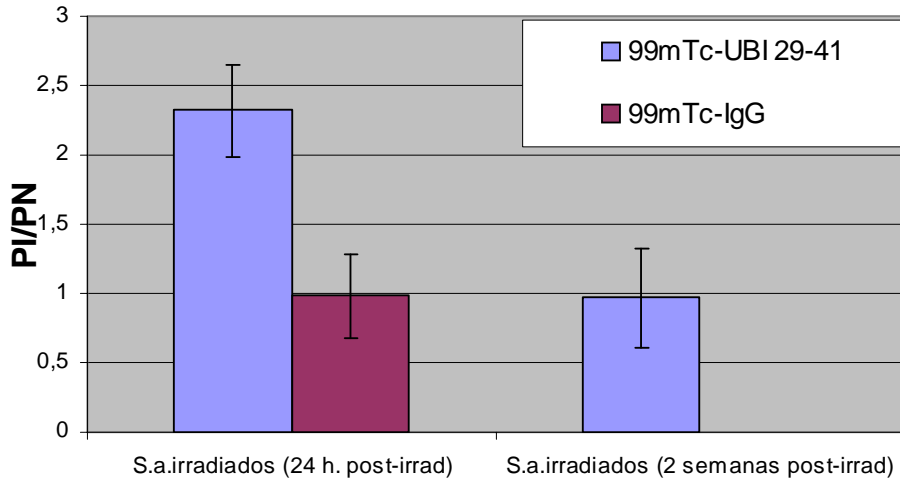
Los resultados muestran que ^{99m}Tc-UBI 29-41 (método a) (PI/PN 1.0) es incapaz de detectar una inflamación estéril debido a la ausencia de bacterias mientras que ^{99m}Tc-IgG (PI/PN 2.5) es un agente eficiente para la detección de inflamación estéril aunque actúe por un mecanismo inespecífico.

3.4.3.3 Cuantificación de los valores PI/PN para ^{99m}Tc-UBI 29-41(método a) a 2 h p.i. y de ^{99m}Tc-IgG a 4 h p.i. en ratones con *S.a.* no viables obtenidos por irradiación.

Se obtuvieron *S.a.* de 10⁸ UFC / mL (cuantificados por turbidimetría) no viables por irradiación con 2.5 KGy de rayos gamma (el D10 para *S.a.* en solución salina es 0.2 KGy). El recuento de bacterias en placa (Agar sangre) por 48 h resultó negativo y al igual que el crecimiento en medio líquido (tioglicolato) por 10 días. En la Fig. 32 se ven los valores PI / PN correspondientes a ^{99m}Tc-UBI 29-41 para *S.a.* irradiados (24 h. post-irradiación) 2.32 ± 0.33, para *S.a.* irradiados (2 semanas post-

irradiación) 0.97 ± 0.36 y los valores de PI / PN correspondientes a $^{99m}\text{Tc-IgG}$ fueron para S.a irradiados 0.98 ± 0.31 .

Fig. 32. Relaciones PI/PN para $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) y de $^{99m}\text{Tc-IgG}$ en ratones con S.a. no viables obtenidos por irradiación.



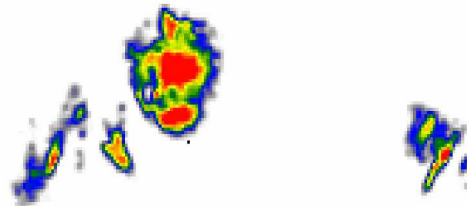
3.4.4 Adquisición de imágenes por autorradiografía digital y cálculo computerizado de la relación SI / SN

A continuación se presenta una fotografía digital de ambas patas de ratón (Fig. 33) y las imágenes adquiridas por autorradiografía digital correspondientes a $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) en patas de ratones infectados (Fig. 34) con S.a. viables, S.a. irradiados y S.a. muertos por calentamiento y las correspondientes a $^{99m}\text{Tc-IgG}$ en patas de ratones infectados (Fig. 35) con S.a. viables y S.a. irradiados.

Fig. 33. Fotografía digital de la disposición bidimensional de P.I. (izquierda) y P.N. (derecha) previamente a la autorradiografía.



Fig. 34. Autorradiografías digitales de $^{99m}\text{Tc-UBI 29-41}$ (método a) en patas de ratones infectados con S.a. viables, S.a. irradiados y S.a. muertos por calentamiento.



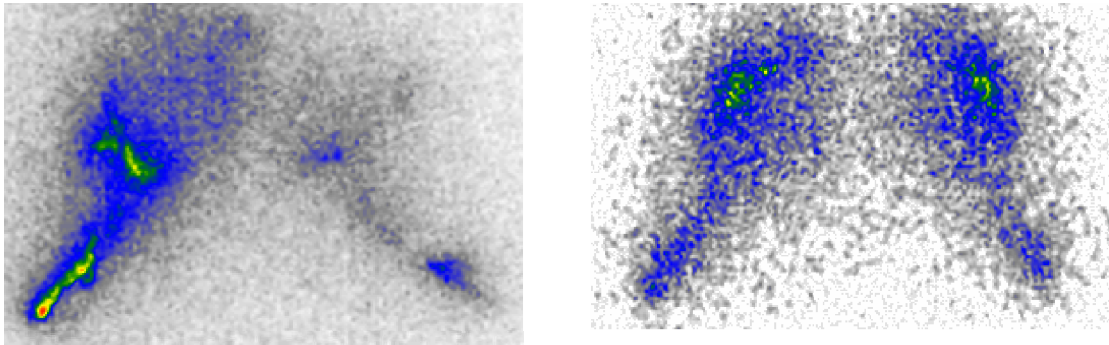
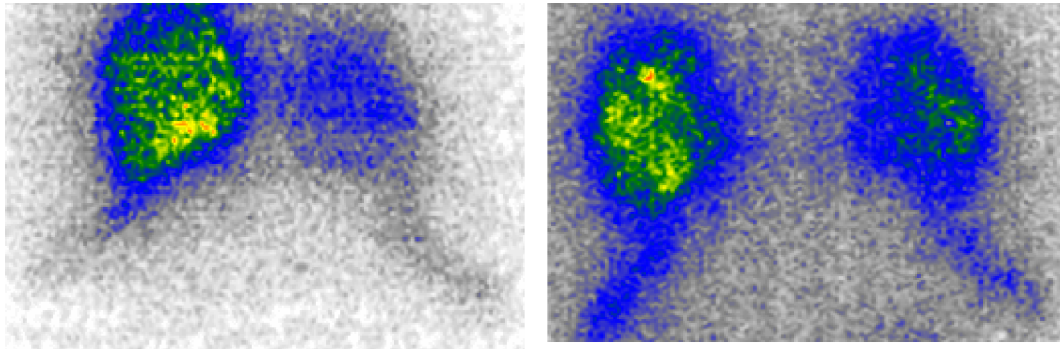


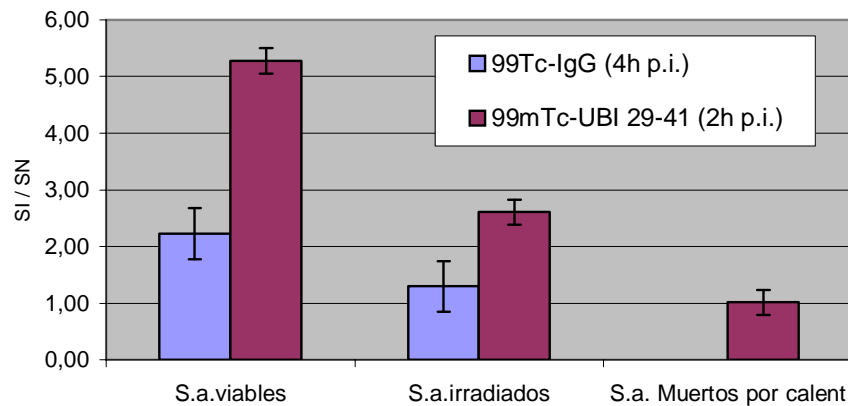
Fig. 35. Autorradiografías digitales de ^{99m}Tc -IgG en patas ratones infectados con *S.a.* viables y *S.a.* irradiados.



La comparación de autorradiografías digitales de infecciones producidas por *S.a.* con los dos radiofármacos muestra:

- 1) ^{99m}Tc -UBI 29-41 localización con la máxima captación en el sitio de infección (*S.a.* viables) y en lugares donde hay *S.a.* irradiados (24 h post irradiación). No se observa localización en sitios donde hay *S.a.* muertos por calentamiento.
- 2) ^{99m}Tc -IgG se observa captación difusa sin un punto focal tanto en los *S.a.* viables como en los *S.a.* irradiados. Se calcularon las relaciones SI / SN (Fig. 36) por selección y comparación de regiones de interés (ROIs) correspondientes a las imágenes arriba expuestas.

Fig. 36. Valores de SI / SN calculados en base a las autorradiografías digitales.



Se observan diferencias importantes entre los valores de PI/PN y SI/SN para un mismo animal, sin embargo es importante hacer notar que en el caso de PI/PN se compara el cociente de radioactividad medida en toda la pata mientras en SI/ SN se toma el cociente de la ROI de la región infectada contra la ROI de igual forma y área de la región contralateral habiendo previamente restado el valor de fondo a ambas ROI. El elevado valor de SI/SN obtenido para ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) con *S.a.* viables responde a una elevada acumulación del radiofármaco en un área muy pequeña de la pata y el valor 1.0 en *S.a.* muertos por calentamiento obedece a la no existencia de bacterias con la membrana intacta.

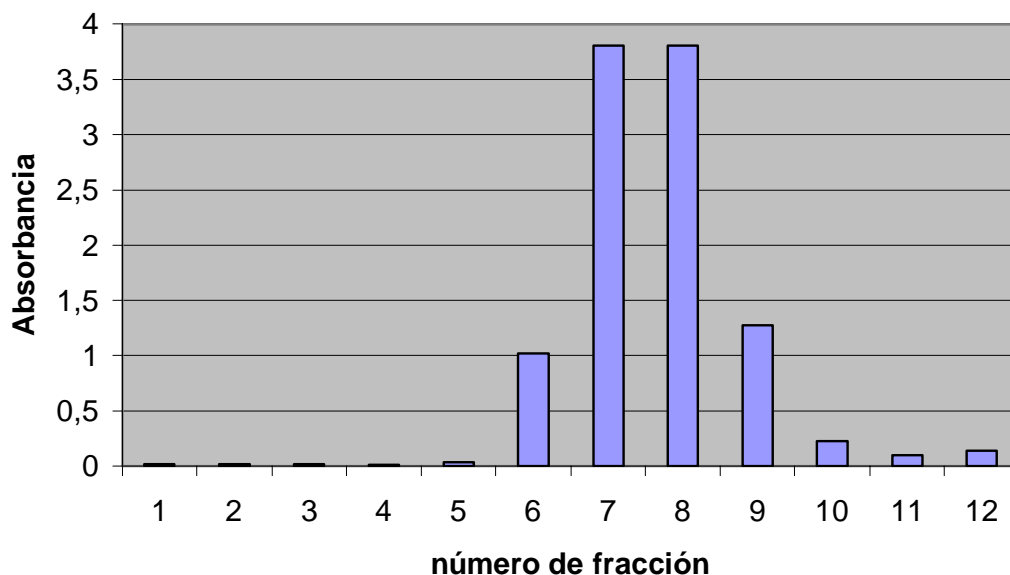
3.5 AcMos radiomarcados con ^{188}Re por métodos directos e indirectos

3.5.1 Marcación de AcMo anti-CD20 por método directo

3.5.1.1 Reducción del AcMo con 2-ME, purificación por columna y medición de la absorbancia a 280 nm.

En una experiencia típica el AcMo anti-CD20 (10 mg) fue reducido con 2-ME y purificado por columna Sephadex G-50 obteniéndose 12 fracciones de 1 mL. La primer fracción se tomó desde el comienzo del pasaje de líquido inmediatamente después de sembrada la muestra sobre el lecho de la columna. Alícuotas de 20 μL de cada fracción fueron diluidas a 1 mL (factor de dilución 50) y luego medidas en un espectrómetro UV/VIS a 280 nm obteniéndose los resultados graficados en la Fig. 37.

Fig. 37. Absorbancia de la fracciones obtenidas por purificación a través de columna Sephadex G-50 del AcMo reducido.



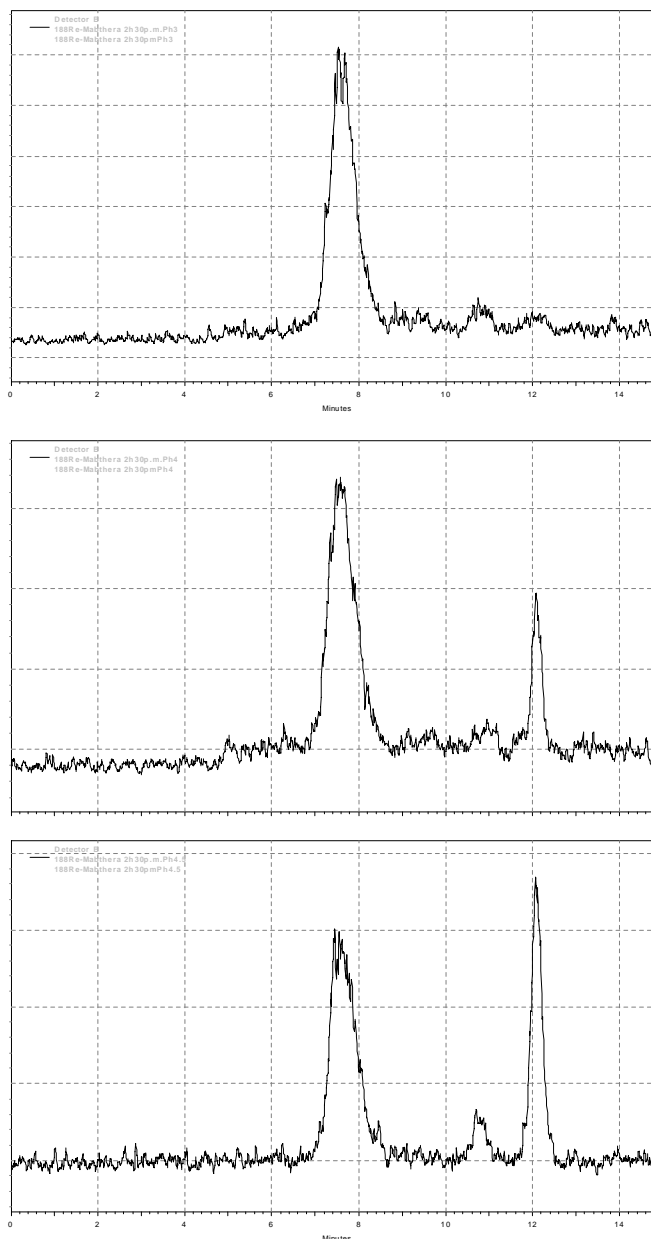
Teniendo en cuenta los resultados de la Fig. 37 fueron colectadas las fracciones 6 a 9 y posteriormente utilizadas para su marcación y / o liofilización según corresponda.

3.5.1.2 Optimización del rendimiento de radiomarcación de ^{188}Re -Rituximab en función de la variación del pH

Como consecuencia de disminuir el pH de marcación se obtuvo un aumento del rendimiento de radiomarcación de ^{188}Re -Rituximab (RT 7.8 min.) y consecuentemente

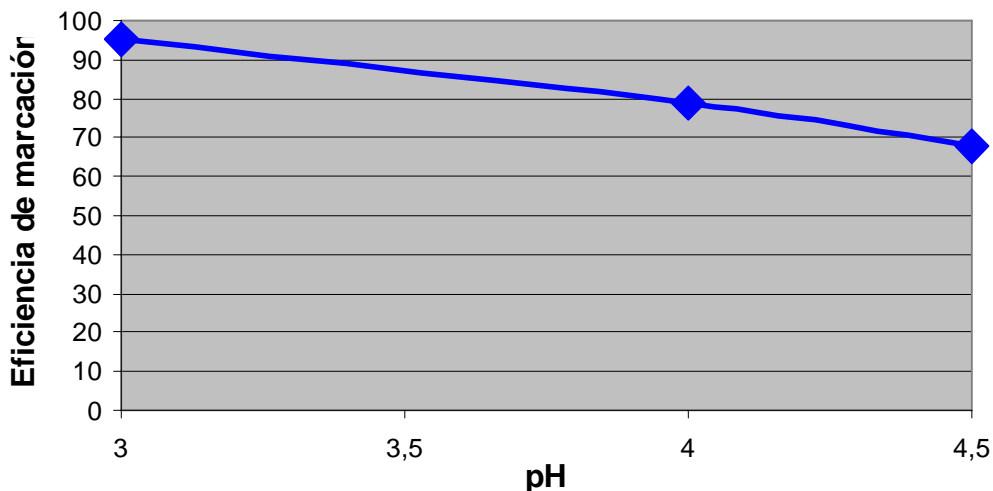
una disminución de perrenato (RT 12.3 min.) y de ^{188}Re -tartrato (10.6 min.). Esto se puede ver fácilmente comparando los tres radiocromatogramas correspondientes a pH final de marcación (3.0, 4.0 y 4.5) que se muestran en la Fig. 38.

Fig.38.
Radiocromatogramas HPLC correspondientes a ^{188}Re -Rituximab a 2 h 30 min. post marcación a pH 3.0, 4.0 y 4.5 respectivamente



Luego de integrar el área bajo la curva de los distintos picos de los radiocromatogramas, se obtuvo el valor de rendimiento correspondiente a cada pH observándose una disminución del rendimiento de radiomarcación de ^{188}Re -Rituximab (95.4%, 78.7% y 67.9%) en función de la elevación del pH final de marcación (3.0, 4.0 y 4.5) Fig. 40.

Fig. 39. Eficiencia de marcación de ^{188}Re -Rituximab vs pH de marcación



3.5.1.3 Marcación de un kit liofilizado de AcMo anti-CD20 reducido conteniendo reductor y transquelante

Debido a que esta parte del trabajo experimental se llevó a cabo en la etapa final de la vida útil del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ($t = 500$ días) los valores máximos de actividad eluida y por tanto de actividad de marcación fueron inferiores a los 31.45 MBq de ^{188}Re alcanzándose una actividad específica para el complejo de 30.71 MBq /mg (0.83 mCi / mg).

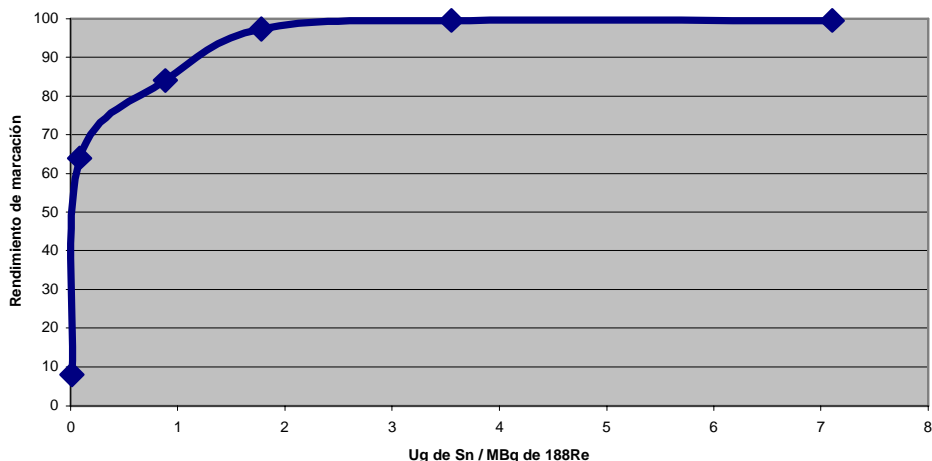
A diferencia del procedimiento de marcación aplicado en el punto anterior (3.5.1.2) en este caso se realizó un procedimiento cerrado, es decir que todo el proceso de reconstitución del kit, agregado del radionucleído y posterior incubación fue realizado en el frasco precintado manteniendo la atmósfera de nitrógeno, con lo cual disminuye la probabilidad de re-oxidación del radionucleído desde el estado reducido por efecto del oxígeno del aire.

3.5.2 Optimización de la marcación con $^{188}\text{Re-MAG}_3$ (método indirecto) usando como modelo IgG

3.5.2.1 Marcación de S-Bz-MAG₃ con ^{188}Re .

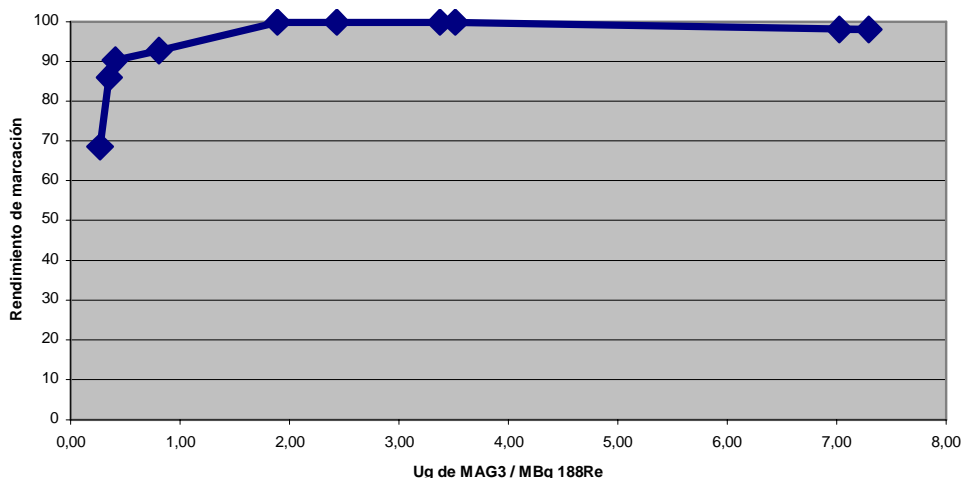
El primer paso de síntesis es la reducción de perrenato con Sn(II) usando citrato de sodio como ligando de transferencia. Cuando la relación de Sn : actividad de ^{188}Re fue mayor a 1.64 $\mu\text{g} / \text{MBq}$ (Fig. 40) fueron obtenidos rendimientos de marcación mayores al 95%.

Fig. 40. Influencia de la relación $\mu\text{g Sn} : \text{MBq de } ^{188}\text{Re}$ en el rendimiento de marcación de S-Bz-MAG₃.



Cuando la relación MAG_3 : actividad de ^{188}Re excedió $0.81\mu\text{g} / \text{MBq}$ (Fig. 41) se obtuvieron rendimientos casi cuantitativos. Fueron obtenidas Ae de hasta $8713.5 \text{ MBq/mg MAG}_3$ ($2960 \text{ MBq}/\mu\text{mol MAG}_3$).

Fig. 41. Influencia de la relación $\mu\text{g MAG}_3$: MBq de ^{188}Re en el rendimiento de marcación de S-Bz-MAG₃.



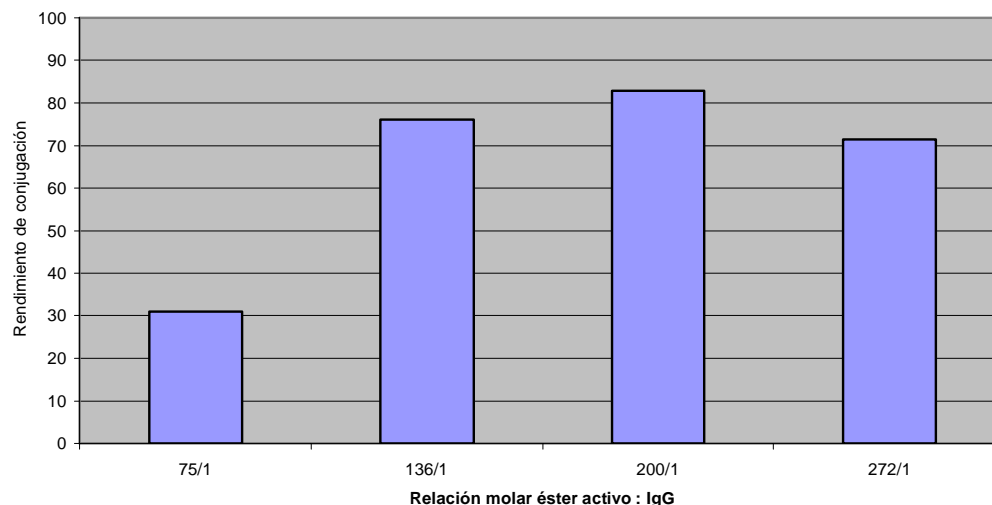
3.5.2.2 Esterificación de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ con TFP

El mejor rendimiento de esterificación fue obtenido con una relación molar 35 :1 (TFP : $^{188}\text{Re-MAG}_3$) en el cual el 92.5 % de la actividad total fue recuperada después de la purificación por Sep-Pak C18. El éster purificado (99 % de pureza) fue estable en acetonitrilo a temperatura ambiente por 24h sin pérdida de ^{188}Re .

3.5.2.3 Conjugación de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ -TFP a IgG.

En la Fig. 42 se muestran los resultados correspondientes al rendimiento de la reacción de conjugación de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ -TFP purificado a IgG para diferentes relaciones molares éster : IgG. La eficiencia máxima (82.8%) fue obtenida con una relación molar de 200:1, en cuyo caso la Ae de la IgG radiomarcada fue $9213 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$ (61.42 MBq/mg IgG). Agregados de proteínas no fueron detectados por HPLC cuando se trabajó bajo estas condiciones.

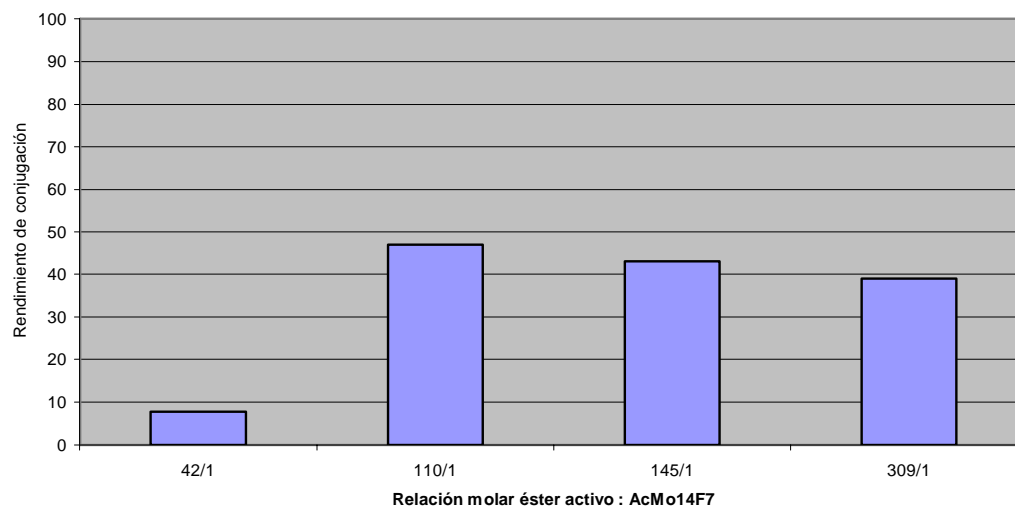
Fig. 42. Influencia de la relación molar éster : IgG en el rendimiento de conjugación.



3.5.3 Marcación de AcMo 14f7 usando $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$

Los resultados obtenidos correspondientes a la marcación de S-Bz-MAG₃ con ^{188}Re y a la esterificación de $^{188}\text{Re-MAG}_3$ con TFP son similares a los mostrados en 3.5.2.1 y 3.5.2.2 respectivamente. Los estudios de conjugación de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ purificado a AcMo 14f7 en función de la relación molar éster : AcMo (Fig. 43) son claramente inferiores a los obtenidos con IgG . La eficiencia máxima (46.9 %) fue obtenida con una relación molar de 110:1, en cuyo caso la Ae del AcMo radiomarcado fue 90.3 MBq / mg. Trabajando bajo estas condiciones, no fueron detectados agregados proteicos por HPLC.

Fig. 43. Influencia de la relación molar éster : AcMo 14F7 en el rendimiento de conjugación.



3.5.4 Determinación de los rendimientos de marcación por HPLC e ITLC-SG y de las Ae.

3.5.4.1 Determinación de los rendimientos de marcación por HPLC y de las Ae.

Los RT de RP-HPLC usando gradiente en columna de Deltapack C18 fueron 1.86, 11.59 y 15.90 min. para $^{188}\text{ReO}_4^-$, $^{188}\text{Re-MAG}_3$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ respectivamente, Fig. 44.

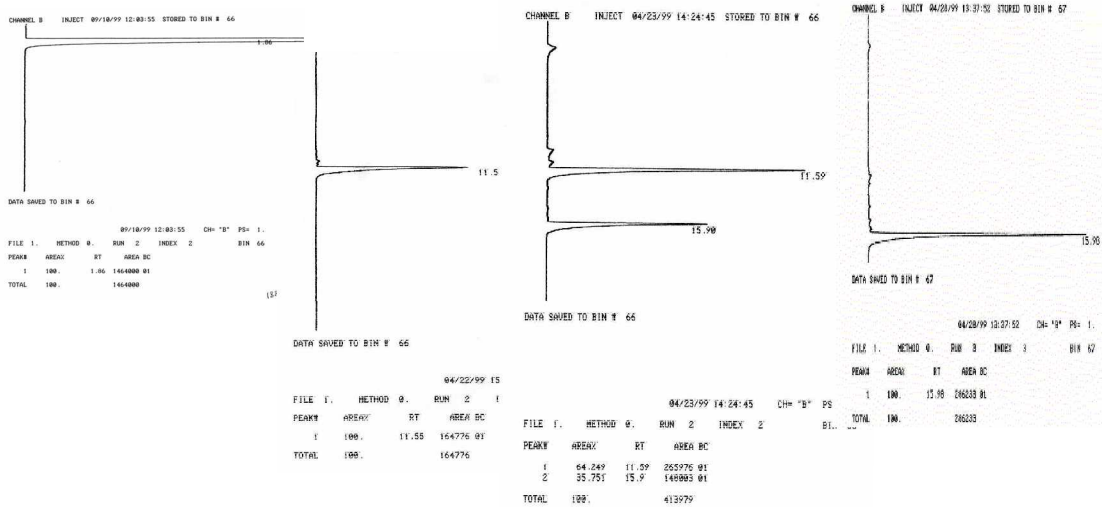
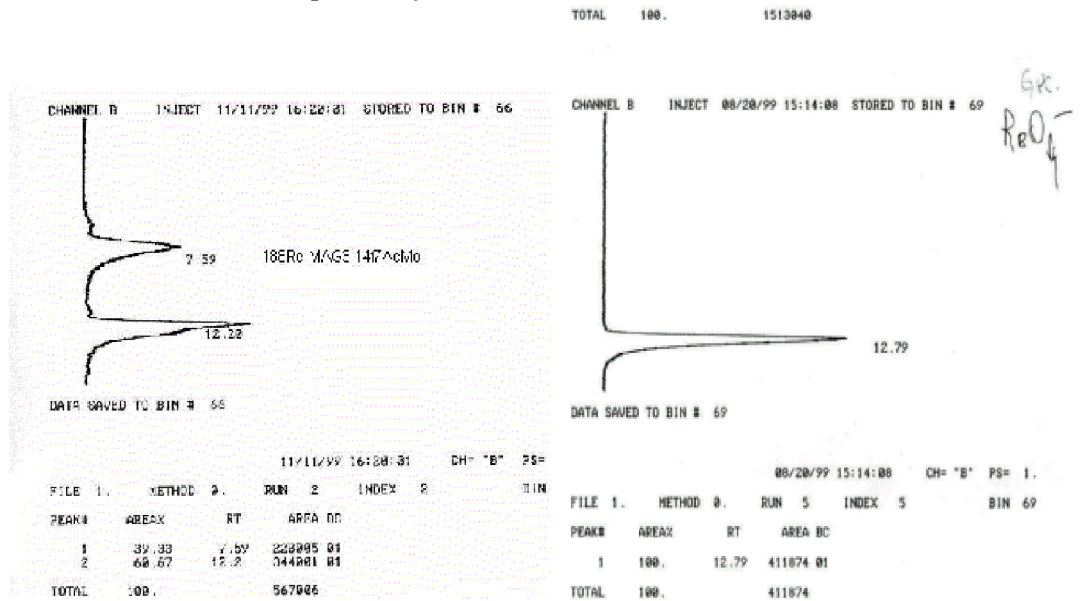


Fig. 44. Radiocromatogramas (de izquierda a derecha) de RP-HPLC para $^{188}\text{ReO}_4^-$, $^{188}\text{Re-MAG}_3$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$ sin purificar y purificado.

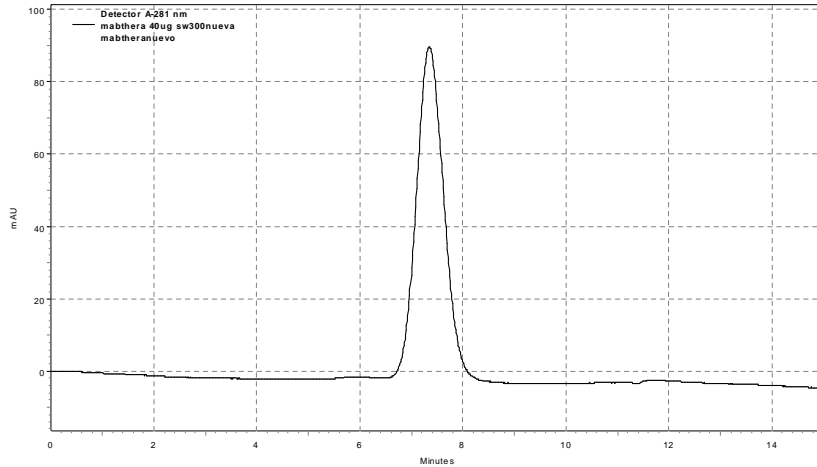
Los radiocromatogramas obtenidos usando una columna de Protein Pak SW300 (GPC-HPLC) se presentan en la Fig. 45 con RTs de 7.59 min. para $^{188}\text{Re-AcMo 14F7}$, 7.73 min. para $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$, 12.43 min. para el éster radiomarcado y 12.79 min. para $^{188}\text{ReO}_4^-$.

Fig. 45. Radiocromatogramas GPC-HPLC de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo14F7}$ con éster radiomarcado (izquierda) y $^{188}\text{ReO}_4^-$ (derecha)



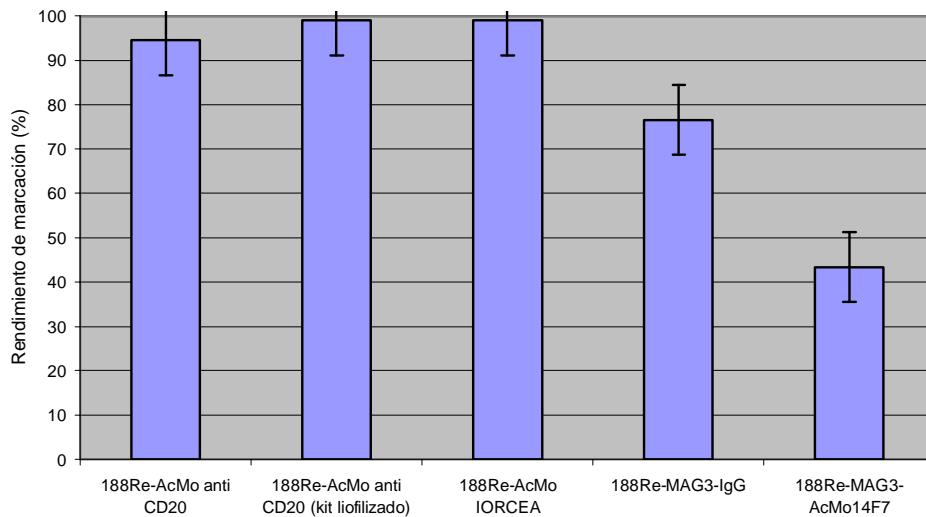
El cromatograma UV con el arreglo de diodos a 280 nm para 40 µg de Rituximab (Fig. 46) muestra la un solo pico a RT = 7.33 min. y ausencia de agregados y/o fragmentos de proteína.

Fig. 46. Cromatograma GPC-HPLC de Rituximab sin radiomarcarse



En la Fig. 47 se muestran los valores máximos de rendimiento de marcación obtenidos integrando el área bajo la curva de los radiocromatogramas GPC-HPLC correspondientes a la marcación directa con ^{188}Re de AcMo anti CD20 reducido ($n = 10$), del kit liofilizado de AcMo anti CD20 ($n = 7$) y de AcMo IORCEA ($n = 2$). Las últimas dos columnas de dicha figura corresponden a la marcación indirecta de IgG y AcMo14f7, cuyo cálculo de rendimiento total toma en consideración los rendimientos de marcación de S-Bz-MAG₃ (obtenido por RP-HPLC), esterificación con TFP (obtenido por RP-HPLC) y conjugación del éster activo a la proteína (obtenido por GPC-HPLC).

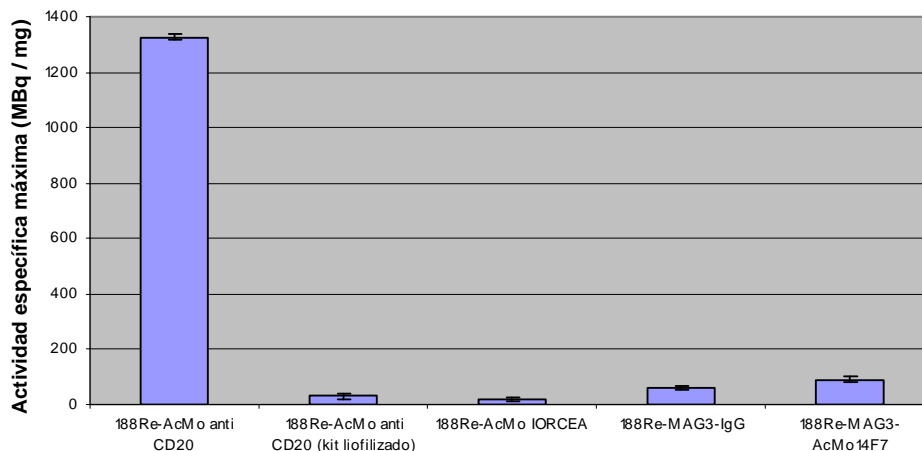
Fig. 47. Máximos rendimientos de marcación con ^{188}Re obtenidos para AcMo anti CD20 (reducido y kit liofilizado), AcMo IORCEA, IgG y AcMo14F7.



Las Ae máximas obtenidas fueron 1328.3, 30.7 y 21.5 MBq / mg para ^{188}Re -AcMo

anti CD20 (a partir de AcMo reducido), ^{188}Re -AcMo anti CD20 (kit liofilizado) y de ^{188}Re -AcMo IORCEA respectivamente. En la Fig. 48 se observan las máximas Ae correspondientes a todos los productos radiomarcados por vía directa e indirecta.

Fig. 48. Máxima Ae obtenida para cada anticuerpo radiomarcado.



3.5.4.2 Análisis por ITLC-SG

^{188}Re -AcMo anti-CD20 obtenido a partir de AcMo reducido y de AcMo liofilizado fue controlado también por ITLC-SG mostrando resultados similares a los obtenidos por GPC-HPLC.

3.5.5 Estudios *in vitro*

3.5.5.1 Estabilidad en SF y en suero

En la Fig. 49a se presentan los radiocromatogramas HPLC correspondientes a los ensayos de estabilidad de ^{188}Re -AcMo anti-CD20 (radiomarcado por método directo) en SF (izquierda) y en suero humano (derecha) a 0, 2 y 4 h. Se puede apreciar claramente en los radiocromatogramas de estabilidad en SF una disminución del área del pico correspondiente al AcMo radiomarcado (RT 7.60 min.) y un aumento del área correspondiente al pico de perrenato (12.08 min.) en función del tiempo. Mientras que en los radiocromatogramas de estabilidad en suero humano se observa una pequeña disminución del área del pico correspondiente al AcMo radiomarcado (RT 7.60 min.) y un leve aumento del área correspondiente a los picos de perrenato (12.08 min.) y de proteínas del suero radiomarcadas (RT 4.90 min.) en función del tiempo.

En la Fig. 49b se presentan los cromatogramas UV HPLC que muestran un único pico de anticuerpo a RT 7.60 min (estabilidad en SF, izquierda) y picos a RT 4.90 min, RT 7.60 min y 8,40 min. correspondientes a proteínas de alto peso molecular, anticuerpo y proteínas de menor peso molecular del suero respectivamente (estabilidad en suero, derecha)

Fig. 49. a Radiocromatogramas HPLC de ^{188}Re -AcMo anti-CD20 (radiomarcado por método directo) en SF (izquierda) y en suero humano (derecha) a 0, 2 y 4 h respectivamente.

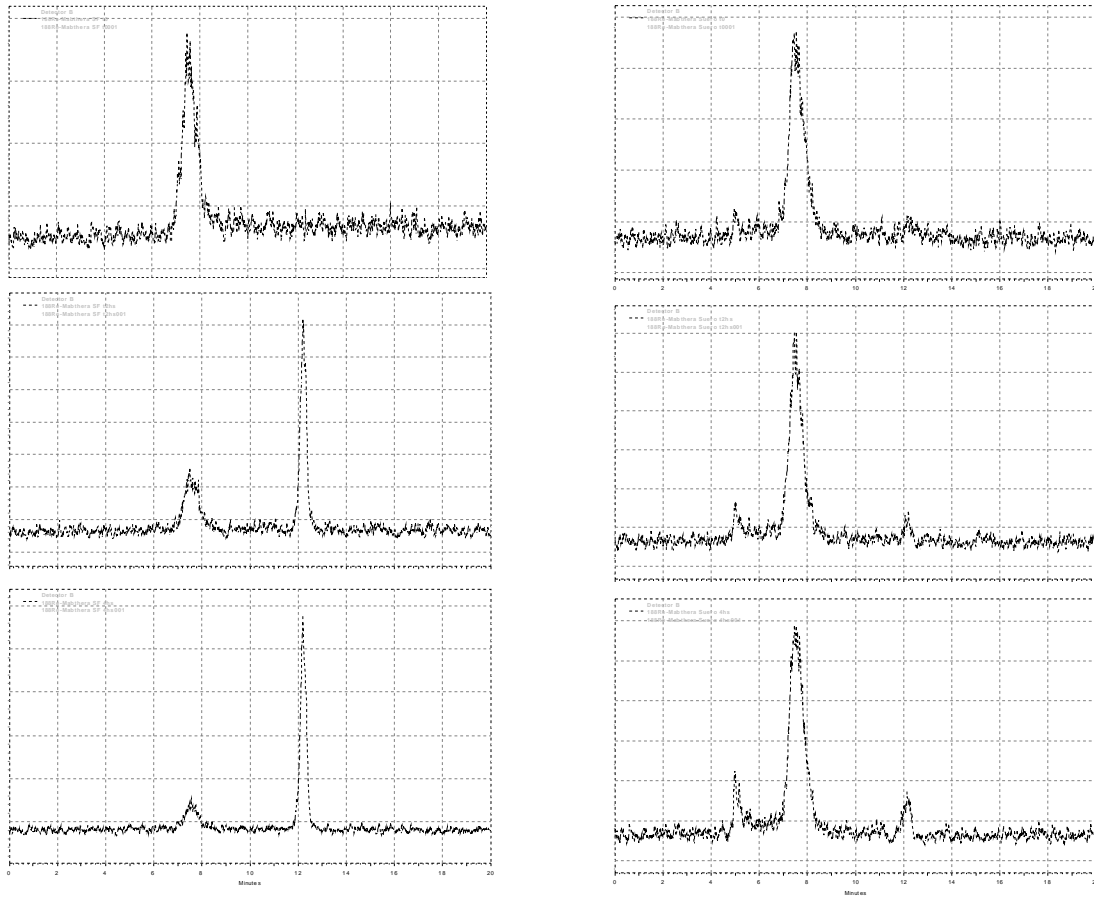
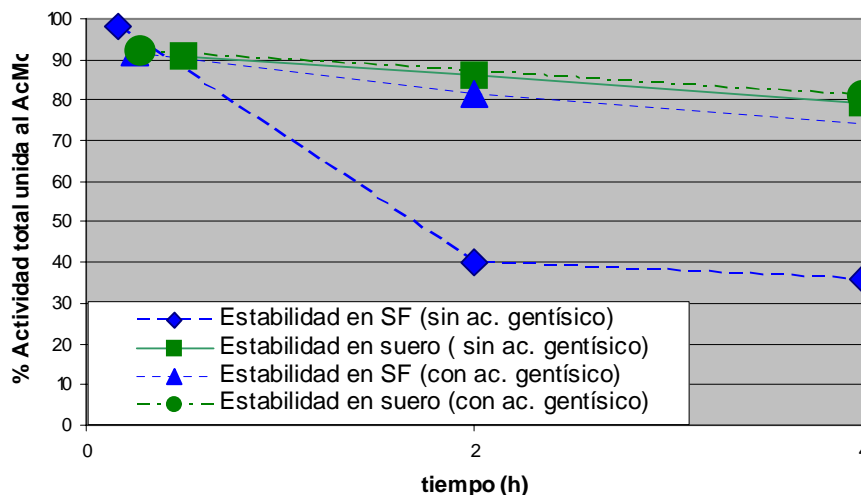


Fig 49 b Cromatogramas UV HPLC de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 (radiomarcado por método directo) en SF (izquierda) y en suero humano (derecha) a tiempo 0 h.

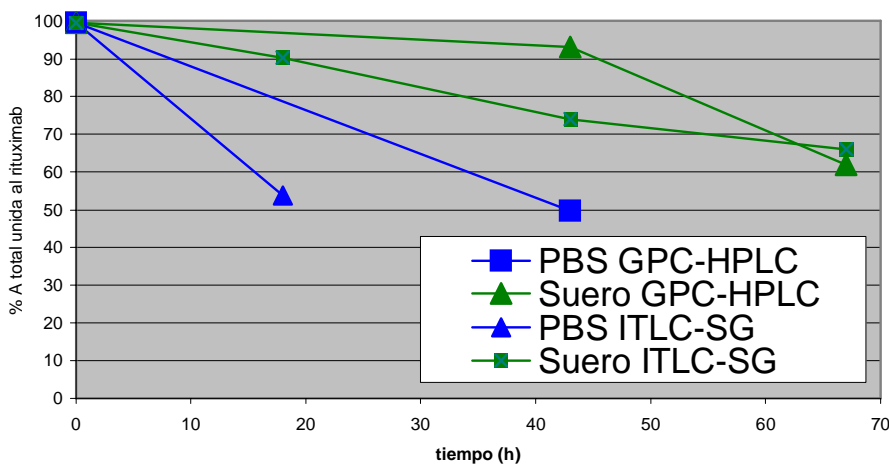


Como se muestra en la Fig. 50, la estabilidad de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 en SF (líneas azules) aumenta en presencia de ácido gálico y no se modifica por el ácido gálico en el caso del suero humano (líneas verdes) (Ver discusión). La estabilidad en suero fue del 80 % a 4 h con un 10 % de actividad asociada a las proteínas del suero. La estabilidad en SF con ácido gálico fue un 100 % superior a la estabilidad en SF sin ácido gálico a 2 h.. Fig. 50. Estabilidad de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 en SF y en suero humano con y sin ácido gálico a 4 h.



En la Fig. 51 se presentan los resultados de estabilidad de ¹⁸⁸Re-AcMo anti-CD20 (kit liofilizado) en PBS y suero humano a más de 45 h, determinada por GPC-HPLC e ITLC-SG.

Fig. 51. Estabilidad de ¹⁸⁸Re-AcMo anti-CD20 (kit liofilizado) en PBS (color azul) y suero humano (color verde) determinada por GPC-HPLC e ITLC-SG.



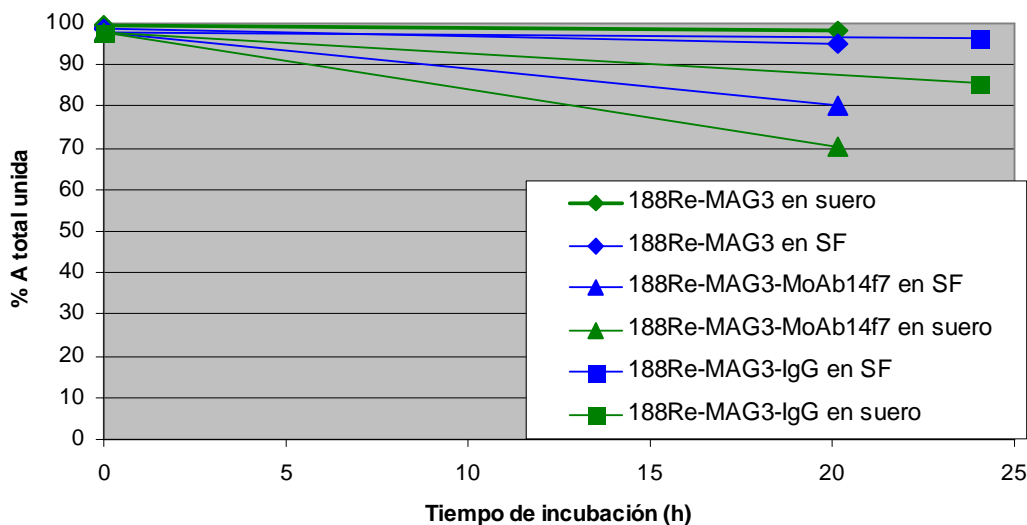
Los resultados de la estabilidad *in vitro* de ¹⁸⁸Re-MAG₃, ¹⁸⁸Re-MAG₃-IgG y ¹⁸⁸Re-MAG₃-AcMo 14F7 se muestran en la Fig. 52. Más del 96% de la actividad de ¹⁸⁸Re-MAG₃ fue recuperada (RP-HPLC) después de la incubación en SF y suero humano por 20 h a temperatura ambiente.

En forma similar 96.2% y 85.5% de la actividad permaneció unida a IgG-MAG₃ (GPC-HPLC) después de la incubación en SF y suero respectivamente. Los valores obtenidos analizando por ITLC-SG fueron consistentes con esos resultados (valores no mostrados). El análisis por HPLC demostró que posteriormente a la incubación en SF el 3.8% de la actividad total estuvo presente como ¹⁸⁸Re o ¹⁸⁸Re-MAG₃. Cuando ¹⁸⁸Re-MAG₃-IgG fue incubado con suero humano el 14.3% de la actividad estuvo asociada con las proteínas del suero (RT = 5.0-5.5 min.).

El 80.0% y el 70.3% de la At permaneció unida a MAG₃-AcMo 14F7 (GPC-HPLC) después de la incubación por 20 h en SF y suero humano respectivamente. Los valores

obtenidos analizando por ITLC-SG fueron consistentes con esos resultados (valores no mostrados).

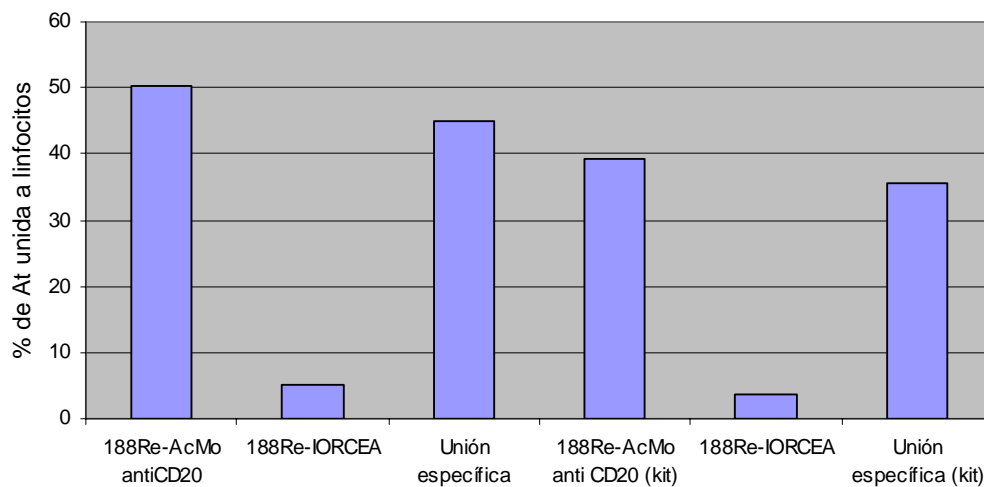
Fig. 52. Estabilidad de $^{188}\text{Re-MAG}_3$, $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo 14F7}$ en SF (color azul) y suero humano (color verde) determinada por GPC-HPLC.



3.5.5.2 Ensayo de reconocimiento biológico para $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 obtenido a partir de AcMo reducido y de kit liofilizado.

En la Fig. 53 se observan los valores de dos experiencias de unión a linfocitos B para $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 (a partir de AcMo reducido) y $^{188}\text{Re-AcMo}$ IORCEA (unión inespecífica) y para $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 (a partir kit liofilizado) y $^{188}\text{Re-AcMo}$ IORCEA (unión inespecífica). El valor de unión específica para $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 (kit) es un 9.6 % inferior al correspondiente a $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 (a partir de AcMo reducido).

Fig. 53. Ensayo de unión específica a linfocitos B. $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 obtenido a partir de AcMo reducido vs $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti-CD20 obtenido de kit liofilizado.



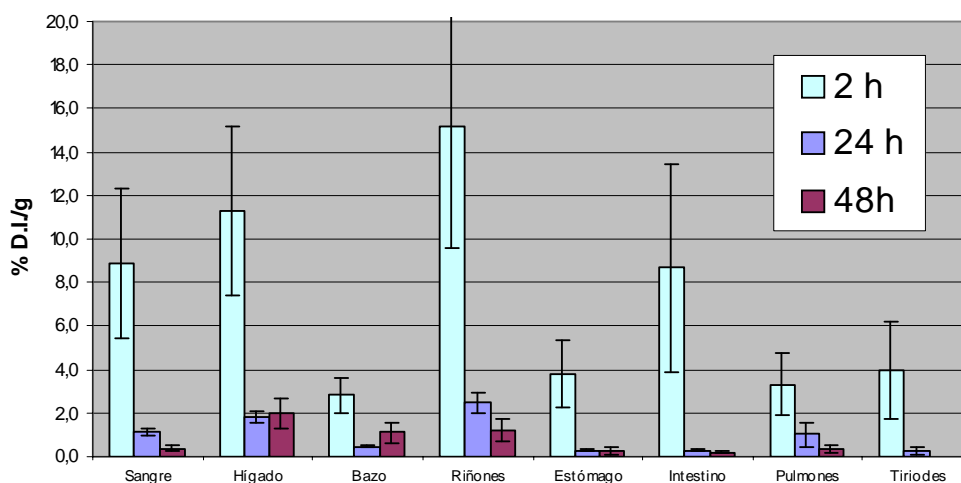
3.5.6 Estudios *in vivo*

3.5.6.1 Biodistribución de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 en ratones normales.

En la Fig. 54 se presentan los resultados de la biodistribución de $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 en ratones NIH normales ($n = 3$) a 2, 24 y 48 h p.i. El producto fue radiomarcado a partir de AcMo reducido, fue adicionado ácido gentísico en su formulación, llevado a un pH final de 7 con NaOH 0.1 N y filtrado por membrana de 0.22 μm . La Ae alcanzó 173.9 MBq / mg de AcMo.

Se observa que los órganos críticos para la captación de perrenato, a saber, estómago y tiroides (ver 3.2) tienen un 4.0 % D.I. / g de tejido a 2 h p.i.

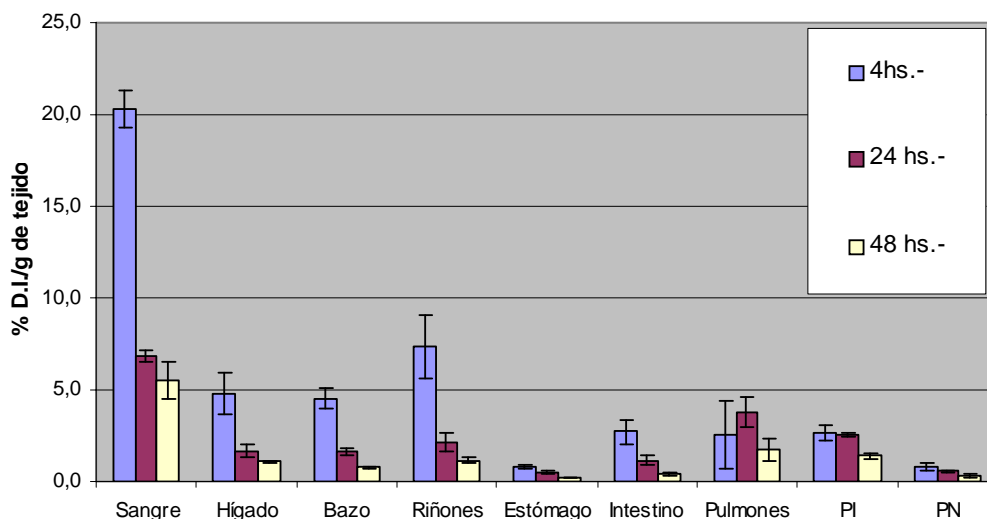
Fig. 54. Se muestran los resultados correspondientes a biodistribuciones en ratones normales de $^{188}\text{Re-Rituximab}$ a 2, 24 y 48 h p.i.



3.5.6.2 Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ en ratones NIH portadores de un sitio de inflamación

La captación de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ en hígado y riñón fue similar y más elevada que en la mayoría de los órganos, indicando una excreción combinada hepática y renal. Las tasas de depuración para hígado y riñón fueron similares a la de sangre (Fig. 55). Patas inflamadas (PI) presentaron menor depuración que los otros órganos. Las diferencias de captación entre PI y PN fueron casi constantes en el tiempo mientras la relación PI/PN fue similar en los distintos tiempos.

Fig. 55. Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ en ratones NIH con un sitio de inflamación a 4, 24 y 48 h p.i.

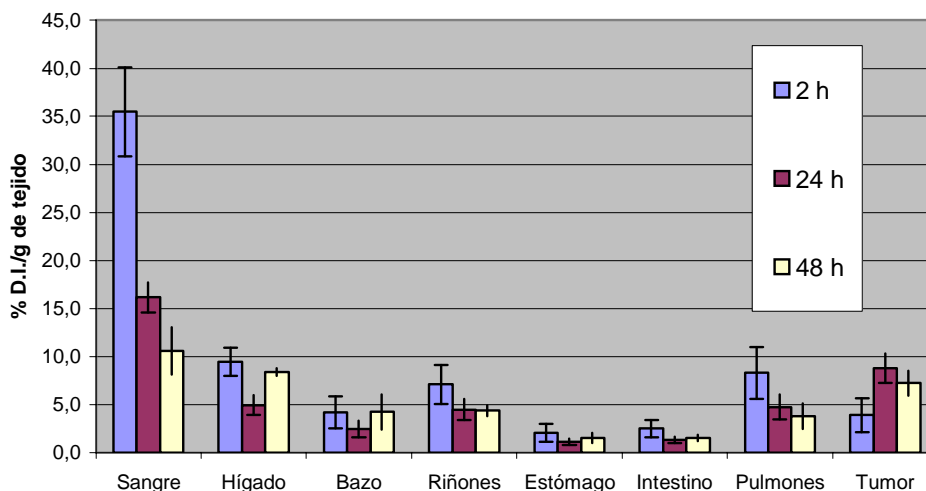


3.5.6.3 Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo 14f7}$ en ratones C57 portadores de células de melanoma B16F0

En la Fig. 56 se presentan los resultados de la biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo 14f7}$ en ratones C57 (n = 3) portadores de células de melanoma B16F0, a 2, 24 y 48 h p.i.

Se observa que uno de los órganos críticos para la captación de perrenato, a saber, estómago (ver 3.2) tiene un % D.I./ g de tejido inferior al 4.0 % a las 2 h p.i., indicando una muy buena estabilidad *in vivo* del $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo 14f7}$.

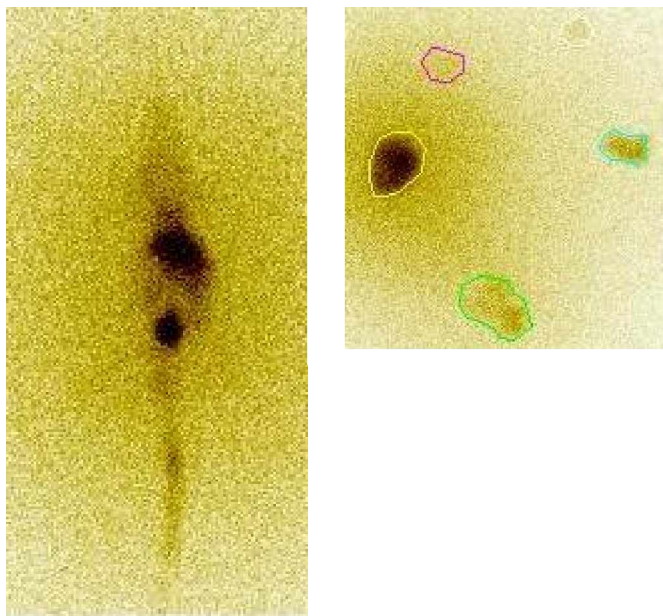
Fig. 56. Biodistribución de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-AcMo 14f7}$ en ratones C57 portadores de células de melanoma B16F0 a 2, 24 y 48 h p.i



3.5.7 Imágenes obtenidas por cámara γ

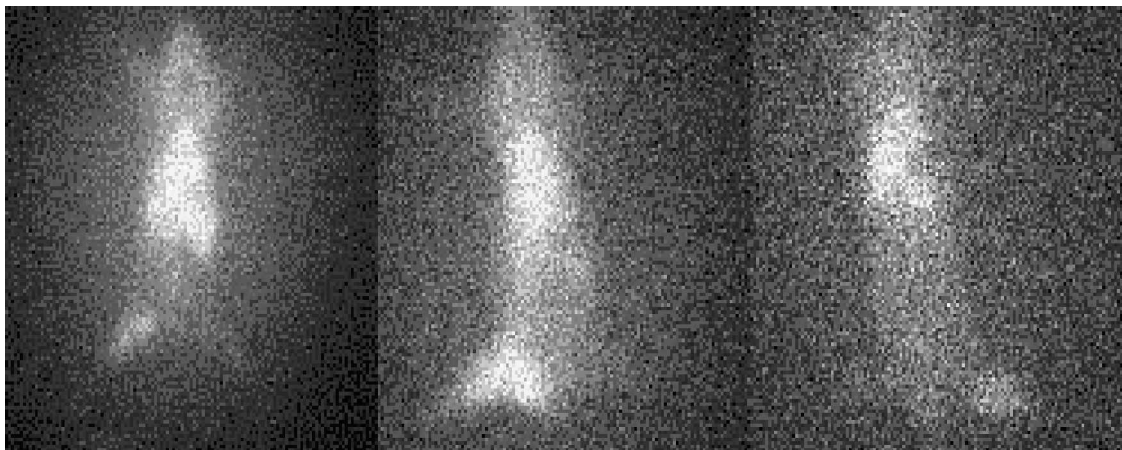
Las imágenes de cámara gamma de los ratones NIH normales, inyectados por la vena de la cola con $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 (2h p.i.) se muestran en la Fig. 57 (izquierda). En la Fig. 57 (derecha) se observan las imágenes de los órganos de ratones NIH resecados a saber, hígado, riñones e intestino todos ellos con elevada densidad de cuentas (cuentas / pixel) y con menor densidad estómago y bazo.

Fig. 57. Imágenes de cámara γ de ratones normales inyectados con $^{188}\text{Re-AcMo}$ anti CD20 (izquierda) y de sus órganos *ex vivo* a las 2 h p.i. (derecha) comenzando por hígado en la posición (9 menos cuarto) y finalizando en bazo (yendo en contra de las agujas del reloj).



Las imágenes de cámara gamma de los ratones NIH portadores de inflamación en la pata derecha, inyectados con $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ se muestran en la Fig. 58. La PI se evidencia claramente y los datos de la imagen son consistentes con los resultados de la biodistribución.

Fig. 58. Se observan las imágenes adquiridas en cámara gamma de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ en ratones NIH portadores de inflamación a 4, 24 y 48h p.i.. (izquierda, centro y derecha respectivamente.)



3.6 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y

3.6.1 Marcación de Biocitina y Norbiotinamina usando $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-TFP}$

Para el caso de Biocitina solo hubo una sola relación molar (3.6 :1).

Para el caso de Norbiotinamina la mayor eficiencia de marcación se obtuvo cuando la relación molar derivado de biotina : éster activo fue 25:1. La Ae máxima fue 141.4 MBq / μmol .

3.6.2 Marcación de conjugado DOTA-biotina con ^{90}Y

La Ae obtenida fue 3.08 MBq / μg de DOTA-biotina.

3.6.3 Determinación de los rendimientos de marcación por HPLC, FPLC e ITLC-SG

Los RT de GPC-HPLC usando columna Superdex 200 fueron 14.2 min. y 21.8 min. para $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina-Avidina}$ y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ respectivamente. La eficiencia de marcación de esta última fue 72.2 %.

El RT de RP-HPLC para $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Biocitina}$ fue de 12.44 min. con una eficiencia del 88 %.

El rendimiento de marcación de $^{90}\text{Y-DOTA-biotina}$ determinado por FPLC e ITLC-SG fue 97.0 y 99.3 % respectivamente.

3.6.4 Estudios *in Vitro*

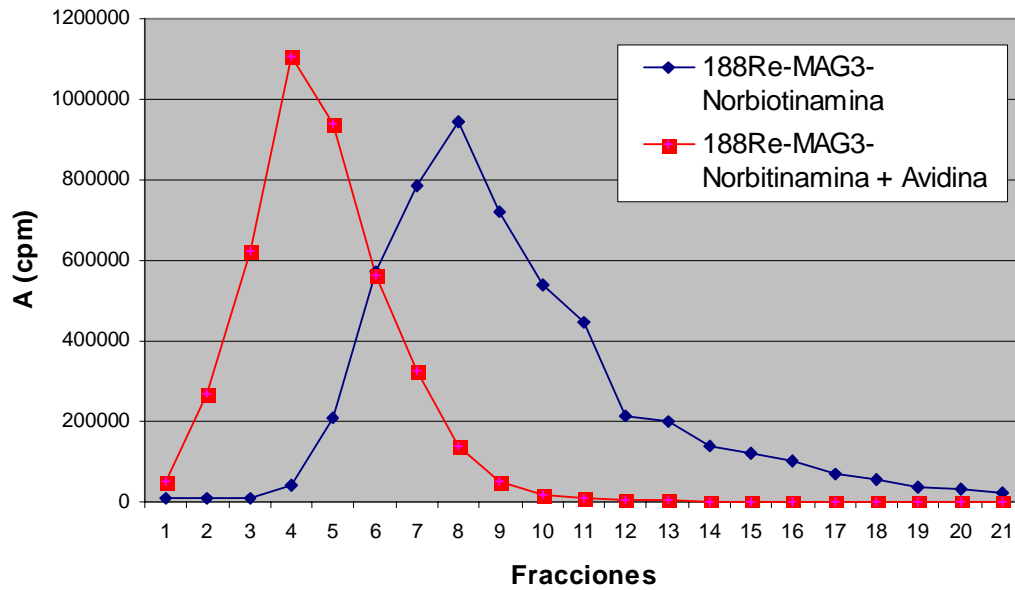
3.6.4.1 Estabilidad en SF y en suero

La estabilidad de $^{90}\text{Y-DOTA-biotina}$ en suero a 23 y 136 h determinada por ITLC-SG fue de 79.7 y 88.1 % respectivamente. La diferencia de valores tiene que ver con el error de medición debido a la escasa radioactividad remanente a 136 h. Con el FPLC se probó primero sin y luego con agregado de EDTA-Avidina, para diferenciar el eventual ^{90}Y libre del unido a transferrina.

3.6.4.2 Ensayo de unión de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ a avidina

La actividad de unión a biotina informada por el fabricante es 143 unidades / mL y cada unidad de avidina une 1 μg de biotina, es decir que 50 μl de esa avidina unen 7 μg de biotina y no 25 μg (masa calculada de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$), por lo cual estamos ante un caso de defecto de avidina y consecuentemente se debería observar parte de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ libre. El ensayo de unión *in vitro* muestra, por esta razón, una unión incompleta a la avidina. También se observa buena estabilidad del complejo formado después de 18 h de incubación en SF. En la siguiente experiencia, se trabajó en condiciones de exceso de avidina por tanto en la Fig. 59 se observa la Amax de la curva de elusión en columna Sephadex 25 en la fracción 4 correspondiente al complejo $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina-Avidina}$ (unión completa) y en la fracción 8 la A max correspondiente a $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$

Fig. 59. Perfiles de elusión de $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina-avidina}$ (en color rojo) y $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ (color azul) y.



3.6.4.3 Ensayo de unión de ^{90}Y -DOTA-biotina a avidina

En esta experiencia la avidina se encontraba en exceso (casi 11 veces mayor) es decir alcanzaba para unir 14 μg de biotina y había aprox. 0.12 μg . Por tal motivo la reacción fue completa, es decir que toda la ^{90}Y -DOTA-biotina se unió a la avidina en exceso.

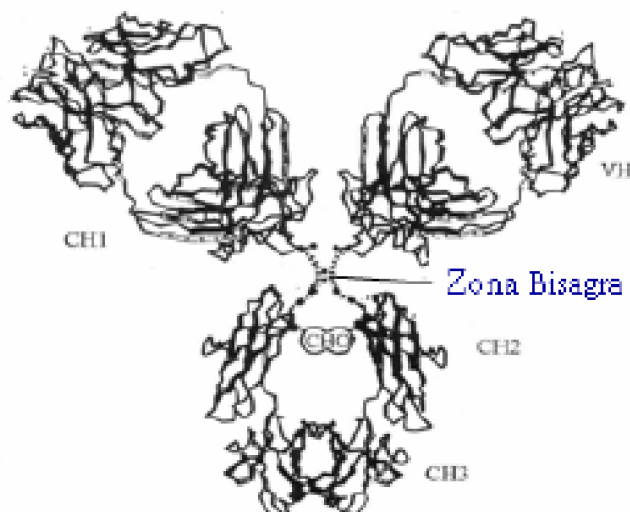
IV. DISCUSIÓN

4.1 Radiomarcación de IgG con ^{99m}Tc

La combinación de bajo costo, disponibilidad, adecuado período de semidesintegración, energía del fotón apropiada para la obtención de excelentes imágenes con cámara gamma, favorable dosimetría y elevada Ae, hacen del ^{99m}Tc el radionucleído de elección para la aplicación en medicina nuclear. El anión pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) en concentración nanomolar es la forma química estable en solución acuosa que se obtiene al eluir el generador comercial de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, sin embargo en presencia de ligandos y agentes reductores, el pertecnetato Tc (VII) puede ser reducido para dar complejos estables con estados de oxidación inferiores.

Reducción de la proteína: Hay 35 puentes disulfuro como residuos cisteína presentes en cada molécula de IgG (Fig. 60) ($1.4 \cdot 10^{14}$ puentes disulfuro / μg de IgG) y $1.4 \cdot 10^{14}$ átomos en 7400 MBq de ^{99m}Tc libre de portador. Entonces 1000 μg de IgG pueden radiomarcarse eficientemente con 7400 MBq (200 mCi) de ^{99m}Tc , reduciendo menos del 1 % de sus puentes disulfuro (asumiendo una reducción uniforme de cada molécula de anticuerpo). Es decir que es posible regular la reducción de grupos disulfuro eliminando el riesgo de fragmentación proteica y obtener una elevado rendimiento de radiomarcación. Experimentalmente se observó que la radiomarcación de IgG sin reducir (marcación inespecífica), produjo rendimientos de marcación inferiores al 10 % para las dos formulaciones ensayadas (ver 3.3.1.2 y 3.3.2) y pobre estabilidad (uniones inestables en sitios de baja afinidad). Cuando el agente reductor (DTT o 2-ME) estuvo en exceso (relación molar 2000:1) se produjeron fragmentos radiomarcados (datos no publicados) de peso molecular inferior a la proteína nativa, con un perfil de biodistribución en ratones distinto al de ^{99m}Tc -IgG. En cambio, relaciones molares de 500: 1 (2-ME : IgG) permitieron obtener elevados rendimientos de marcación sin la producción de fragmentos proteicos. Algunos autores sugieren el uso de fosfinas (xlviii) y otros de ácido ascórbico(xlix) (relación molar 3500:1), probablemente por que este último reductor no requiere ser separado por purificación de la proteína reducida, sin embargo la aplicación en nuestro laboratorio de ese método produjo bajos rendimientos de radiomarcación (alrededor del 23 %).

Fig. 60. Modelo de IgG tomado por cristalografía de Rx



Para que tenga lugar la reducción de los puentes disulfuro de la proteína por el método de fotoactivación son necesarias una breve exposición (10 min.) a la luz UV bajo condiciones de completa ausencia de O₂ (que se consigue nitrogenando el vial de reacción) y la presencia de Sn²⁺, sin el cual no se produce un proceso eficiente de reducción.. El mecanismo exacto de este proceso no es conocido, pero una consecuencia indeseada es que el aa aromático triptofano presente en la proteína absorbe luz UV en la región de 295-300 nm, pudiendo originar algún tipo de reacción fotoquímica. Los efectos más importantes de la fotoactivación observados sobre los Acs son dos:

i) una degradación de la proteína más rápida en el organismo, como muestran los resultados de depuración sanguínea a 4 y 24 h p.i. (3.3.5 Tabla 7) favorables a ^{99m}Tc-IgG fotoactivada vs ^{99m}Tc-IgG reducida por 2ME.

ii) una disminución de la inmunoreactividad en AcMos radiomarcados con ^{99m}Tc por fotoactivación respecto de los mismos AcMos radiomarcados por reducción con 2-ME. Los valores promedio de fracción inmunoreactiva publicados (1) por Mather (St Bart's Hospital, United Kingdom) fueron 77 y 93 % respectivamente. Sin embargo este parámetro no se considera crítico en los productos para la detección de inflamación como ^{99m}Tc-IgG debido a que como se discutirá mas adelante los mecanismos propuestos de acumulación en sitios inflamados / infectados son de tipo inespecífico.

Condiciones de radiomarcación: El ^{99m}Tc reducido por Sn²⁺ en el caso del kit de IgG liofilizado, se estabiliza formando primero un complejo débil con el MDP y luego se transquela formando uniones -S-Tc con los sulfhidrilos de la proteína reducida. La influencia de la relación de Sn :IgG en cada método de marcación es crítica, observándose experimentalmente que por exceso o defecto de reductor se generan como impurezas radioactivas ^{99m}Tc-reducido-hidrolizado o ^{99m}Tc-libre respectivamente. También se observa que para marcar en forma óptima 500 µg de IgG por el método de fotoactivación se requieren aproximadamente 6 veces mas Sn (25 µg de Sn, bajo la forma química de F₂Sn o Cl₂Sn.2H₂O) que por el método con 2-ME (4 µg de Sn). Este hecho tiene su justificación en que en el último método el reductor participa solo en la reducción del pertechnetato, en cambio en el primero participa además en la reducción de los puentes disulfuro de la proteína. Una diferencia importante de hacer notar es que para obtener elevados rendimientos de marcación por el método del 2-ME fue necesario partir de concentraciones de proteína mayores o iguales a 10 mg / ml, mientras que en el caso de la fotoactivación este valor se redujo a 2.6 mg /ml.

Estabilidad *in vitro*: Los productos obtenidos (^{99m}Tc-IgG) por ambos métodos de marcación presentaron alta estabilidad *in vitro* y resultados similares de ^{99m}Tc transquelado (ver 3.3.4 Fig. 18) en el desafío con exceso de cisteína (un agente efectivo de competencia y un posible indicador de estabilidad *in vivo* de ^{99m}Tc-IgG), sugiriendo que la coordinación del radionucleído se produce a través del mismo tipo de átomo donador (S).

Estabilidad *in vivo*: el anión pertechnetato inyectado en forma intravenosa se une pobremente a las proteínas del plasma, se mueve rápidamente fuera del compartimiento del plasma sanguíneo (τ sangre = 0.48 ± 0.03 h en ratón) y su distribución en el cuerpo es reflejada por una concentración temprana en glándulas salivares, mucosa gástrica, plexo coroideo y glándula tiroides, donde cantidades significativas del mismo son encontradas a 1 h p.i. probablemente debido a que su estructura y tamaño son similares a las del anión yoduro. La excreción renal es del 30 % D.I. a 24 h (el 85 % del ^{99m}Tc filtrado en el glomérulo es reabsorbido por los túbulos renales) y la excreción por tracto

gastrointestinal es del 40 % D.I. a 4 días (li). En la tabla 4 se observa esa elevada acumulación en estómago y glándula tiroides en ratones a 1 y 2 h p.i. Con esta información se puede inferir que la estabilidad *in vivo* de ^{99m}Tc -IgG a 4 y 24 h es aceptable, dado que las imágenes de cámara gamma en ratones (3.3.7) muestran ausencia de captación en glándula tiroides.

Algunos autores afirman que ^{99m}Tc -Fab` es removido eficientemente de la sangre por filtración glomerular en el nefrón, reabsorbido en el túbulo proximal y catabolizado en los lisozomas, donde se produce la hidrólisis con la pérdida efectiva de ^{99m}Tc del Ac, quizás formando complejos con cisteína y glutatión, presentes en elevada concentración a nivel intracelular. Dichos complejos no quedan atrapados en el lisosoma y podrían unirse en forma inespecífica a diferentes proteínas citoplasmáticas que poseen grupos tiol por ejemplo la metalotionina (6500 PM)(lii) o abandonar lentamente la célula y ser excretados en orina.

Suponiendo la [cisteína] constante y del orden de 10 μM , entonces la relación molar cisteína : IgG *in vivo* para la condición inicial de las biodistribuciones es de 70 :1, pero debería aumentar en el tiempo debido a que disminuye la [^{99m}Tc -IgG] por eliminación.

Acumulación *in vivo* en sitio con inflamación: la relación de PI/PN (4 h p.i.) de ^{99m}Tc -IgG fotoactivada en ratones fue de 2.2, similar al resultado obtenido para ^{99m}Tc -IgG con 2-ME, por lo que dicha relación es independiente del método de marcación. Es decir que la única ventaja de performance para la aplicación *in vivo* de ^{99m}Tc -IgG fotoactivada está dada porque tiene una depuración sanguínea (τ sangre = 10.5 ± 6.2 h en ratón) más veloz que ^{99m}Tc -IgG con 2-ME (τ sangre = 25.6 ± 5.9 h en ratón), que provoca una mas rápida disminución del fondo de las imágenes permitiendo realizar tomas tempranas (a 2 h p.i. se observa la zona de inflamación). Sin embargo este efecto se compensa por una elución más rápida del sitio de inflamación.

El otro hecho destacable asociado con el menor τ sangre, que como ya se mencionó no es una medida de tiempo sino simplemente el número de desintegraciones que ocurren en un órgano fuente (sangre en este caso), es la disminución de la dosis absorbida.

Mecanismos propuestos de acumulación en sitios inflamados / infectados:

Los sitios de inflamación se caracterizan entre otros procesos por un incremento del flujo de sangre a la región, un incremento de la permeabilidad vascular y una migración de leucocitos hacia los tejidos afectados. El ^{99m}Tc -IgG mediante el proceso de extravasación en los sitios de permeabilidad vascular aumentada, atraviesa el endotelio y se acumula en el sitio de inflamación en forma inespecífica. Algunos autores especulan (liii) que la acumulación de ^{99m}Tc -IgG también estaría relacionada con la unión específica a receptores Fc de los monocitos y leucocitos humanos. Otros sugieren que ^{99m}Tc -IgG sufre cambio fisico-químicos, que resultan en una polimerización proteica quedando capturada en el sitio de inflamación / infección (liv, lv)

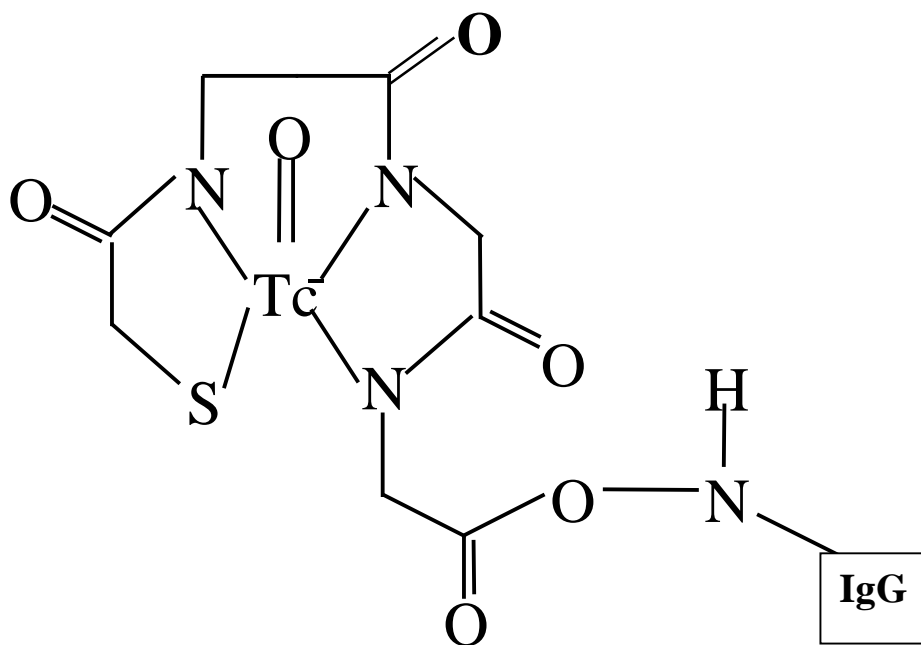
Ventajas de aplicación clínica diagnóstica del ^{99m}Tc -IgG por sobre otros radiofármacos de diagnóstico de inflamaciones (lvi). A diferencia de los leucocitos radiomarcados por fagocitosis de ^{99m}Tc -microagregados de albúmina o con ^{99m}Tc -HMPAO o los AcMos antigranulocito radiomarcados como ser el ^{99m}Tc -AcMo BW280, este radiofármaco no es captado por la médula ósea. Por ello parece especialmente indicado para la detección de inflamaciones / infecciones óseas, articulares y de prótesis. Además por su perfil de biodistribución es ideal para la detección de inflamación / infección en pulmones. También posee ventajas comparativas con respecto al ^{99m}Tc -nanocoloide para la detección de infección / inflamación en bazo dado que este último tiene acumulación en ese órgano, no así ^{99m}Tc -IgG.

A pesar de que existe un consenso generalizado de que los ^{111}In -Leucocitos

siguen siendo el "gold standart" para la detección de infección / inflamación, la implementación práctica de su marcación es muy engorrosa, debido a que se requieren instalaciones apropiadas para trabajar en condiciones estériles, manejo de sangre humana con el riesgo potencial de producir contaminación cruzada y el costo del radionucleído es elevado. La aplicación de un kit estéril, apirógeno y liofilizado de IgG como el aquí optimizado, para marcar con una elución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ constituye una opción atractiva para muchos centros de Medicina Nuclear por su bajo costo, disponibilidad y fácil marcación.

Comparación con $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$: En los ligandos tetradentados del tipo N_3S como es el MAG_3 , el Tecnecio que se encuentra como $^{99m}\text{Tc(V)-oxo}$ [$^{99m}\text{Tc=O}$] $^{3+}$ está coordinado a tres átomos de nitrógeno y uno de azufre pertenecientes al ligando, formando una estructura cuadrado-piramidal con el oxígeno en el vértice (Fig. 61). Este complejo aniónico [$^{99m}\text{Tc-MAG}_3$] $^-$ tiene una rápida excreción renal y en una muy pequeña proporción tiene excreción biliar.

Fig. 61. Estructura del complejo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$



$^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$ se diferencia de $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (obtenidos por fotoactivación y por reducción con 2ME) en el tipo de unión química entre el ^{99m}Tc y el MAG_3 antes mencionada, que se manifiesta en porcentajes de transquelación con cisteína *in vitro* y de eliminación renal inferiores (8 % D.I. /g a 4h p.i., casi 3 veces menor)^(xlii) a los de los productos obtenidos por métodos directos^(xli). Estos últimos muestran un perfil de eliminación renal (mas hidrofílico) y la $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$ muestra un perfil de eliminación hepato-biliar (mas lipofílico). Algunos autores especulan con que el ^{99m}Tc unido a proteínas vía el MAG_3 es bastante resistente al catabolismo intracelular y que el complejo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ es capaz de atravesar las membranas biológicas no quedando atrapado en los lisosomas. Al tener mayor resistencia al intercambio con la cisteína intra y extracelular (lvii) se produce menos $^{99m}\text{Tc-cisteína}$ y se observa menor eliminación por vía renal. El τ sangre de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$ (26.7 ± 3.6 h en ratón) es similar al de

^{99m}Tc -IgG (por reducción con 2ME) mostrando que el radionucleído permanece unido a la IgG circulante en ambos casos por bastante tiempo. En lo que se refiere al parámetro PI/PN del ^{99m}Tc -MAG₃-IgG la relación no difiere de la obtenida por los métodos directos antes mencionados.

4.2 UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc

La existencia de los PAMs ha sido ampliamente reconocida como parte de la inmunidad innata preservada evolutivamente (lviii). Basándonos en evidencia de estudios *in vitro*, modelos animales y estudios en humanos, los PAMs se han posicionado como nuevos agentes contra infecciones y para la detección de las mismas. De entre todos los péptidos sintéticos derivados de los dominios α -hélice o el β -sheet del péptido catiónico humano UBI 1-59, los que mejor relación T/NT (*in vivo*) han tenido luego de ser radiomarcados con ^{99m}Tc , fueron los fragmentos 18-29 y 29-41. Pero solo este último fue seleccionado para la obtención de imágenes de infecciones en cámara gamma debido su relativamente baja captación en hígado. El UBI 29-41 posee un pI (12.2) y una vida media farmacológica (142 min.) mayores que cualquiera de los otros fragmentos de UBI. Posee 6 aa catiónicos y uno aromático y el orden de la conformación de los aa en el péptido se cree que juega un rol muy importante. Esto ha sido confirmado por experimentos con una versión desordenada (scrambled) de UBI 29-41 con reducida capacidad de unión a *S.a.*, usado como blanco del UBI 29-41 en esta parte del trabajo de tesis. Se decidió trabajar con *S.a.* (bacteria gram-positiva) porque tiene la pared celular cargada negativamente que permite la unión electrostática del péptido catiónico UBI 29-41 y porque es la bacteria que origina el mayor número de casos de infecciones en el mundo y en USA (alrededor del 20 % de las bacteremias). Se evitó trabajar con cepas resistentes a la meticilina (MRSA) o con susceptibilidad reducida a la vancomicina (VRSA) para disminuir el riesgo en el caso de un potencial accidente por contaminación.

Recientemente investigadores alemanes sintetizaron ^{18}F -benzo-CONH-UBI 29-41 y corroboraron que este compuesto es capaz de unirse en forma específica a *S.a.*, abriendo perspectivas para su futura aplicación en diagnóstico PET. Este hecho sumado a la observación de que ^{99m}Tc -UBI 29-41 se acumula en sitios de infección en pacientes ha re-actualizado la necesidad de estudiar distintos métodos de radiomarcación con ^{99m}Tc para dicho péptido (lix).

Radiomarcación de UBI 29-41 con ^{99m}Tc : A diferencia de la IgG, el UBI 29-41 no posee puentes disulfuro en su estructura por lo cual no son aplicables los métodos de marcación directos basados en la reducción a sulfhidrilo con DTT o 2-ME (2.4.1) o por fotoactivación (2.4.2). Se empleó en este caso una técnica desarrollada por Hans Feitsma (LUMC, Holanda) donde se utiliza borohidruro de potasio para la obtención de un radiocomplejo estable (método a). Posteriormente en 2001 investigadores de INIM (Toluca, México) en su afán por obtener un radiocomplejo de menor toxicidad para ser utilizado en estudios clínicos realizaron la marcación en condiciones alcalinas sin borohidruro de potasio, obteniendo buenos resultados (método b) y además valiéndose de cálculos usando mecánica molecular y mecánica cuántica propusieron una estructura cuadrado plana conformada por los grupos amino de Lys (5) y Arg (7) y dos moléculas de H₂O, para el complejo formado con oxo-Tecnecio(V) (lx). La radiomarcación de UBI 29-41 y de Sc UBI 29-41 protegidos con t-BOC en el grupo amino de la Lys produjo resultados negativos, sustentando la hipótesis que dicho grupo amino es necesario para la formación de los radiocomplejos. El otro método utilizado en el presente trabajo fue el método (c) llamado marcación post-conjugación con NHS-S-bencil-MAG₃ cuyo blanco de marcación con UBI 29-41 mostró resultados de marcación

significativos, permitiendo suponer que dado que no todas las moléculas de péptido son conjugadas con el BFCA, el procedimiento de marcación puede producir una mezcla de radiocomplejos formada por ^{99m}Tc -UBI 29-41 y ^{99m}Tc -MAG₃-UBI 29-41. La ausencia de un HPLC con espectrómetro de masa dedicado al trabajo con biomoléculas radioactivas en nuestro país, hace imposible la confirmación experimental de esta suposición.

Los rendimientos de marcación para UBI 29-41 por los tres métodos antes mencionados y del Sc UBI 29-41 por el método a fueron elevados no requiriéndose purificación post-marcación. Se observa experimentalmente que la estabilidad *in vitro* a 24 h alcanzó valores similares para los tres métodos siendo éstos mayores al 95 %. El porcentaje de Tecnecio transquelado a cisteína (3.4.2.2), fue inferior para el producto obtenido por método indirecto respecto a los directos, al igual que en el caso de la IgG (3.3.4), probablemente debido a la estabilidad del complejo formado entre el Tecnecio y el MAG₃ (ver 4.1 Fig. 61). A su vez el elevado valor correspondiente al Sc UBI 29-41 puede estar relacionado con el hecho que el complejo formado con Tecnecio utilice para la esfera de coordinación otros aa distintos a los utilizados en el UBI 29-41 según el estudio de modelado molecular ya mencionado. El resultado de unión a bacterias (*S.a.*) favorece enormemente a los complejos obtenidos por métodos directos a y b (41.4 y 40.5 % respectivamente) y Sc-UBI 29-41 método a (40.9 %) por sobre el indirecto (12.5 %). Este resultado es más relevante que los del desafío con cisteína y estabilidad *in vitro* (siempre y cuando estos valores estén dentro de un rango razonable a tiempos cortos como es el caso). Su relevancia está dada por que permiten anticipar cual será el nivel de acumulación en el sitio de infección *in vivo* y por tanto cuan sensible será el radiocomplejo para localizarse y emitiendo radiación gamma permitir adquirir una imagen capaz de ser interpretada como acumulación anormal.

Se decidió evaluar la acumulación *in vivo* en el sitio de infección a través del parámetro PI/PN en vez del SI/SN (sitio infectado/ sitio normal), porque esta última conlleva un mayor error originado en la determinación visual del tejido infectado y su posterior resección.

Sorprendentemente ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) mostró un valor PI/PN a 2 h p.i. mas elevado que ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método b) a pesar del resultado similar en la unión a bacterias *in vitro*. Los métodos b y c mostraron valores PI/PN casi iguales. En los resultados de los perfiles de biodistribución queda en evidencia lo ya discutido en 4.1. acerca de la hidrofiliidad y mayor transquelación *in vivo* a cisteína endógena de los compuestos obtenidos por métodos directos (a y b) y la lipofiliidad y menor transquelación *in vivo* a cisteína endógena del complejo obtenido por el método indirecto c, que se expresa en el % D.I. /g de tejido para riñones 16.00, 13.64 y 0.77, e intestino 1.23, 1.20 y 3.43 respectivamente.

Se comparó la relación PI/PN (2.56 ± 0.27) de ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) a 2 h p.i. con ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 (método a) control negativo de infecciones a 2 h p.i. (0.99) y con ^{99m}Tc -IgG a 4 h p.i. (1.78 ± 0.37) obtenido de la marcación de un kit liofilizado optimizado según 3.3.1.2, que es un control positivo para inflamación. Los resultados muestran la eficacia del ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) para la detección de infecciones, la inespecificidad de ^{99m}Tc -Sc UBI 29-41 para la detección de infecciones y una acumulación inespecífica de ^{99m}Tc -IgG probablemente debida al incremento del flujo de sangre a la región, al aumento de la permeabilidad vascular y a la migración de leucocitos hacia el sitio infectado. Estos resultados permiten hacer hipótesis acerca del ^{99m}Tc -UBI 29-41 y su versión scrambled, ambos con los mismos aa, con igual carga e igual método de marcación (método a) y sin embargo con tan diferente acumulación *in vivo*. Una explicación sería que a pesar de que por un mecanismo electrostático ambos

radiocomplejos se acercan y unen en igual forma a la membrana de los *S.a.* (fenómeno de unión) solo el ^{99m}Tc -UBI 29-41 (que posee la secuencia apropiada de aa) la atraviesa preferencialmente (fenómeno de reconocimiento de secuencia de aa) y se acumula dentro de la bacteria.

En la evaluación de PI/PN en animales con inflamación estéril para ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) no se observó acumulación específica en el sitio de inflamación debido a la ausencia de bacterias (PI/PN 1.0) mientras ^{99m}Tc -IgG que es un agente eficiente para la detección de inflamación estéril mostró elevada acumulación (PI/PN 2.5).

Cuando se evaluó PI/PN en animales con *S.a.* irradiados (2.32 ± 0.33) para ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) se observó acumulación específica en el sitio, a pesar que la bacteria no es viable a 24 h post irradiación. Esto puede deberse a que la membrana mantiene la integridad (test de trypan blue +) y su carga positiva, que origina la interacción electrostática con el péptido y que posteriormente este pueda atravesarla y unirse a proteínas del citosol. Por el contrario para los *S.a.* irradiados (2 semanas post-irradiación) donde la bacteria se encuentra lisada (test de trypan blue -) no hay interacción electrostática posible con la membrana por estar destruida y tampoco acumulación por unión a proteínas del citosol (PI/PN 0.97 ± 0.36).

Para ^{99m}Tc -IgG los valores PI/PN 0.98 ± 0.31 con *S.a.* irradiados muestran que no hubo una acumulación preferencial en el sitio probablemente por que al ser bacterias no viables no se produjo una inflamación inducida con los consecuentes procesos asociados que permitirían la localización del radiofármaco.

El análisis de autorradiografías digitales de patas de ratones inyectados con ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) en sitios con *S.a.* viables, *S.a.* irradiados y *S.a.* muertos por calentamiento (Fig. 34) y de ^{99m}Tc -IgG en sitios con *S.a.* viables y *S.a.* irradiados (Fig. 35) muestra que:

i) la localización de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en el sitio de infección con *S.a.* viables es máxima (SI/SN 5.28) y disminuye (SI/SN 2.61) cuando hay *S.a.* no viables obtenidos por irradiación (inyectados 24h post irradiación) y no hay localización (SI/SN 1.02) cuando se inyectan *S.a.* muertos por calentamiento. Esto se podría explicar suponiendo que en el primer caso hay integridad de membrana y transporte activo (adhesión y acumulación en citoplasma), en el segundo hay integridad de membrana pero el proceso de transporte activo esté afectado (adhesión a membrana sin acumulación en citoplasma) y en el tercer caso solo hay fragmentos de membrana (no hay adhesión).

ii) la captación difusa de ^{99m}Tc -IgG en sitios con *S.a.* viables (SI/SN 2.23) decrece con *S.a.* irradiados (SI/SN 1.30) probablemente por que estos últimos producen una respuesta inflamatoria más leve.

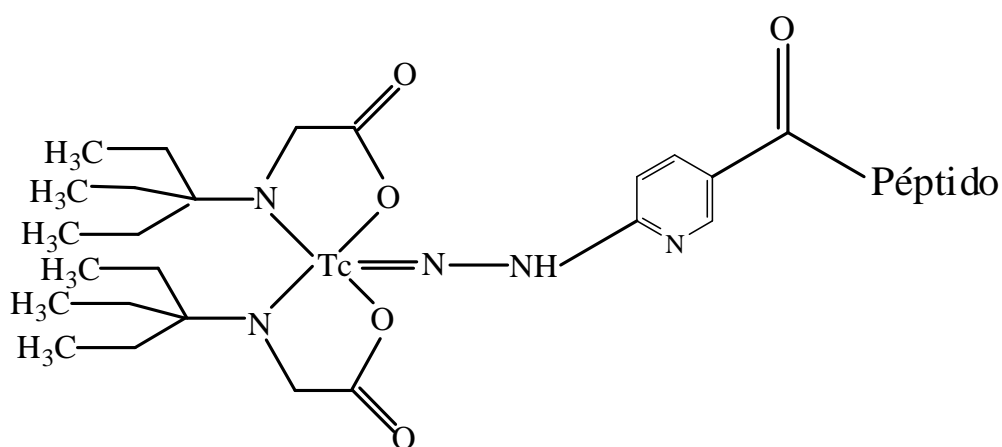
Detección de infecciones prostéticas articulares experimentales con *S.a.* en conejos: Resultados recientemente publicados (Ixi) demuestran que ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) puede ser usado para diferenciar infecciones prostéticas articulares agudas de inflamaciones articulares estériles crónicas en conejos. Sin embargo muestran un bajo valor de SI/SN en el modelo animal con infección prostética al día 20 comparado con el PI/PN obtenido en infección muscular a 18 h en este trabajo de tesis (1.75-1.87 vs 2.56). Varios factores pueden explicar esta pobre acumulación en tejido periprostético infectado, primero la diferente magnitud de UFC / g de tejido (10^6 vs 10^8 , datos no mostrados), segundo la falta de vasculatura que hace más difícil el proceso de entrega del radiofármaco al sitio infectado y tercero que el UBI no es capaz de penetrar el biofilm formado por agregados de *S.a.* sobre la superficie de la prótesis (este factor ha sido identificado como un mecanismo de resistencia a la terapia con antibióticos en osteomielitis). Es decir que la disposición como un organismo multicelular adaptado a una región poco vascularizada debido a la ausencia de vasos sanguíneos en la prótesis

(biofilm) es completamente diferente a la suspensión de organismos unicelulares (estudios *in vitro*) o al conjunto de organismos unicelulares en elevada concentración en tejido muscular (modelo animal empleado).

Aclaración 2: la captación de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en las articulaciones de niños es elevada debido a que el tejido óseo en crecimiento (cartílago de crecimiento) tiene carga negativa.

Comparación con ^{99m}Tc -((Tricina) $_2$ HYNIC-UBI 29-41): Los productos obtenidos por los tres métodos distintos aplicados en este trabajo se diferencian claramente de ^{99m}Tc -((Tricina) $_2$ HYNIC-UBI 29-41) obtenido por conjugación de NHS-HYNIC a UBI 29-41 y posterior marcación con $^{99m}\text{TcO}_4^-$ usando tricina como coligando, por el tipo de complejo formado por el ^{99m}Tc , el N del HYNIC y los grupos amino y carboxílico de cada una de las dos tricinas (Fig. 62).

Fig. 62. Estructura del ^{99m}Tc -((Tricina) $_2$ HYNIC-péptido)



Esta diferencia se expresa en el perfil de biodistribución en ratones normales caracterizado por una elevada eliminación renal valores del 12 % D.I. /g de tejido para riñones a las 2h p.i. similar a la de los productos obtenidos por métodos directos, que tiene su origen en la hidrofiliidad del quelante HYNIC. Dicho quelante parece introducir cierta modificación en la estructura del péptido y en su distribución de cargas que se manifiestan en un % de unión *in vitro* a bacteria del 31,4 % (inferior a los métodos a y b) y en una baja relación PI/PN (1.76) en ratones con infección a 2 h p.i. (Ixii) haciéndolo un mal candidato para la aplicación clínica diagnóstica en infecciones.

Empleando un nuevo UBI 29-41 de estructura peptídica cíclica marcado con ^{99m}Tc por el método a, investigadores de la Div. Medicina Nuclear del LUMC obtuvieron valores de unión *in vitro* y acumulación *in vivo* en *S.a.* un 15 % superiores a los obtenidos con UBI 29-41 de estructura peptídica lineal radiomarcado por igual método. Estos resultados (no publicados) ponen de manifiesto que la estructura conformacional adoptada por el péptido radiomarcado tiene una importancia fundamental de la sobre la acumulación en bacterias. Por tanto la disminución de la acumulación en bacterias para el péptido radiomarcado por métodos indirectos respecto del método a, podría originarse en las modificaciones conformacionales que se producen en el mismo como consecuencia de la introducción de los distintos BFCAs.

Ventajas de aplicación clínica diagnóstica del ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método b) por sobre otros radiofármacos de diagnóstico de infecciones:

Siendo el producto obtenido por el método a el más sensible para la detección de sitios de infección *in vivo*, no se ha empleado en los estudios clínicos debido a la toxicidad del borohidruro de potasio, reemplazándose por el método b que no contiene esta última sustancia.

^{99m}Tc -UBI 29-41 está indicado para la detección de infecciones óseas (Fig. 63), articulares y de prótesis, y especialmente para las infecciones de la región abdominal (Fig. 64) dado que a diferencia de otros radiofármacos no es captado por la médula ósea ni por intestino (Fig. 65) y tiene una rápida depuración renal (85 % a 24 h). Además su radiomarcación con $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es sencilla y permite obtener imágenes tempranas de localización del sitio infectado (Fig. 66) sin acumularse en tejidos con inflamación estéril. Las imágenes se obtuvieron inyectando ^{99m}Tc -UBI 29-41 obtenido por el método b ($A_i = 37 \text{ MBq}$, $25 \mu\text{g}$ de péptido) y son cortesía del Dr. Sepúlveda del Hospital de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico, D.F.

Fig 63. Imágenes de cuerpo entero y de pies de adquisición en cámara gamma a 10 min. p.i., correspondientes a un paciente femenino con osteomielitis en el pie izquierdo con cultivo de biopsia positivo.

Fig 64. Imágenes posterior y anterior de cuerpo entero de adquisición en cámara gamma correspondientes a un paciente con proceso séptico en colon ascendente.

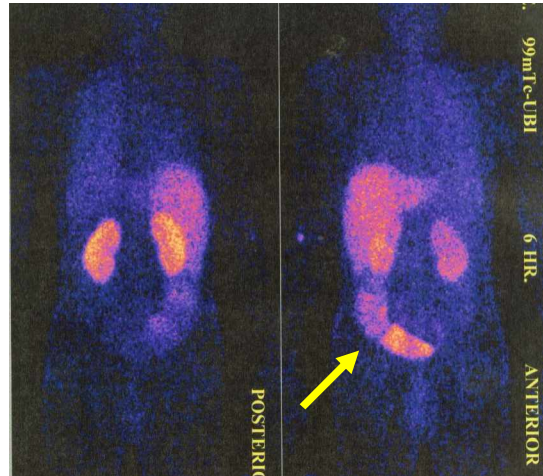
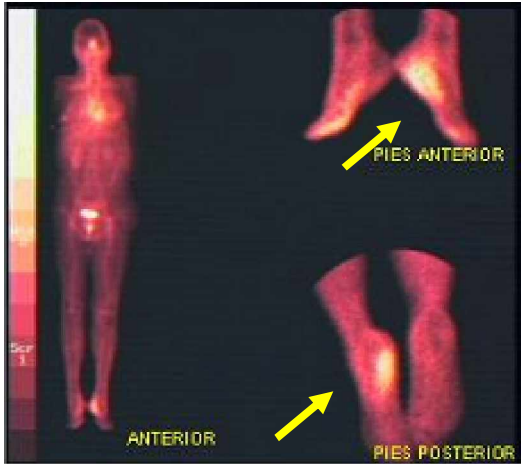
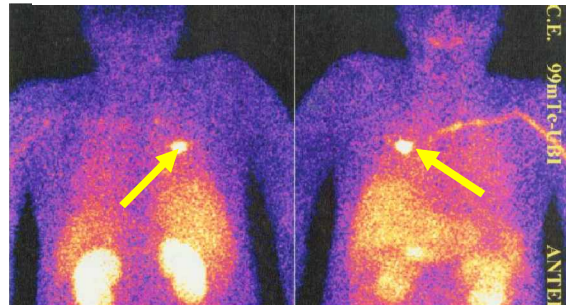
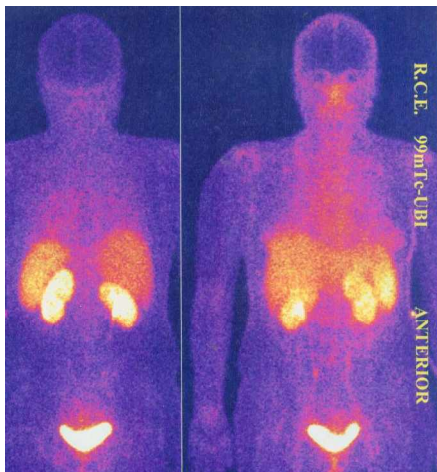


Fig 65. Imágenes posterior (izquierda) y anterior (derecha) de cuerpo entero de adquisición en cámara gamma correspondientes a un paciente normal.

Fig 66 Imágenes posterior y anterior de cuerpo entero de adquisición en cámara gamma, correspondientes a un paciente con proceso séptico en pulmón derecho.



En un ensayo clínico de fase I sobre 18 pacientes con sospecha de infección en hueso, tejido blando o prótesis recientemente publicado (Ixiii), la aplicación de ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método b, 400 μg por paciente) mostró 14 verdaderos positivos, 3 verdaderos negativos y solo 1 falso positivo (100 % de sensibilidad, 80 % especificidad, 94.4 % precisión) con una relación SI/SN de 2.75 ± 1.69 , 2.30 ± 1.30 y 2.04 ± 1.01 a 30, 60 y 120 min. p.i. respectivamente. Sin embargo estos resultados no son estrictamente comparables con los estudios *in vivo* realizados en este trabajo de tesis, porque difieren en los tipos de bacterias causantes de la infección (*S.aureus*, *S.pyogenes* y *P.aeruginosa*) y en la severidad de la misma en diferentes pacientes. El distinto grado de acumulación de ^{99m}Tc -UBI 29-41 en infecciones originadas por diferentes bacterias ha sido probado y es menor para *E. coli* que para *S.aureus* (Ixiv). En otro estudio (Ixv) utilizando ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método b) realizado en 6 niños con sospecha de infección en hueso se obtuvo una relación SI/SN de 2.18 ± 0.74 en lesiones positivas a 2 h p.i.

4.3 Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re

La combinación de costo accesible, disponibilidad, largo período de semidesintegración del radionucleído padre, elevada energía de la partícula β^- apropiada para terapia, energía del fotón y apropiada para la obtención de imágenes con cámara gamma y elevada Ae, hacen del ^{188}Re un radionucleído terapéutico de uso potencial en medicina nuclear. La sal sódica del anión perrenato $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$ en concentración nanomolar es la forma química estable en solución acuosa que se obtiene al eluir el generador comercial de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$. En presencia de ligandos y agentes reductores como el Sn^{2+} , el perrenato Re(VII) puede ser reducido para dar complejos estables con estados de oxidación inferiores en forma bastante parecida al Tc.

Método directo de radiomarcación con ^{188}Re : Aprovechando la experiencia acumulada en la reducción de IgG discutida precedentemente en 4.1, se optó por la reducción de Rituximab con 2-ME (relación molar 1000:1) eliminando el riesgo de fragmentación proteica y permitiendo un elevado rendimiento de radiomarcación.

Marcación de Rituximab reducido: La reacción de transquelación del $^{188}\text{Re(V)}$ -oxo reducido por Sn^{2+} a los grupos sulfhidrilos de la proteína reducida formando uniones S-Re es un proceso con cinética lenta que requiere de un ligando débil como HEDP, glucoheptanato o tartrato para estabilizar al $^{188}\text{Re(V)}$ -oxo y acelerar la transquelación. Basados en resultados extraídos de la bibliografía se seleccionó el tartrato, que permite completar la reacción a temperatura ambiente en 2 h. El tartrato de sodio cumple aquí la misma función que el MDP en la marcación de IgG con ^{99m}Tc .

La eficiencia de marcación es máxima a pH 3.0 dado que se favorece la reacción redox $^{188}\text{Re(VII)}/^{188}\text{Re(V)} : ^{188}\text{Re(IV)}$ y disminuye con la elevación del pH (Fig. 39). Este hecho se relaciona con la mayor estabilidad termodinámica del ^{188}Re $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$ y del complejo ^{188}Re -tartrato a pH elevado, dado que si se incrementa la estabilidad de este último complejo disminuye el rendimiento de transquelación. Las experiencias fueron realizadas bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la reoxidación del ^{188}Re -tartrato cuando es expuesto al aire y con una elevada concentración de tartrato (7 M) para aumentar la eficiencia de transquelación (Ixvi).

La influencia de la relación de Sn :IgG en este método de marcación es crítica, observándose experimentalmente que por exceso o defecto de reductor se generan como impurezas radioactivas ^{188}Re -coloidal o ^{188}Re -libre respectivamente. También se observa debido a las diferencias de potencial de reducción que para marcar 1mg de AcMo con ^{188}Re por el método directo en forma óptima, se requiere (2.4 mg de

Cl₂Sn.2H₂O) aproximadamente 700 veces mas agente reductor que para marcar 1 mg de IgG con ^{99m}Tc por el método directo optimizado (3.4 µg de Cl₂Sn.2H₂O).

El rendimiento promedio de marcación del 94.6 % (doble del obtenido por método indirecto aplicado a AcMo 14F7) y la elevada Ae obtenida 1328.3 MBq / mg (casi 15 veces superior al método indirecto utilizado con IgG y AcMo 14F7) constituyen al ¹⁸⁸Re-Rituximab obtenido por método directo en un candidato ideal para RIT de LNH.

Los estudios de estabilidad en SF muestran el efecto antioxidante del ácido genticónico para evitar que especies reducidas de ¹⁸⁸Re sean reoxidadas a perrenato por radicales libres del O₂, producidos como consecuencia de la acción de la radiación β- (1.3.6) y por la radiólisis del agua. En el caso de la estabilidad en suero humano no se observa ningún efecto asociado al ácido genticónico y se observa mayor estabilidad que en SF probablemente por ciertos antioxidantes naturales presentes en el mismo.

La mayor estabilidad en suero (93 % a 43 h) encontrada para el caso del ¹⁸⁸Re-Rituximab obtenido a partir del kit liofilizado respecto del radiomarcado a partir del AcMo reducido (81 % a 4 h) podría estar relacionada con la radiólisis provocada por la elevada Ae de este último (43 veces mayor a la Ae utilizada con el kit).

Los resultados de la unión específica de ¹⁸⁸Re-Rituximab (kit liofilizado) a linfocitos B son casi un 10 % inferiores respecto del radiomarcado a partir del Ac reducido, evidenciando que el proceso de liofilización afecta negativamente la inmunoreactividad. Igualmente ambos resultados fueron superiores al valor de unión específica para ¹³¹I-Rituximab radiomarcado en nuestro laboratorio por la técnica de cloramina-T.

Comparando los resultados de biodistribución de ¹⁸⁸Re-Rituximab (Fig. 54) y ¹⁸⁸ReO₄⁻ (Tabla 4) en ratones normales a 2h p.i. se desprende que hay inestabilidad *in vivo* a tan solo 2 h p.i. y que hay una acumulación promedio del 4 % D.I. / g en estómago y en tiroides. Esta leve acumulación se observa en la baja densidad de cuentas / pixel en estómago de las imágenes de cámara γ de ratones normales inyectados con ¹⁸⁸Re-Rituximab (Fig. 57 izquierda) y de sus órganos *ex vivo* a las 2 h p.i. (Fig. 57 derecha). Existe por tanto una diferencia sustancial entre el comportamiento biológico del ¹⁸⁸Re y del ^{99m}Tc unidos a biomoléculas radiomarcadas por el método directo. El ¹⁸⁸Re reducido que se libera de la biomolécula no se transquila con cisteína sino que se oxida fácilmente dado su elevado potencial de reducción y se biodistribuye como ¹⁸⁸ReO₄⁻ (Tabla 3). Su acumulación en glándula tiroides, glándulas salivares y plexo coroideo puede evitarse por administración previa de perclorato de potasio. En lo que respecta a la excreción (ver 4.1) el 30 % D.I. a 24 h es por vía renal (con filtración glomerular y reabsorción tubular), la diuresis forzada puede reducir la dosis en vejiga. Dependiendo de la Ai y de la liberación *in vivo* de ¹⁸⁸ReO₄⁻ algunos AcMos radiomarcados por método directo para aplicación en RIT podrían producir alguna de las siguientes nefropatías por radiación (lxvii) : aguda, crónica, hipertensión benigna o maligna y proteinuria asintomática; que generalmente producen anemia severa, hipertensión e incremento de la creatinina sérica. Afortunadamente la baja Ai recomendada para ¹⁸⁸Re-Rituximab (tomando como referencia la del Zevalin) no supera los 370 MBq, por lo que disminuiría la probabilidad de una nefropatía por radiación.

Un factor adicional a considerar es que el AcMo utilizado no se internaliza y como ya se discutió en 4.1, el ambiente extracelular es oxidante con lo cual se esperaría una mayor inestabilidad *in vivo* respecto de AcMo marcados por el mismo método que si se internalizan.

Método indirecto de radiomarcación con ¹⁸⁸Re. Los ligandos tetradentados tipo N₃S como el MAG₃ (ya mencionado en 4.1), también coordinan al Re(V)-oxo a través de los tres átomos de nitrógeno y del azufre, pero para ello necesitan de un ligando débil como el citrato (c_f = 0.025 M) que compleja rápidamente al Re(V)-oxo a temperatura

ambiente y de calentamiento a 90 ° C por aprox. 30 min. para completar la reacción de transquelación. Esta última condición restringe la marcación de anticuerpos con ^{188}Re a la técnica del quelante premarcado (2.3.2.1). La técnica de la marcación post-conjugación (2.3.2.2) aplicada para radiomarcaciones con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, queda excluida para ^{188}Re debido a la desnaturalización proteica del AcMo conjugado por efecto del calentamiento a la temperatura antes mencionada.

Marcación de IgG y AcMo 14F7 con ^{188}Re -MAG₃-TFP. La optimización de la técnica para la marcación de AcMo que se realizó con IgG y dio como producto ^{188}Re -MAG₃-IgG permitió su evaluación *in vitro* e *in vivo* y su comparación en ciertos aspectos con ^{188}Re -Rituximab y con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG₃-IgG. La primer consideración es el bajo rendimiento de marcación debido primordialmente a la etapa de conjugación a la proteína. Se observa en esa etapa (conjugación) un rendimiento inferior para el AcMo respecto de la IgG como consecuencia de la menor concentración de AcMo respecto de IgG. El aumento de la Ae no puede ser obtenido a través del incremento del número promedio de grupos $^{188}\text{Re(V)}$ -oxo-MAG₃ unidos por Ac. Estudios realizados con $^{186}\text{Re(V)}$ -oxo-MAG₃-MoAb E48 (Ixviii) muestran que con más de 12 grupos por Ac se ve disminuida la inmunoreactividad y se produce una modificación en el perfil de biodistribución comenzando el radioconjugado a tener una más rápida depuración sanguínea y una más elevada captación en hígado e intestinos. La ventaja en cuanto a la mayor estabilidad *in vitro* de ^{188}Re -MAG₃, ^{188}Re -MAG₃-IgG y ^{188}Re -MAG₃-AcMo 14F7 en ausencia de ácido gástrico respecto a ^{188}Re -Rituximab es notoria. Y también lo es la ventaja en cuanto a la estabilidad *in vivo* se refiere, solo 0.81 y 2.0 % D.I. / g se acumulan en estómago a 4h p.i. para ^{188}Re -MAG₃-IgG (Fig. 55) y a 2h p.i. para ^{188}Re -MAG₃-AcMo 14f7 (Fig. 56) respectivamente.

Al igual que lo discutido ya en 4.1, ^{188}Re -MAG₃-AcMo 14f7 (método indirecto) se diferencia de ^{188}Re -Rituximab (método directo por reducción con 2ME) en el tipo de unión química entre el ^{188}Re y el MAG₃, que se manifiesta en porcentajes de eliminación renal inferiores (7,12 % D.I. /g a 2h p.i., casi 2 veces menor) y mayor permanencia la circulación sanguínea (35 % D.I. /g a 2h p.i., casi 4 veces mayor) que los del producto obtenido por el método directo. Este último muestra un perfil de eliminación renal (mas hidrofílico) y el ^{188}Re -MAG₃-AcMo 14f7 muestra un perfil de eliminación hepato-biliar (mas lipofílico).

Problemas de transporte y localización de AcMo radiomarcados (Ixix) y posibles estrategias

i) El AcMo radiomarcado puede unirse al antígeno tumoral circulante. La estrategia propuesta consiste en la administración de AcMo no radiomarcado previamente a la introducción del AcMo radiomarcado, de manera tal de remover el antígeno circulante y alcanzar una mayor localización tumoral con una disminución de la radioactividad de fondo. Este el esquema de administración para RIT con ^{90}Y -AcMo anti CD20 en el tratamiento de LNH que se aplica 8 después de la administración de 200 mg de AcMo anti CD20 no radiomarcado que producen una depleción de linfocitos B circulantes que expresan CD20 en superficie.

Otra estrategia para evitar este inconveniente consistiría en utilizar como blanco molecular el dominio extracelular de receptores de crecimiento (EGFR o VEGFR) o TAAs que no presenten Ag circulante.

ii) La administración en pacientes de AcMo murinos (por ej arcitumomab, un AcMo anti-CEA aprobado en Canadá para detección de metástasis de cáncer colorectal) y / o quiméricos radiomarcados puede provocar una respuesta HAMA con la consecuente interferencia en la localización y entrega de dosis al tumor. La formación *in vivo* de un complejo inmune del AcMo murino radiomarcado con anticuerpos humanos

antimurinos altera la biodistribución (lxx). Por ejemplo una elevada actividad de macrófagos especialmente cuando está asociada a necrosis tumoral puede resultar en la ingestión del complejo que produce un aumento de la captación (inespecífica) a tiempos cortos (menos de 24 h) sin embargo resulta en una remoción del radionucleído a tiempos mayores (mas de 24 h) disminuyendo la relación blanco / fondo. Además modifica la velocidad de depuración produciendo un patrón de captación elevada en hígado, bazo y médula ósea debido a que el complejo circulante es tomado por el sistema Retículo endotelial.

Para evitar este problema , se testea la existencia de HAMA en pacientes que ya han recibido AcMo murino antes de hacerse un segundo estudio. Para ello se emplea un kit para detección de HAMA por inmunoensayo. Sin embargo se han encontrado pacientes que nunca habían recibido AcMo murino y que poseían HAMA preexistente. De todos modos la solución definitiva a este problema estaría dada por el empleo de AcMos humanizados.

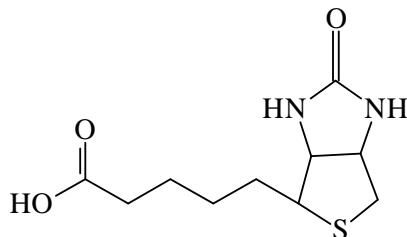
iii) El radionucleído liberado del AcMo puede acumularse en otros órganos, por ej. glándula tiroides y estómago preferentemente en el caso del ^{188}Re . La resolución definitiva de este problema está relacionada con el diseño de nuevos BFCA para conjugar a los AcMo, que presenten mayor estabilidad *in vivo*.

Potencial aplicación de RIT al tratamiento de infecciones. Considerando la urgente necesidad de nuevas terapias antimicrobianas para combatir la resistencia a las drogas y la ineficacia relativa de terapias corrientes en huéspedes comprometidos y que la radiación ionizante puede matar fácil y eficientemente microorganismos, algunos investigadores han sugerido que la RIT (originariamente desarrollada para el tratamiento de cáncer) podría ser adaptada como una nueva modalidad para el tratamiento de patologías infecciosas donde AcMos específicos(lxxi) radiomarcados son usados para entregar una dosis de radiación microbicida a los microorganismos patógenos. Esta modalidad no ha sido aún empleada como una estrategia de terapia antimicrobiana (lxxii) sin embargo recientemente comenzó a ser evaluada (lxxiii) *in vitro* e *in vivo* aplicando un AcMo anti PPS8 (polisacárido capsular de pneumococo número 8) radiomarcado con ^{213}Bi (emisor α , $T_{1/2}$ 45.6 min., $E_{\alpha} = 5.9$ MeV) para el tratamiento de infecciones bacterianas con resultados promisorios.

4.4 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y

La biotina también conocida como vitamina H está constituida por un estructura alifática heterocíclica (que incluye un grupo urea) que contribuye mayormente a la interacción molecular que le permite unirse a cada subunidad (PM 16.000) de avidina (con afinidad femto molar) y una cadena alifática de 5 carbonos que termina con un grupo carboxílico como se observa en la Fig. 67.

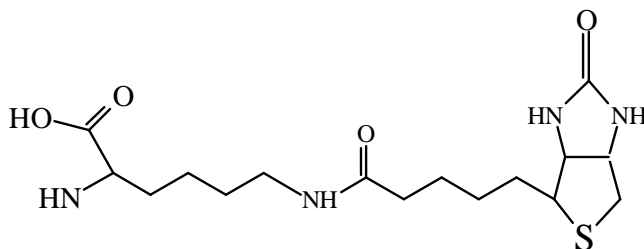
Fig. 67. Estructura de la biotina



Por lo tanto es necesario que la radiomarcación sea realizada a través de la reacción con el grupo carboxilo para no impedir la unión a avidina. Por otra parte estudios

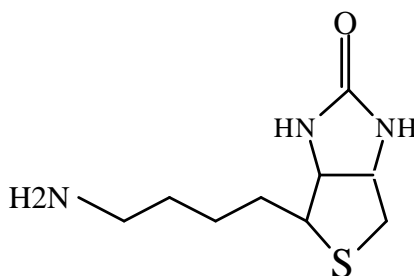
experimentales muestran que la K_a de derivados de biotina disminuye por efecto estérico cuando el quelante se une en la posición ocupada por el ácido carboxílico. Por lo cual sería apropiado introducir una cadena carbonada (brazo espaciador) sobre el ácido carboxílico para evitar el efecto estérico y así mantener el valor de la K_a avidina-derivado de biotina. Teniendo presentes estos elementos y que la técnica de radiomarcación con $^{188}\text{Re-MAG}_3$ requería de un derivado con un grupo amino terminal, se seleccionó a la N- ϵ -biotinil-L-lisina mas conocida como biocitina (Fig. 68)

Fig. 68. Estructura desarrollada de la biocitina



Desafortunadamente la acción enzimática de una glicoproteína del suero llamada biotinidasa (76.000-77.000 PM) sobre los derivados de biotina, produce la hidrólisis del grupo amido de la biocitina liberando biotina, razón por la cual $^{188}\text{Re-MAG}_3$ -biocitina queda excluida de la potencial aplicación clínica. Se seleccionó entonces otro derivado de biotina conocido como Norbiotinamina (Fig. 69) que tiene un grupo amino terminal en el extremo de la cadena alifática. Este grupo reacciona con $^{188}\text{Re-MAG}_3$ -TFP, para dar un grupo amida en posición inversa al de la biocitina, que no es hidrolizado por la enzima biotinidasa.

Fig. 69. Estructura de la Norbiotinamina



En los diversos derivados de biotina conjugados con DOTA para radiomarcarse con ^{90}Y de aplicación clínica, han sido realizadas modificaciones estructurales como ser la pérdida del grupo amida blanco de la biotinidasa, por introducción de un grupo metilo o etilo o por la reducción del grupo a imida (reduced biotinamidohexylamine-DOTA) reteniendo una alta estabilidad contra la degradación enzimática.

La aplicación del método indirecto de radiomarcación con $^{188}\text{Re-MAG}_3$ a Norbiotinamina produjo un radiofármaco con elevado rendimiento de marcación, con resultado positivo en el ensayo de unión a avidina y con buena estabilidad *in vitro*. Desde el punto de vista práctico, la potencial utilización terapéutica del radiofármaco en PAGRIT® no es recomendable por la ruta de administración sistémica debido a la lipofiliidad del compuesto, pero si lo sería para la administración locoregional en gliomas de cerebro.

Los estudios de estabilidad muestran que los valores para $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-Norbiotinamina}$ son inferiores respecto de los obtenidos con $^{90}\text{Y-DOTA-biotina}$, lo que obedece a la supremacía en cuanto a la K_a para ^{90}Y con DOTA mencionada en 2.2.4.

PAGRIT® permite dissociar el reconocimiento antigénico (realizado por el AcMo biotinado) de la entrega de la dosis (realizado por la biotina radiomarcada) con lo cual no solo se aumenta la relación dosis en tumor / A_i y se disminuye la dosis en tejido sano, sino que además valiéndose de la heterogeneidad antigénica de los tumores sólidos, permite tratarlos con un cocktail de diferentes AcMos biotinados radiomarcando solamente una biomolécula, el derivado de biotina y no teniendo que realizar el engorroso procedimiento de radiomarcarse cada una de las distintas clases de AcMos del cocktail según la RIT tradicional.

Uno de los requerimientos de esta técnica es un estricto control de pureza radioquímica, dado que si el rendimiento en una marcación particular no es mayor al 95 %, el ^{90}Y libre presente, una vez inyectado se une a la transferrina del plasma y luego se deposita en órganos que tienen afinidad por ese radiometal principalmente médula ósea, provocando toxicidad hematológica (Ixxiv). Estudios dosimétricos realizados en pacientes a los cuales se le aplicó PAGRIT® con $^{90}\text{Y-DOTA-Biotina}$ sin ^{90}Y libre muestran que la dosis media absorbida en tumor fue de 0.62-15.05 mGy/MBq dependiendo de la masa de la lesión, la localización y la patología. Mientras que la dosis más elevada en órganos sanos corresponde a riñones (1.62 ± 1.14 mGy/ MBq), hígado (0.27 ± 0.23 mGy/ MBq) y vejiga (3.61 ± 0.70 mGy/ MBq).

4.5 Discusión general.

En referencia específica a la influencia de agente quelante MAG_3 respecto de los métodos directos de marcación de biomoléculas (entre ellas IgG, UBI y AcMos) con $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ en:

i) el comportamiento *in vitro* se observa una mayor estabilidad y una menor disociación (por transquelación a cisteína en el caso de ^{99m}Tc) producto de la excelente coordinación de los complejos $^{99m}\text{Tc(V)-oxo-MAG}_3\text{-biomolécula}$ y $^{188}\text{Re(V)-oxo-MAG}_3\text{-biomolécula}$.

ii) el comportamiento *in vivo* se observa una mayor permanencia en la circulación sanguínea (τ sangre), una menor disociación y un perfil de eliminación más hepatobiliar que se ve afectado por el número promedio de grupos $^{99m}\text{Tc(V)-oxo-MAG}_3$ o $^{188}\text{Re(V)-oxo-MAG}_3$ unidos por biomolécula. Este aspecto cobra mayor importancia en el caso de los radiofármacos terapéuticos, por las consecuencias del aumento de la dosis sobre tejidos (mucosa gástrica) y órganos sanos (glándulas tiroideas) por efecto de la disociación *in vivo*. Y no es crítico en el caso de radiofármacos de diagnóstico donde solo se busca obtener una imagen a tiempos cortos con una buena localización en el tejido afectado (infección, inflamación, tumor).

En un trabajo realizado por Rusckowski et al (Ixxv) sobre el péptido de tamaño relativamente pequeño (PM 6.7 KDa) radiomarcado con ^{99m}Tc con 4 diferentes quelantes, se observa claramente la influencia que ejerce el quelante sobre la ruta de depuración biológica en ratones a 3 h p.i., 15 ± 1.0 % D.I. por riñón para $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-HNE-2}$ (depuración hepatobiliar) vs 45 ± 6.0 % D.I. por riñón para $^{99m}\text{Tc-HYNIC-HNE-2}$ (depuración renal, más hidrofílico).

En un esfuerzo por minimizar la excreción hepatobiliar (caracterizada por un lento pasaje a través del tracto gastrointestinal) de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-affibody}$ (58 aa), investigadores suecos (Ixxvi) evaluaron la diferencia en los patrones de excreción por biodistribución en ratones normales empleando un nuevo BFCA derivado de MAG_3 desarrollado por Hnatowich, llamado MAS_3 . Este se obtiene reemplazando en el BFCA,

los residuos glicina por serina, que es un aa más hidrofílico que contiene un grupo oxidrilo en la cadena lateral. Empleando ^{99m}Tc -MAS₃-affibody se produjo un corrimiento hacia la excreción renal (20 D.I./g en riñón) disminuyendo la elevada acumulación de actividad en el abdomen (10 % D.I./g en intestino).

Es necesario recalcar, para el caso de pequeñas biomoléculas cuyo primer mecanismo de acercamiento al blanco es electrostático que la introducción de un BFCA para su radiomarcación puede producir una modificación de la distribución de carga en la biomolécula que origine una disminución del porcentaje de unión *in vitro* e *in vivo* a bacterias, con la consecuente disminución en la localización del sitio infectado en la imagen.

En grandes biomoléculas como ser IgG (PM 150.000) los agentes quelantes y los distintos métodos de radiomarcación no afectaron la capacidad para acumularse en sitios de inflamación, como se desprende de la comparación de la relación PI/PN en ratones. Sin embargo el grupo de Corstens (lxxvii) demostró haciendo experiencias *in vivo* con ^{99m}Tc -iminotiolano-IgG-¹⁴C (introducción de grupos -SH) y ^{99m}Tc -HYNIC-Tricina-IgG-¹⁴C que el porcentaje de ^{99m}Tc disociado de la hIgG en plasma a 24 h fue claramente diferente (43 y 18 % respectivamente), lo cual fundamenta la influencia del agente quelante (en este caso HYNIC) en la estabilidad *in vivo* del radiocomplejo. Y lo que es más importante, comprobaron que la tasa de desaparición de ^{99m}Tc del plasma en ratas inyectadas con ^{99m}Tc -iminotiolano-IgG-¹⁴C es mayor que la tasa de desaparición de ¹⁴C-IgG, favoreciendo la hipótesis de la transquelación de ^{99m}Tc con compuestos de bajo peso molecular conteniendo grupos -SH respecto de la liberación como resultado del catabolismo de la proteína (lxxviii). En esa misma línea de trabajo, el grupo de Hnatowich comprobó que la mayor parte del radionucleído es excretada en ratón como ^{99m}Tc -cisteína y ^{99m}Tc -glutatinó demostrando que en anticuerpos radiomarcados (lxxix) se produce transquelación de ^{99m}Tc y sugiriendo que proceso se produciría en suero.

En todos los casos el rendimiento de marcación y la Ae alcanzada por métodos directos fue claramente superior a las obtenidas por métodos indirectos.

Otro efecto a tener en cuenta, tiene que ver con la disminución de la capacidad de reconocimiento biológico por parte de un anticuerpo radiomarcado por efecto del proceso de liofilización.

V. CONCLUSIONES

5.1 IgG radiomarcada con ^{99m}Tc

Dos métodos directos de marcación fueron optimizados para la radiomarcación de anticuerpos policlonales con ^{99m}Tc a saber, fotoactivación y reducción con 2-ME y fueron comparados con el método indirecto ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$) (xlvii) aplicado en nuestro laboratorio. La principal ventaja de los métodos indirectos es que pueden ser empleados con un amplio rango de biomoléculas en contraste con los dos métodos directos optimizados que pueden ser usados solo para la marcación de grandes moléculas y que contengan aminoácidos con puentes disulfuro. Sin embargo, los BFCA (por Ej. NHS-acetil- MAG_3) no son de fácil disponibilidad -muchas veces requieren ser sintetizados- y para los métodos indirectos son necesarios ciertos pasos intermedios de purificación.

La principal ventaja del método directo por reducción con 2-ME es la posibilidad de desarrollar una formulación como kit liofilizado que puede ser fácilmente radiomarcado en cualquier centro de Medicina Nuclear para estudios diagnósticos.

El otro método directo optimizado, la fotoactivación, es extremadamente simple y eficiente para la marcación de IgG con ^{99m}Tc , particularmente atractivo dado que no requiere purificación, ventajoso dado que el producto radiomarcado obtenido tiene un bajo τ en sangre disminuyendo la dosis en cuerpo entero y que la baja concentración de Ac requerida (2.6 mg / ml) permite su potencial aplicación a pequeños batches de Ac preparados en instituciones académicas frecuentemente producidos a baja concentración sin necesidad de implementar procedimientos para concentrar que encierran la posibilidad de contaminación. Sin embargo, no resultaría apropiado para la marcación de AcMos de aplicación en RID debido a que por razones aún no esclarecidas produce una disminución en la inmunoreactividad.

El objetivo de esta parte del trabajo de tesis consistió en evaluar el comportamiento radioquímico y biológico de los dos productos radiomarcados optimizados (métodos directos) y compararlo con el método indirecto ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$). Los radiocromatogramas (HPLC) muestran un pico prominente de IgG radiomarcada a RT entre 7 y 8 min. en los tres casos, indicando que fue obtenida una marcación exitosa. La pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$ aún después de la purificación (aprox. 90 %) es inferior a la obtenida por métodos directos. Sin embargo el procedimiento simplificado de conjugación de NHS-acetil- MAG_3 puede proveer una alternativa para la marcación con ^{99m}Tc de anticuerpos y otras biomoléculas con grupos amino libres.

Los dos productos obtenidos por métodos directos fueron más susceptibles de transquelación con cisteína que el obtenido por método indirecto. Los estudios de biodistribución estuvieron en concordancia con estos resultados, mostrando que la captación en hígado fue inferior a la eliminación renal para la IgG radiomarcada por los dos métodos directos, mientras que la captación en esos dos tejidos no mostró diferencias significativas para el $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-IgG}$, que tuvo menos transquelación con cisteína y menos eliminación renal. Se observa también en los métodos directos especialmente con el $^{99m}\text{Tc-IgG}$ fotoactivado que la radioactividad fue depurada mucho más rápidamente de la sangre (τ sangre = 10.5 ± 6.2 h) y los tejidos, que se correlaciona con el bajo porcentaje de retención de At en cuerpo entero a 5 h p.i. Sin embargo dado que la depuración no solo afecta a los tejidos normales sino también a los tejidos inflamados, la relación PI/PN fue similar e independiente del método de marcación.

Las imágenes adquiridas en cámara gamma con ratones portadores de un sitio de inflamación inyectados con $^{99m}\text{Tc-IgG}$ (kit liofilizado) mostraron resultados

concordantes con los estudios de biodistribución y una localización temprana del radiofármaco en el tejido inflamado.

Concluyendo, la formulación optimizada de IgG (kit liofilizado) para marcar con ^{99m}Tc mostró ser efectiva para la detección de sitios de infección / inflamación en los ensayos *in vivo* realizados, cumpliendo con varios de los criterios asociados al radiofármaco ideal como ser: fácil preparación radiofarmacéutica, amplia disponibilidad y bajo costo para ambos, radionucleído y radiofármaco, baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune, acumulación fisiológica poco significativa en médula ósea y pulmones, rápido lavado del fondo y del blanco, y rápida detección (4 h p.i.) de focos de infección / inflamación.

5.2 UBI 29-41 radiomarcado con ^{99m}Tc

Dos métodos directos y uno indirecto fueron evaluados para la radiomarcación de UBI 29-41 con ^{99m}Tc a saber, método con borohidruro (a), método con NaOH a pH alcalino (b) y método por conjugación a MAG_3 (c). Los resultados fueron comparados con los obtenidos por otro método indirecto evaluado en nuestro laboratorio, usando NHS-HYNIC como BFCA y tricina como coligando.

Los tres productos fueron obtenidos con elevadas pureza radioquímica y estabilidad *in vitro* y con Ae apropiada para estudios de diagnóstico. Los productos obtenidos por métodos directos fueron más susceptibles de transquelación con cisteína que el obtenido por método indirecto y los estudios de biodistribución estuvieron en concordancia con el grado de transquelación (a mayor grado, mayor eliminación renal) y con el carácter hidrófilico / lipofílico (método indirecto, lipofílico, eliminación hepato-biliar). El porcentaje de unión a bacterias, la relación PI/PN obtenida a partir de las biodistribuciones y la relación SI/SN obtenida a partir de las imágenes adquiridas por autorradiografía con ratones fueron dependientes del método de radiomarcación.

La principal ventaja de la aplicación al UBI 29-41 de los métodos directos de radiomarcación aparte de su simplicidad ya antes mencionada, es que introducen una modificación pequeña en la estructura y en la distribución de cargas de la molécula, permitiéndoles obtener elevados porcentajes de unión *in vitro* a bacteria y máxima localización *in vivo* en sitios de infección a 2 h p.i. para el método a.

La principal ventaja que ofrecen los métodos indirectos es que producen radiocomplejos más estables y que tienen menor transquelación con cisteína, propiedades ambas que no son de gran relevancia en péptidos como el UBI 29-41, de vida media biológica corta (144 min.) y para adquisición de imágenes tempranas (1 h p.i.). Como desventajas presentan el hecho también previamente mencionado, de que los BFCA (NHS-acetil- MAG_3 y NHS-HYNIC) no están disponibles comercialmente y que implican pasos de conjugación (con rendimientos no cuantitativos), purificación post-conjugación y purificación post-marcación en algunos casos.

Las autorradiografías a 2 h p.i. correspondientes a ratones con infección utilizando ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método a) mostraron localización precisa en áreas comprometidas con mayor intensidad (SI / SN 6.69 ± 0.99) que las obtenidas a partir de *S.a* irradiados. Las obtenidas a partir de *S.a*. muertos por calentamiento (inflamación estéril) no mostraron localización (negativo).

El fragmento sintético 29-41 de la ubiquidina (UBI 29-41) radiomarcado con ^{99m}Tc por el método a, ha mostrado la máxima localización en sitios de infección y capacidad de discriminar entre procesos infecciosos producidos por *S.a.* (usando ^{99m}Tc - Sc UBI 29-41 como control negativo) e inflamaciones estériles (usando ^{99m}Tc -IgG kit como control positivo) en ratones NIH a 2 h p.i. corroborando trabajos previos realizados por Welling et al (LUMC). Sin embargo con el objeto de evitar la toxicidad provocada por el

borohidruro, solo el ^{99m}Tc -UBI 29-41 (método b) fue empleado en estudios clínicos en pacientes con osteomielitis, mostrando resultados promisorios (Marítnez-Duncker et al), que lo hacen un candidato ideal para la localización temprana de sitios infecciosos usando cámara gamma.

Finalmente, el ^{99m}Tc -UBI 29-41 cumple además varios de los criterios asociados al radiofármaco ideal como ser: fácil y rápida preparación radiofarmacéutica, disponibilidad y bajo costo para el radionucleído y el radiofármaco, ausencia de respuesta inmune, acumulación fisiológica poco significativa en médula ósea y pulmones, rápido lavado del fondo y del blanco, y rápida detección (2 h p.i.) de focos de infección.

5.3 Anticuerpos radiomarcados con ^{188}Re

La utilización en RIT de un AcMo anti CD20 radiomarcado con ^{90}Y (Zevalin, Schering) se comprobó que incrementa significativamente la efectividad terapéutica del Rituximab en el tratamiento de LNH, hecho que abre la posibilidad de asociarle ^{188}Re -Rituximab (obtenido por método directo) con igual finalidad. La evaluación del kit liofilizado de Rituximab para ser radiomarcado con una elusión de perrenato, a pH 3.0 y en presencia de ácido gntísico mostró excelentes eficiencia de marcación y Ae, ausencia de agregados y fragmentos proteicos, elevada estabilidad *in vitro* a 43 h, leve disociación *in vivo*, y mayor unión específica a linfocitos B que el ^{131}I -Rituximab. Estos resultados constituyen al método directo de marcación evaluado en este trabajo de tesis, en un candidato ideal para la obtención de productos radiomarcados con ^{188}Re de aplicación potencial en aquellos casos en que el AcMo radiomarcado permanece unido en el dominio extracelular, como es el caso del Rituximab.

Por otra parte el método indirecto de radiomarcación de IgG y AcMo utilizando ^{188}Re -MAG₃-TFP mostró bajos rendimiento y Ae, mayor permanencia en circulación y menor disociación ya sea *in vitro* e *in vivo*, haciendo preferible su aplicación en aquellos casos en que el AcMo ingresa al dominio intracelular. La hipótesis es que en el medio citoplasmático el complejo radionucleído-BFCA debería ser más resistente a la acción enzimática que un producto radiomarcado por método directo, con la consiguiente disminución de la disociación de ^{188}Re a nivel intracelular.

5.4 Derivados de biotina radiomarcados con ^{188}Re y con ^{90}Y

En los últimos años se han desarrollado distintos derivados de biotina unidos a BFCA (como ser DOTA-biotina) (lxxx) que no sufren hidrólisis por acción de la enzima biotinidasa presente en el suero sanguíneo. Siguiendo la línea de investigación comenzada en el IEO, se ha desarrollado un derivado de biotina radiomarcado con ^{188}Re -MAG₃ que posee un grupo amida invertido para estabilizarlo contra la degradación enzimática de la biotinidasa y que retiene su afinidad hacia avidina, mostrando que este nuevo conjugado puede ser un candidato apropiado para el tratamiento de tumores sólidos en un sistema de “pretargeting” bajo administración locoregional.

5.5 Conclusiones generales

Es posible extraer algunas conclusiones de los distintos métodos de marcación basándose en la química de coordinación para Tc y Re.

La marcación directa de biomoléculas con ^{99m}Tc (2.4.1 y 2.6.1)) ha mostrado ser exitosa para la marcación de proteínas que tienen grupos SH disponibles lo cual incluye IgG y

AcMos. La desventaja de este método es que la química de coordinación no puede ser controlada dado que la identidad y los sitios de unión no son conocidos.

En el caso particular de la marcación con ^{99m}Tc por fotoactivación (2.4.2) para IgG (que como se discutió no actúa sobre un blanco específico) trae como beneficio una más rápida depuración sanguínea con una dosis levemente inferior al paciente. Sin embargo la fotoactivación no sería recomendable para la marcación con ^{99m}Tc de AcMos que si son antígeno-específicos porque se ha detectado una disminución de la inmunoreactividad como consecuencia de la irradiación UV.

El uso de quelantes preformados (S-Bz-MAG₃) (2.6.2) donde el metal quelado es unido por un procedimiento de conjugación a una biomolécula a través de un grupo activo éster en una cadena del quelante (grupo carboxilo) es un approach más viable. La ventaja de la marcación de IgG y AcMos con emisores beta negativos como ser ^{188}Re es que el quelante provee una quelación del metal estable e inerte, con una química bien definida y sin unión inespecífica del metal. Además la biomolécula no es expuesta a las condiciones extremas de marcación (alta temperatura, pH alcalino y presencia de agentes reductores) lo cual es importante para la preservación de la estructura terciaria y de la inmunoreactividad de proteínas y AcMos. Asimismo como consecuencia de la estabilidad de la marca disminuye el ^{188}Re libre en circulación disminuyendo la acumulación en tejidos no blanco y la dosis en cuerpo entero, que es un parámetro crítico en RIT. La desventaja es que esta técnica tiene bajo rendimiento y es larga y compleja, por lo que es casi imposible adaptarla al laboratorio de un servicio de Medicina Nuclear en nuestro país. Pero sin duda es de gran valor para un laboratorio de investigación en Radiofarmacia, dado que permite preparar y evaluar rápidamente nuevos compuestos bioactivos marcados con ^{99m}Tc y ^{188}Re , como los utilizados en este trabajo de tesis.

El otro de los métodos indirectos, la marcación post-conjugación de MAG₃-IgG y MAG₃-AcMos (2.3.2.2) tiene como desventaja la posibilidad de una unión no específica y lábil del metal a la biomolécula en el caso del ^{99m}Tc y es imposible de implementar con ^{188}Re porque las condiciones requeridas para la misma (elevada temperatura) provocaría la desnaturalización de la proteína.

Cuando nos restringimos a la marcación de pequeños fragmentos de péptidos catiónicos antimicrobianos como el UBI 29-41 que no poseen puentes disulfuro y que a su vez presentan en su estructura grupos capaces de coordinar el tecnecio, el escenario se transforma.

La marcación directa tradicional no se puede realizar por la imposibilidad de generar grupos SH. Sin embargo es posible otro tipo de marcación directa en medio alcalino (2.5.1 y 2.5.2) donde la secuencia peptídica que incluye el grupo amino de la Lys entre otros, forma un complejo de coordinación con el core Tc(V)O, que no se produce cuando la Lys es bloqueada con t-BOC.

La marcación indirecta post-conjugación (2.5.3) tiene la ventaja de que minimiza la unión inespecífica, aunque no la elimina dado que puede haber moléculas no conjugadas que se marquen (3.4.1.3). Es exitosa para la marcación de péptidos y otras biomoléculas que son estables bajo las condiciones de marcación (alta temperatura y pH alcalino). Su gran desventaja es que el tamaño, la masa y las características del complejo disminuyen la unión a bacteria *in vitro*, la acumulación en sitios con infección *in vivo* y modifican la biodistribución.

Por último para el caso de derivados de biotina marcados con emisores beta negativo para PAGRIT® podemos mencionar que debido a la ausencia de grupos SH y NH₂ es imposible la aplicación de un método directo o indirecto de marcación. La única marcación posible es usando derivados de biotina conteniendo un grupo amino y aplicando el método del quelante preformado (2.7.1) que provee una quelación estable e inerte (aunque no tan inerte como ⁹⁰Y-DOTA-biotina), sin unión inespecífica del metal y que permite la formación de una unión amida invertida que sería resistente a la acción enzimática de la biotinidasa. La desventaja del método indirecto es que el complejo conjugado (de carácter lipofílico en este caso) podría afectar negativamente la biodistribución, restringiendo su uso aplicación a PAGRIT® locoregional.

Como se observa en los resultados, en la discusión y en las conclusiones precedentes, ni el radiofármaco ideal para diagnóstico de infecciones e inflamaciones, ni el radiofármaco ideal para RIT y PAGRIT® oncológica en Medicina Nuclear existen aún. Sin embargo se continúan realizando trabajos de investigación clínica con nuevos radiofármacos de ^{99m}Tc y ¹⁸⁸Re, aprovechando el background de conocimiento acumulado referente a la química de estos dos radionucleídos y a sus adecuadas propiedades físicas para diagnóstico y terapia.

Como se ha discutido precedentemente, la selección de un BFCA o de un método de marcación para un determinado tipo de biomolécula con un determinado radionucleído encierra interrogantes que no pueden ser respondidos *a priori* basándose en consideraciones de tipo hidrofílico / lipofílico. Por el contrario, luego de optimizar parámetros fundamentales de un método (rendimientos, Ae, etc.) es necesario hacer una evaluación *in vitro* e *in vivo*, cuyos resultados son muchas veces inesperados y nos invitan a reflexionar acerca de la complejidad de los mecanismos de acción de ciertas biomoléculas, su internalización y posterior degradación en la célula cancerosa o bacteria y de su metabolismo en el organismo humano.

Se manifiesta entonces claramente ***la influencia “crucial” de los BFCA y de los métodos de marcación en el comportamiento in vitro e in vivo de biomoléculas marcadas con radionucleídos emisores γ y β - de uso potencial en diagnóstico y terapia en Medicina Nuclear.***

VI. ANEXOS

6.1 Publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis

- 1- "Labeling of photoactivated IgG with ^{99m}Tc ."
Crudo J., Viaggi M., Castiglia S.
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, vol.238, pag. 183-185, dic 1998.
- 2- "In vitro and in vivo studies of ^{99m}Tc IgG: A comparison between three labeling methods."
M. Viaggi, J. Crudo, S.G. de Castiglia
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, vol.241, pag.173-177, N.1, 1999.
- 3- "Preparation of ^{188}Re -norbiotinamine using S-benzoyl-MAG₃ as chelating agent"
J.L. Crudo, F. Sudati, M. Chinol, S.G. de Castiglia.
Technetium, Rhenium and other metals in chemistry and nuclear chemistry, SGEEditoriali, Padova. Vol. 6:(2002), 563-565.
- 4- "Optimization of antibody labeling with rhenium-188 using a prelabeled MAG3 chelate"
Crudo J., Edreira M., Obenaus E., Chinol M., Paganelli G. y Castiglia S.G
International Journal of Pharmaceutics, vol. 248, Issue 1-2. Pages 173-182, año 2002.
- 5- "Optimization of biomolecules labelling with Rhenium-188 using direct and indirect methods"
S. G. de Castiglia, J. Crudo, E. Obenaus, M. Edreira, E. D'Orío.
IAEA-TECDOC-1359, pag. 31-44, Julio de 2003.
- 6- " ^{99m}Tc -UBI 29-41: biodistribución y autoradiografía digital en ratones con S.a. viables, S.a. no viables obtenidos por irradiación γ y S.a. muertos por calor.
J.L. Crudo, A.M. Zapata, J.H. Perez, E.R. Obenaus, S.G de Castiglia.
Alasbimn Journal 6:(25), July 2004.
- 7- "Labeling of the anti-melanoma 14f7 monoclonal antibody with Rhenium-188-MAG₃ chelate: conjugation optimization, in vitro stability and animal studies".
J. L Crudo, M. M. Edreira, E. R. Obenaus and S. G. de Castiglia
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, vol.261, N.2, pag. 337-342 (2004).
- 8- "In vitro and in vivo evaluation of ^{99m}Tc -labelled peptides for infection imaging"
J. Crudo, A. Zapata, N.Nevares, E. Obenaus, S.G. de Castiglia.
IAEA-TECDOC-1414, pag. 11-22, Septiembre de 2004.

6.2 Presentaciones realizadas relacionadas con el trabajo de tesis

- 1- "Labeling of photoactivated IgG with ^{99m}Tc ."
Crudo J., Viaggi M., Castiglia S.G. de.
IV Meeting on Nuclear Applications, Pozos de Caldas, Brazil, agosto 1997.
Proceeding del IV Meeting on Nuclear Applications, CD file (e09_285)
- 2- "Obtención de biomoléculas marcadas con 188-Re utilizando MAG-3 como quelante".
(Presentación oral)
J. Crudo, E. Obenaus, M. Edreira, S. G. de Castiglia
XVI Congreso de ALASBMN, Buenos Aires, 24-28 oct., 1999.
Alasbimn Journal 2(5):October 1999.
- 3- "Obtención de un radioinmunoconjugado de IgG policlonal usando 153-Sm."
J. Crudo, E. Obenaus, M. Edreira, S.G. de Castiglia
XVI Congreso de ALASBMN, Buenos Aires, 24-28 oct., 1999.
Alasbimn Journal 2(5):October 1999
- 4- "IgG policlonal humana marcada: comparación entre tres radionucleídos terapéuticos ^{153}Sm , ^{177}Lu y ^{188}Re ."
Crudo J.L., Obenaus E., Edreira M., Castiglia S.G. de
2da Conferencia Argentina Multidisciplinaria sobre Cancer de la European School of Oncology,

- Buenos Aires, 17 al 19 de Abril del 2000.
 Nuevas Tendencias en Oncología, Vol. IX-Num. 1 (suplemento) Abril 2000.
 5-“Anticuerpo monoclonal antimelanoma 14f7 marcado con ^{188}Re : ensayos *in vitro* e *in vivo*.”
 (Presentación oral)
Crudo J.L., Edreira M., Castiglia S.G de
 Congreso Ibero-Americano de Medicina Nuclear. XVII Congreso de la ALASBMN.
 Porto, Portugal, 17-21 de Octubre de 2000.
 Alasbimn Journal 3(9):October 2000.
 6-“Labeling of the anti-melanoma 14f7 monoclonal antibody with rhenium-188 using a pre-labeled MAG_3 chelate: optimisation, *in vitro*, and *in vivo* analysis.” (Poster)
Crudo J.L., Edreira M., Obenaus E., Castiglia S.G. de
 European Congress of Nuclear Medicine.
 Napoli, Italia, 24-29 de agosto de 2001.
 European Journal of Nuclear Medicine, vol. 28(8), Agosto 2001, pag. 1160.
 7-“Radiomarcación de péptidos catiónicos antimicrobianos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por un método directo: estudios *in vitro*.” (Poster)
Crudo J., Obenaus E., Perez J. y Castiglia S.G
 Alasbimn Journal 4:(15), April 2002.
 8-“First Clinical latin American Experience with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled biotin using a 3-step pretargeting approach.” (Poster)
 Verdera S., Gaudiano J., Balter H., Rodriguez G., Souto B., Hermida J., Crudo J., Chinol M.
 Alasbimn Journal 4:(15), April 2002.
 7 y 8 en XIII Congreso de la AABymN
 Ira Jornada de Países del Mercosur de Biología y Medicina Nuclear
 Buenos Aires, 2-4 de Noviembre del 2001
 9-“Preparación y evaluación *in vitro* de ^{188}Re - MAG_3 -norbiotinamine: un agente potencial para “three step rit” locoregional de gliomas de alto grado”.
Crudo J., Sudati F, Chinol M, Obenaus E y Castiglia SG de.
 XX Jornadas de Oncología del Instituto A. Roffo, Buenos Aires, Agosto 2004.
 10-“*In vitro* and *in vivo* comparison of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled-UBI 29-41 by four different methods”
Crudo J.L., Nevares N., Zapata A.M., Bronzi M.E., Sorge A.E., Obenaus E.R., Castiglia S.G de.
 European Symposium on Radiopharmaceuticals and Radiopharmacy, Gdansk, Polonia, 9-12 de Septiembre de 2004.
 11- “Un estudio completo sobre la obtención de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 y su comportamiento *in vitro* e *in vivo*: su potencial uso en imágenes de infecciones”
Crudo J.L., Nevares N., Zapata A.M., Perez J.H., Obenaus E.R., Castiglia S.G de.
 12-“ $^{131\text{I}}$ -antiCD20 para el tratamiento de linfomas no hodgkin: marcación y control de calidad”
 Nevares N., Zapata A.M., Crudo J.L., Obenaus E., Perez J.H., Castiglia S.G de.
 13-“Obtención del péptido antimicrobiano UBI 29-41 marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ empleando un método indirecto”
 Nevares N., Crudo J.L., Zapata A.M., Castiglia S.G de.
 11 a 13 en XIV Congreso de la AABymN
 Seminario de Nuevas Aplicaciones en Medicina Nuclear (PET y Radioterapia interna)
 Buenos Aires, 12-14 de Noviembre del 2004

6.3 Premios recibidos relacionados con el trabajo de tesis

Premio de Investigación básica “Jorge Varela” otorgado por la Asociación Argentina de Biología y Medicina Nuclear, por el trabajo titulado: “UN ESTUDIO COMPLETO SOBRE LA OBTENCIÓN DE $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 Y SU COMPORTAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO*: SU POTENCIAL USO EN IMÁGENES DE INFECCIONES”, Crudo J.L., Nevares N., Zapata A.M., Perez J.H., Obenaus E.R., Castiglia S.G de.
 En el marco del XIV Congreso de la AABymN. Seminario de Nuevas Aplicaciones en Medicina Nuclear (PET y Radioterapia interna). Buenos Aires, 12-14 de Noviembre del 2004.

“Junior Travel Award”: a jóvenes investigadores no pertenecientes a la Unión Europea, seleccionados por trabajos presentados (como primeros autores) al 6th Symposium on Technetium in Chemistry and Nuclear Medicine (Bressanone, Italia, 4-7 de Septiembre del 2002).

Otorgado por el Comité Científico del Simposio, por el trabajo titulado “Preparation of ^{188}Re -norbiotinamine using S-benzoyl-MAG₃ as chelating agent”. J. Crudo, F. Sudatti, M. Chinol, S.G. de Castiglia. El premio fue financiado por Schering AG, Germany.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- i Datz FL, Jacobs J, Baker W et al, J Nucl Med 1984; 25: 303-306
- ii Soroa VE, Degrossi OJ et al, Diagnóstico 1994, 3, num. 3:153-157
- iii Blok D et al, Eur J Nucl Med 1990, 16: 303-305
- iv Berna L et al, Eur J Nucl Med 1992, 19: 173-176.
- v Postema EJ et al. Eur J Nucl Med 2001, 28: 1725-1735.
- vi G. Paganelli, P. Riva, G. Delcide et al, Int. J. Cancer Suppl., 1988, 2, 121
- vii Goldenberg DM. J Nucl Med 2002; 43: 693-713.
- viii Paganelli G et al. Tumor targeting 1998, 3: 96-104.
- ix Grana C et al. Tumor targeting 1996,2: 230-239.
- x Comisariado de Energía Atómica de Francia. Bureau Nacional de Metrología. Tabla de radionucleídos. 1982
- xi Mondino A., Introducción a la química de las radiaciones. Apunte de Maestría en Radioquímica. Buenos Aires, 2001.
- xii González A.J., Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante. Traducción del original en inglés, Alejandro Placer - Asesor Técnico, CSN, Madrid
- xiii Efectos biológicos de las radiaciones. Curso de protección radiológica y seguridad nuclear IAEA-UBA-ARN
- xiv Nagasawa H. et al Radiation Research 1999, 152: 552-557.
- xv Hnatowich D.J. et al., Semin. Nucl. Med. 1990, 20: 80.
- xvi Pauwels E. et al. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine, 1995, 4: 519-525, SGEEditoriali
- xvii Tollin M., Peptides 2003, 24: 523-530.
- xviii Hiemstra P., J Leukocyte Biol 1999, 66: 423-428.
- xix Welling MM., Eur J Nucl Med 2000, 27: 292-301.
- xx Zijlstra S., Appl Radiat Isotop 2006, 64: 802-807.
- xxi Goldenberg DM. J Nucl Med 2002; 43: 693-713.
- xxii Meares CF et al. Anal Biochem 1984; 142: 68-78.
- xxiii Cutler CS et al. Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals 2000, 15: 531-540.
- Magnani P et al. J Nucl Med 1996; 37: 967-971
- Crudo JL et al. Int Jour of Pharm 2002, 248: 173-182
- xxiv Grana C et al. Tumor targeting 1996,2: 230-239.
- xxv Crudo et al, Book of extended synopses ISTR 2005, 222-223, IAEA-CN-130 (abstract)
- xxvi Comisariado de Energía Atómica de Francia. Bureau Nacional de Metrología. Tabla de radionucleídos. 1982
- xxvii ARCAL-OIEA Manual de protocolos de calidad de radiofármacos, 1999, pag. 19
- xxviii Yi Wang et al. Nature Protocols 2006, 1: 1477-1480
- xxix Volkert W.A. et al. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine, 1995, 4: 17-26, SGEEditoriali
- xxx Su F.M. et al. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine, 1995, 4: 511-517, SGEEditoriali
- xxxi Bartis J. et al. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine, 1999, 5: 409-417, SGEEditoriali
- xxxii H. Stetter, W. Frank., Angew. Chem., 1976, 88, 760.
- xxxiii H. Stetter, W. Frank, R. Mertens, Tetrahedron, 1981, 37, 767.
- xxxiv Rhodes B.A. et al., J. Nucl. Med., 1986, 27 : 685.
- xxxv Mather S.J. et al., J. Nucl. Med., 1990, 31 : 692.
- xxxvi Thakur M.L et al., Nucl. Med. Biol., 1991, 18 : 227.
- xxxvii Sykes T.R. et al. J. Nucl. Med., 1993, 43 :100.
- xxxviii Arano Y. et al., Nucl. Med. Biol., 1986, 12 : 425.
- xxxix Fritzberg A.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 1988, 85 : 4025.
- xl Schwarz A. et al. J. Nucl. Med., 1987, 28 : 721.

-
- xli Riches A.C., Sharp J.G., Brynmor Thomas D. et al., *J Physiol.*, 1973 January; 228(2): 279–284.
- xlvi Yi Wang et al. *Nature Protocols* 2007, 2: 972-978
- xlvi Proyecto ARCAL LII-OIEA, Preparación y control de calidad de radiofármacos ¹⁸⁸Re-anti-CD20 y ¹³¹I-anti-CD20 para el tratamiento de linfomas.2004
- xliv Szalecki W., *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7 (2): 271 -273
- xliv Oak Ridge National Laboratory. Procedimiento de elución y purificación del generador ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re. Página web del ORNL.
- xlvi Crudo J. et al. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1998, 238 : 183-185.
- xlvi Viaggi M. et al., *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1999, 241 : 173-177, N.1.
- xlvi Arteaga de Murphy C, Meléndez-Alafort L, Martínez-Rivero O. et al, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1997, 220: 41-45, N.1,
- xlvi Thakur ML, DeFulvio J, Richard MD et al, *Nucl Med Biol* 1991, 2: 227-233, num 18.
- li Stalteri M, Mather SJ, *Eur J Nuc Med*, 1996, 23: 178-187.
- li Colombetti L, *Biological transport of radiotracers*, CRC press, 1982, 160-161
- lii Karacay H, Ong GL, Hansen HJ et al, *Nuc Med Comun*, 1998, 19: 971-979.
- lii Juweid M, Fischman AJ, Rubin RH et al, *Nucl. Med. Commun.* 1991, 12: 637-644
- lii Jasin HE, *J.Clin. Invest.* 1988, 81: 6-15
- lii Wang SJ, Lin NY, Kao CH et al, *Nucl. Med. Commun.* 1993, 14(11): 1030-1034
- lii Soroa V, Experiencia clínica con la inmunoglobulina policlonal marcada con ^{99m}Tc
- lii Zamora PO, Eshima D, Shattuck LA et al, *J. Nuc Med*, 1993, 34: 246P
- lii Brouwer C. et al., *Peptides* 2006, 66, pag 7.
- lii Crudo JL., *Alasbimn Journal*, April 2005, 28
- lii Meléndez-Alafort L., *Nucl Med Biol* 2003, 30: 605-15
- lii Sarda-Mantel L et al. *Eur J Nuc Med Mol Imaging* 2007,34: 1302-1309.
- lii Nevares NN, Tesis de Maestría en Radioquímica, Universidad Tecnológica Nacional-Instituto de Estudios Nucleares, Comisión Nacional de Energía Atómica.
- lii Akhtar MS, *J Nuc Med* 2005, 46: 567-573.
- lii Akhtar MS et al, *J Nucl Med.* 2004; 45 :849-56.
- lii Meléndez-Alafort L., *Nucl Med Biol* 2004, 31: 373-379.
- lii Sailerova E and Billingham MW, *Appl. Radiat. Isot.* Nov-Dec 2003, 59(5-6):311-319
- lii Breitz H., *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 2004, vol. 19, num. 3.
- lii Van Gog FB, Visser GW, Klok R et al, *J Nuc Med* 1996, 37: 352-362.
- lii Colombetti L., *Biological transport of radiotracers*, CRC pres, 1982, 256.
- lii Mojiminiyl SA., *J Nucl Med* 1990, 31: 381-382
- lii Dadachova E., *J Nuc Med* 2004, 45: 313-320.
- lii Dadachova E., *PNAS USA*, 2003, 100: 10942-10947.
- lii Dadachova E., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 2004, 1624-1629.
- lii Grana C et al. *Tumor targeting*, 1996, 2: 230-239.
- lii Rusckowski M et al, *J. Nuc Med*, 2001, 42: 1870-1877
- lii Engfeldt T., *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34:1843–1853
- lii Claessens RA, Koenders EB, Oyen WJ et al *Eur J Nuc Med*, 1996, 23:1536-1539
- lii Claessens RA, Boerman OC, Koenders EB, et al *Eur J Nuc Med*, 1996, 23: 414-421
- lii Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rusckowski M et al, *J. Nuc Med*, 1993, 34: 109-119.
- lii Cremonesi M et al. *Eur J Nuc Med* 1999, 26 : 110-120.