

Desarrollo y evaluación de un ligando flexible para la preparación de radiofármacos de ^{99m}Tc

Nancy Crócamo, Javier Giglio, Soledad Fernández, Ana María Rey Ríos.

Resumen

Nuestro objetivo fue desarrollar dos métodos de marcación con ^{99m}Tc (mediante complejos $^{99m}\text{Tc(III)-4+1}$ y $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbonilos}$) con un ligando flexible conteniendo el grupo 5-nitroimidazol como farmacóforo biorreducible y el grupo isonitrilo para coordinar el metal. Los complejos fueron comparados a través de su estabilidad, lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. Ambos complejos fueron obtenidos con adecuada pureza radioquímica (PR) y resultaron estables al menos 4h post-marcado, al menos 2h post-incubación en plasma humano y frente a L-cys. El complejo $^{99m}\text{Tc(III)4+1}$ presentó una lipofilicidad (log.P) de 0,083 y una unión a proteínas plasmáticas tras 1 hora de incubación de 30% aproximadamente. El complejo $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbonílico}$ mostró una menor lipofilicidad (0,065) y unión a proteínas plasmáticas de aproximadamente 10%.

De acuerdo a los resultados se espera que el complejo $^{99m}\text{Tc(I)-tricarbonílico}$ presente rápida depuración sanguínea y excreción preferentemente renal, propiedades deseables para un radiofármaco.

Introducción

El desarrollo de radiofármacos de ^{99m}Tc de tercera generación depende de la posibilidad de contar con métodos de marcación que preserven la actividad biológica del ligando original. Asimismo, es sabido que la metodología de marcación utilizada para combinar el Tc con el ligando de interés tiene gran influencia sobre el comportamiento fisicoquímico y biológico del compuesto resultante^(1,2). Existen diversas opciones interesantes en este sentido, en particular complejos tricarbónicos de Tc(I) [Tc(CO)₃L], y complejos Tc(III) de tipo 4+1, entre otras. Para la formación de cada uno de estos tipos de compuestos se requieren combinaciones de grupos donores de electrones específicas⁽³⁻⁶⁾. Sin embargo, existen algunos grupos funcionales que pueden ser empleados en la obtención de los dos tipos de compuestos antes mencionados, permitiendo de esta manera modular las propiedades del compuesto final.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tuvo por objetivo desarrollar diversas metodologías de marcación con ^{99m}Tc de un mismo ligando biológicamente activo y la comparación de las propiedades fisicoquímicas relevantes del radiotrazador en relación con su potencial aplicación como radiofármaco para diagnóstico oncológico. El ligando seleccionado fue el 4-isociano-*N*-[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il) etil]butanamida (METCN), que se representa en la figura 1.

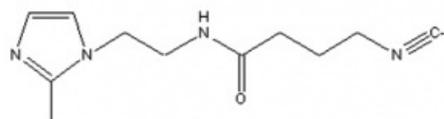


Figura 1 Estructura del ligando utilizado en este estudio.

Se trata de un derivado del metronidazol, fármaco antiparasitario que contiene el grupo 5-nitroimidazol como farmacóforo biorreducible y el grupo isonitrilo para coordinar el metal. Los 5-nitroimidazoles son compuestos biorreducibles que son irreversiblemente reducidos en células con baja presión de O₂ por acción de enzimas intracelulares, originando compuestos hidrofílicos que quedan atrapados dentro de la célula⁽⁷⁾. Por este motivo se ha propuesto su utilización en la preparación de potenciales radiofármacos para detección de zonas hipóxicas en tumores, ya que este estado es un factor fundamental para la falla de los tratamientos de radioterapia externa y también en la quimioterapia.

El ligando seleccionado actuará como monodentado frente al Tc, ya que posee un grupo isonitrilo (NC) como donador de electrones, pudiendo unirse al metal en distintas formas actuando en combinación con coligandos adecuados. En la Figura 2 se muestran dos posibles formas de unión del ligando en estudio al Tc.

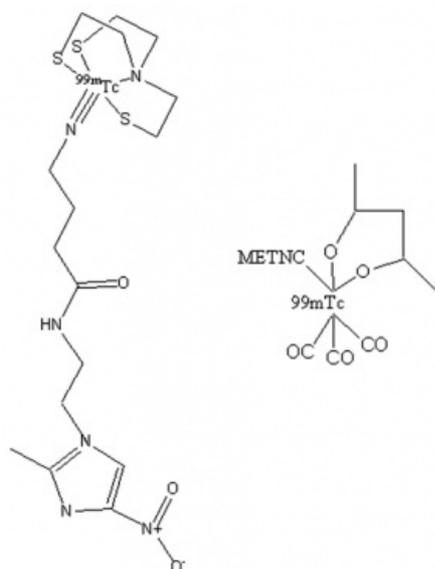


Figura 2 Estructura propuesta para los 2 complejos de ^{99m}Tc estudiados.

Los complejos tricarbónicos de Tc(I) son compuestos en los cuales tres de las posiciones de coordinación del metal son ocupadas por grupos CO fuertemente unidos y las otras tres posiciones pueden ser ocupadas por un ligando tridentado o por la acción simultánea de un ligando monodentado y un coligando bidentado (complejos de tipo 2+1)⁽⁶⁾. Para la marcación del ligando METCN mediante la formación de complejos tricarbónicos de tipo 2+1 se utilizó la acetilacetona como coligando bidentado.

Otra opción para la marcación del ligando de interés es la formación de complejos mixtos 4+1 de Tc(III)^(3,4), los que se forman por combinación del ligando tetradentado de tipo NS₃, 2,2',2'' nitrilotris-etanotiol junto con el isonitrilo METCN en estudio. Fueron preparados ambos complejos y sus propiedades fisicoquímicas (estabilidad en medio de reacción, en plasma humano y frente a cisteína, lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas) fueron comparadas a fin de establecer la influencia del método de marcación en las propiedades del potencial radiofármaco.

Materiales y métodos

Marcación con ^{99m}Tc

La marcación mediante la formación de complejos $^{99m}\text{Tc(III)}$ "4+1" fue realizada en dos pasos utilizando $^{99m}\text{Tc-EDTA/Manitol}$ como complejo precursor. Éste fue obtenido por agregado de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (20 mCi) y SnCl_2 (6,0 mg en 50 μL de HCl concentrado y 6,0 mL de H₂O) a una solución acuosa de EDTA (5,0 mg) y manitol (5,0 mg), ambos en 200 μL de H₂O e incubando 10 min a temperatura ambiente. La pureza radioquímica (PR) fue controlada mediante cromatografía en papel Whatman n^o1/acetona. La formación del complejo final $^{99m}\text{Tc(METNC)NS}_3$ se logra mezclando 200 μL del precursor con 100 μL de una solución de coligando 2,2',2''-nitrilotris etanotiol (NS₃) (0,6 mg en 200 μL de H₂O) y 1,0 mL de una solución de ligando METCN (0,2 mg en 2,0 mL de acetonitrilo) e incubando a 60 °C durante 1 h. La (PR) fue determinada mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector gama NaI(Tl) utilizando una columna Waters C18 (Bondapak™ 125 Å, 10 μm , 3,9 x 300 mm), y un gradiente de fase móvil: (A) ácido trifluoroacético 0,1% en agua y (B) ácido trifluoroacético 0,1% en acetonitrilo a un flujo de 1,0 mL/min, el gradiente de solventes se muestra en la tabla 1.

Tiempo (min)	Ac. Trifluoroacético en CH ₃ CN (%)
0-3	0
3-10	0-100
10-20	100

Tabla 1. Gradiente de solventes utilizado para el control de PR para los complejos de $^{99m}\text{Tc(III)}$ "4+1".

El complejo $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbónico "2+1" se preparó a partir del precursor $[\text{fac}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, obtenido a partir de

borohidruro de sodio (7,0 mg), tartrato de sodio y potasio (20 mg) y carbonato de sodio (4,0 mg) bajo atmósfera de CO(g) con posterior agregado de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ (20 mCi) e incubación a 65-70 °C durante 30 min. Su PR fue controlada mediante HPLC de fase reversa con una columna Phenomenex C18-LUNA (5µm, 150x4,60mm), flujo 1,0 mL/min y como fase móvil metanol y una solución de H_3PO_4 (aq) llevada a pH=2,5 con trietilamina. El gradiente de solventes utilizado se encuentra en la tabla 2.

Tiempo (min)	% solución H_3PO_4	% MeOH
0-3	100	0
3-6	100-75	0-25
6-9	75-66	25-34
9-20	66-0	34-100
20-27	0	100
27-30	0-100	100-0

Tabla 2. Gradiente de solventes utilizado para el control de PR para el precursor $\text{fac}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

Posteriormente se realizó una primer sustitución con el coligando 2,4-Pentanodiona (acetilacetona). Para ello se mezclan 250 µL de precursor previamente neutralizado con 100 µL de NaH_2PO_4 (390 mg/mL) y se agregan 300 µL de una solución acuosa 0,1M del coligando, incubando a 80 °C durante 30 min. Su PR fue controlada en las mismas condiciones que el precursor correspondiente. El último paso consistió en mezclar 150 µL de este complejo intermediario y adicionar 3,0 mg del ligando METCN y calentar 30 min a 80 °C. La PR del complejo final fue controlada con las condiciones anteriormente mencionadas.

Lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas

Para cada complejo obtenido por la lipofilicidad fue estudiada a pH 7,4 a través de la determinación del correspondiente coeficiente de repartición octanol/buffer. Para ello, fueron mezclados 2,0 mL de octanol en un tubo de centrifuga con 2,0 mL de buffer fosfato 0,1M, pH=7,4. Se agregaron posteriormente 100 µL del complejo a estudiar, agitándose mediante vórtex durante 2 min. La mezcla fue centrifugada por 5 min a una velocidad de 5000 rpm y, una vez separadas ambas fases, se midió la actividad en alícuotas de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido de NaI(Tl) de 3"x 3".

La unión a proteínas plasmáticas fue determinada por el método de exclusión molecular, luego de 60 min de incubación de 50 µL de cada complejo marcado con 950µL de plasma humano a 37°C. Para ello, fueron sembradas muestras de plasma (50 µL) sobre columnas Microspin conteniendo Sephadex® G-50. La elución se realizó centrifugando las columnas a 3300 rpm durante 2 min. La actividad retenida en la columna y la actividad eluída fueron medidas en un contador de centelleo sólido de NaI(Tl) de "3x 3".

Estabilidad en el tiempo, en plasma humano y en L-cys

La estabilidad en el tiempo de los complejos de interés se analizó tomando muestras de cada uno de ellos y controlando su PR mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector gamma en las condiciones de solventes nombradas con anterioridad, a los 30 min y a 1, 2, 3 y 4 h post-marcado.

La estabilidad en plasma humano fue estudiada realizando la incubación a 37°C de 100 µL del complejo de interés con 900 µL de plasma humano, retirando muestras a los 30 min, 1 y 2 h post-incubación. A cada muestra se le adicionan 100 µL de etanol absoluto a -15.0°C y esta mezcla se mantuvo en frío durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min a 0°C. Finalmente se tomaron muestras del sobrenadante generado y se realizó el control de PR mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector gama en las condiciones de solventes adecuadas para cada marcado.

La estabilidad en L-cys se estudió mediante la incubación de 100 µL de cada complejo con 0,4 mg de L-cys a 37°C. Se realizan tomas de la mezcla a los 30 min, 1 y 2 de incubación analizando su PR mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector gamma en las condiciones de solventes adecuadas para cada marcado.

Resultados

Marcación con ^{99m}Tc

Ambas técnicas de marcación utilizadas fueron realizadas por sustitución, utilizando en cada caso un precursor adecuado y realizando luego la sustitución mediante el ligando de interés y un coligando adecuado. La preparación del precursor $^{99m}\text{Tc}(\text{III})\text{EDTA}$ / manitol se realizó mediante la reducción del pertecnecio de sodio en una solución acuosa de EDTA y manitol. Su PR fue superior al 90%, condición necesaria para seguir con la posterior sustitución. El siguiente paso consistió en la sustitución del precursor por el ligando de interés y un coligando, un ligando tetradentado de tipo NS_3 que completa la esfera de coordinación del metal. La PR del complejo final resultó de 60-65% con un tiempo de retención (tr.) de 9,98 min. Por tal

motivo fue necesario realizar una purificación mediante HPLC previo a su caracterización fisicoquímica. Se encontró que el complejo de interés es estable al menos 4 h post-marcado, 2 h post-incubación en plasma humano y frente a un exceso de L-cys.

La preparación del complejo ^{99m}Tc -tricarbonílico de Tc(I) implicó la formación del precursor $\text{fac}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ obtenido por reducción del pertechnetato en atmósfera de $\text{CO}(\text{g})$ a presión atmosférica. Su PR fue superior al 90%, con un tr de 3,4 min. La formación del complejo tricarbonílico final fue realizada en 2 etapas: sustitución de 2 moléculas de agua del precursor mediante el coligando bidentado acetilacetona y posterior sustitución de la tercer molécula de agua por el ligando de interés. La PR de intermediario y complejo final fue superior al 90% y los tr de 18,7 y 17 min respectivamente. El complejo final de interés fue estable al menos 4 h post-marcado y mantuvo su PR incambiada al menos 2 h post-incubación en plasma humano y frente a un exceso de L-cys.

Lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas

La lipofilicidad fue estudiada a través del coeficiente de partición entre octanol/buffer fosfato 0.1M, pH=7.4. Para el complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{METNC})\text{NS}_3$ se obtuvo un valor de $\log P=0.083$ y para el complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{METNC})$ -acetilacetona fue de $\log P=0.065$. La unión a proteínas plasmáticas medida tras 1 h de incubación resultó para $^{99m}\text{Tc}(\text{METNC})\text{NS}_3$ de aproximadamente 30% y para $^{99m}\text{Tc}(\text{METNC})$ -acetilacetona, de 10%.

Discusión

El tecnecio, debido a su rica química de coordinación, ofrece una gran diversidad de enfoques químicos para la marcación de biomoléculas con ^{99m}Tc . Mediante una apropiada selección de la combinación de grupos donadores de electrones es posible lograr buena estabilidad del producto marcado y adecuadas propiedades tanto "in vitro" como "in vivo". Diversas publicaciones muestran claramente que el uso de distintos enfoques en la marcación afecta fundamentalmente la lipofilicidad de los productos obtenidos y concomitantemente su unión a proteínas plasmáticas, su depuración sanguínea y su excreción renal y hepatobiliar^(1,2).

Teniendo en cuenta dichos antecedentes, nuestro trabajo se propuso como objetivo la marcación con ^{99m}Tc de un ligando potencialmente bioactivo mediante 2 métodos distintos, formación de complejos 4 +1 de Tc (III) y complejos tricarbonílicos de Tc (I), como mecanismo para modular las propiedades del potencial radiofármaco obtenido.

Los métodos seleccionados han sido utilizados por distintos grupos de investigación en el mundo, con muy buenos resultados. Los dos complejos en estudio fueron obtenidos con adecuada pureza radioquímica, si bien en el caso del complejo 4+1 de Tc(III) fue necesaria una purificación con HPLC para lograrlo. Ambos resultaron sumamente estables tanto en el medio de reacción como cuando fueron enfrentados a sustancias con capacidad de competir por la coordinación del metal. En el caso de las proteínas plasmáticas, existen grupos funcionales de los aminoácidos con buena capacidad donadora de electrones, por lo que pueden desplazar al ligando de su unión con el metal si ésta no es suficientemente fuerte. Lo mismo ocurre con el aminoácido cisteína, cuyos grupos amino, ácido carboxílico y tiol pueden unirse al tecnecio.

Al comparar los resultados de los estudios fisicoquímicos observamos una clara influencia del método de marcación en la lipofilicidad y en la unión a proteínas plasmáticas, tal cual lo esperado. Los valores obtenidos para dichos parámetros nos llevan a anticipar que el complejo de ^{99m}Tc -tricarbonílico de tipo "2+1" presente propiedades más favorables para un posible radiofármaco para diagnóstico de hipoxia.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y por Pedeciba-Química. Se agradece al Dr. H-J Pietzsch y al Dr. H. Cerecetto.

Referencias

01. Decristoforo C, Santos I, Pietzsch HJ, Duatti A, Smith CJ, Rey A, et al. Comparison of in vitro and in vivo properties of ^{99m}Tc -cRGD peptides labelled using different novel Tc-cores. Q J Nucl Med Mol Imaging 2007;51:33-41.
02. Labelling of small biomolecules using novel Technetium-99m cores. IAEA Technical Report Series 458, IAEA, Vienna, 2007. (http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs459_web.pdf).
03. Spies H, Glaser M, Pietzsch H-J, Hahn FE, Lügger T. Synthesis and reactions of trigonal-bipyramidal rhenium and technetium complexes with tripodal, tetradentate NS3 ligand. Inorg Chim 1995;Acta 240:465-78.
04. Pietzsch H-J, Gupta A, Syhre R, Leibnitz P, Spies H. Mixed-ligand technetium(III) complexes with

tetradentate/monodentate NS3/isocyanide coordination: A new nonpolar technetium chelate system for the design of neutral and lipophilic complexes stable in vivo. *Bioconj Chem* 2001;12:538-44.

05. Alberto R, Schibli R, Waibel A, et al. Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coord Chem Rev* 1999;190:901-19.
06. Mundwiler S, Kundig M, Ortner K, et al. A new [2+1] mixed ligand concept based on $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$: a basic study. *Dalton Trans* 2004;7:1320-8.
07. Giglio J, Fernández S, Cerecetto H, Rey A. Synthesis and biological characterization of novel dithiocarbamate containing 5-nitroimidazole ^{99m}Tc -complexes as potential agents for targeting hypoxia. *Bioorg Med Chem Letters* 2011;21:394-7.