



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Facultad de Química, Universidad de la República.

PEDECIBA Química.

Estudio de reacciones bio-ortogonales con aplicación en el diagnóstico de cáncer

Tesis de Doctorado en Química

MSc. María Fernanda García

Marzo 2018

Tesis de Doctorado en Química

Programa de posgrado:

-Facultad de Química

-PEDECIBA Química

Tutores:

*Dr. Hugo Cerecetto, Área de
Radiofarmacia, Centro de
Investigaciones Nucleares,,
Facultad de Ciencias, UdelaR.*

*Dr. Pablo Cabral, Área de
Radiofarmacia, Centro de
Investigaciones Nucleares,,
Facultad de Ciencias, UdelaR.*

*Dr. Thomas Quinn, Department of
Biochemistry, University of
Missouri*

Centro de Investigaciones
Nucleares, Facultad de Ciencias,
UdelaR. Marzo de 2019.

Resumen

El cáncer es considerado un problema de salud pública a nivel global, constituyendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Nuestro país presenta elevadas tasas de incidencia en cáncer, siendo responsable de un 25% de las muertes que ocurren actualmente en nuestro país.

La complejidad de la problemática requiere del esfuerzo, aportes y acciones de distintos actores sociales.

En este sentido, la presente tesis doctoral abordará la problemática explorando nuevas herramientas químicas para el diagnóstico del cáncer. Más precisamente, se enfoca en la búsqueda de nuevas estrategias para el desarrollo de agentes de imagen molecular no invasivos con aplicación en Medicina Nuclear. Para ello, se incursiona en el campo de las reacciones bio-ortogonales, descritas recientemente por su capacidad de ser llevadas a cabo en entornos biológicos, lo cual las posiciona como una novedosa herramienta de bioconjugación.

Así, la presente tesis doctoral se dividirá en 3 capítulos. El primer capítulo se centra en un primer abordaje experimental basado en el estudio de la factibilidad de utilizar la reacción entre [1,2,4,5]tetrazinas y trans-cicloocteno como estrategia de marcación de biomoléculas y su potencial aplicación en imagen molecular. En este sentido, el trabajo se enfocó en el estudio de la reacción bio-ortogonal en la superficie de bacteriófagos presentadores de péptidos, mediante el uso de derivados [1,2,4,5]tetrazinas portadores de sonda fluorescente o marcados con el radionucleido ^{99m}Tc .

En el segundo capítulo se profundiza en el uso de la reacción bio-ortogonal utilizando un derivado [1,2,4,5]tetrazina marcado con ^{99m}Tc . Para ello, se aborda la marcación *in vivo* de un anticuerpo dirigido específicamente contra TAG-72 en un modelo de cáncer de colon.

En el tercer capítulo, se abordan las estrategias realizadas enfocadas en mejorar la estrategia de marcación inicialmente planteada. A través del desarrollo de derivados de [1,2,4,5]tetrazina adecuadamente sustituidos para su marcación con ^{99m}Tc , su evaluación biológica y posterior estudio de la reacción bio-ortogonal *in vivo*.

Agradecimientos

Este trabajo de Doctorado es el resultado de la contribución y apoyo de un gran número de colegas, profesores, familiares y amigos. La realización del mismo no hubiera sido posible sin el aporte de cada uno de ellos. Por tal motivo quisiera agradecer,

A Marcos Couto, mi compañero de la vida, por creer siempre en mi capacidad para llevar adelante esta tarea y por sus contribuciones al mismo. A mi familia y amigos por su contención incondicional.

A mis tutores, los profesores Hugo Cerecetto, Pablo Cabral y Thomas Quinn, por los conocimientos brindados y por apoyarme constantemente durante todo el proyecto, especialmente en los momentos difíciles, confiando plenamente en mi trabajo.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Nucleares, especialmente a Marcelo Fernández por su contribución en la realización de los estudios biológicos.

A la Prof. Mercedes González por permitirme trabajar en su laboratorio siempre que fue necesario.

A la Prof. Susan Deustcher por permitirme trabajar en su laboratorio, así como por los materiales cedidos para esta investigación. Dr. Fabio Gallazi, Jessica Newton-Northup, Xiuli Zhang, Manan Sahah por toda sus contribuciones y ayuda brindada durante mis estancias en la Universidad de Missouri.

A Nancy y Joe Polacco, por hacerme sentir en casa durante mis pasantías en Columbia.

A María Moreno por sus enseñanzas sobre cultivo celular. A Carlos Bathianny y Gonzalo Rodríguez por la realización de la espectrometría de masas. A Otto Pristch y Federico Carrión por su colaboración con el experimento de SPR.

Al Prof. Roger Chammas por recibirme en su laboratorio en la Universidad de San Pablo y por las discusiones enriquecedoras de los resultados obtenidos. También agradecer a mis compañeros del Instituto de Cáncer especialmente a Mara de Souza Junqueira y Janio Mororó, así como los investigadores y estudiantes del Centro de Medicina Nuclear dónde trabajé muy a gusto y recibí ayuda de todos.

A las instituciones financiadoras, ANII (POS_NAC_2013_1_11355) y programa CAP-UdelaR por las becas de posgrado, programa CSIC-ini por financiar parte del proyecto, PEDECIBA y CSIC por sus contribuciones.

1 Tabla de Contenido

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Tabla de Contenido..... | i |
| 1.1 | Abreviaturas generales..... | vi |
| 2 | Introducción..... | 1 |
| 2.1 | Cáncer | 1 |
| 2.2 | Imagen molecular y cáncer | 2 |
| 2.3 | Medicina nuclear y radiofármacos..... | 3 |
| 2.3.1 | Radiofármacos de Diagnóstico..... | 3 |
| 2.3.2 | Agentes de imagen específicamente dirigidos | 5 |
| 2.4 | Anticuerpos monoclonales..... | 7 |
| 2.4.1 | Radioinmunoconjugados | 9 |
| 2.4.2 | Estrategias de marcación clásica | 9 |
| 2.4.3 | Estrategias de marcación pre-dirigidas..... | 13 |
| 2.5 | Bioconjugación | 16 |
| 2.6 | Química en sistemas biológicos..... | 17 |
| 2.7 | Reacciones bio-ortogonales | 19 |
| 2.7.1 | Condensación de carbonilos con nitrógenos con efecto alfa..... | 19 |
| 2.7.2 | Reacción de Staudinger entre azidas y triarilfosfinas..... | 20 |
| 2.7.3 | Cicloadición entre azidas y alquinos | 22 |
| 2.7.4 | “Click chemistry” libre de cobre: cicloadición entre azidas y alquinos promovida por ciclos tensionados | 24 |
| 2.7.5 | Reacciones de Diels-Alder entre tetrazinas y olefinas | 27 |
| 2.8 | Reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazina y TCO en el diseño de agentes de imagen y terapia..... | 32 |
| 2.8.1 | Desarrollo de agentes de imagen..... | 32 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.8.2 | Desarrollo de agentes de terapia..... | 37 |
| 3 | Objetivo General..... | 40 |
| 4 | Capítulo I..... | 41 |
| 4.1 | Objetivos específicos | 41 |
| 4.2 | Antecedentes y Fundamentos | 42 |
| 4.3 | Resultados..... | 1 |
| 4.3.1 | Propagación, purificación y cuantificación del fago G3-C12 | 1 |
| 4.3.2 | Conjugación de bacteriófagos con NHS-TCO (UV-tracer TM) | 1 |
| 4.3.3 | Estudio de la reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> | 2 |
| 4.3.4 | Estudio de la reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> en cultivo celular..... | 5 |
| 4.3.5 | Síntesis de derivado tetrazina portador de agente quelante para marcación con ^{99m} Tc | 8 |
| 4.3.6 | Marcación con ^{99m} Tc | 14 |
| 4.3.7 | Reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> utilizando 1d- ^{99m} Tc..... | 15 |
| 4.3.8 | Reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> en cultivo celular utilizando utilizando 1d- ^{99m} Tc | 16 |
| 4.4 | Discusión y conclusiones..... | 18 |
| 4.5 | Materiales y metodologías | 22 |
| 4.5.1 | Producción de stocks de los clones G3-C12 y f88-fd..... | 22 |
| 4.5.2 | Conjugación bacteriófago-TCO | 25 |
| 4.5.3 | Reacción bio-ortogonal en la superficie del bacteriófago | 26 |
| 4.5.4 | Reacción bio-ortogonal “in vitro” sobre bacteriófago inmovilizado..... | 26 |
| 4.5.5 | Reacción bio-ortogonal “in vitro” sobre bacteriófago pre-dirigido..... | 27 |
| 4.5.6 | Ensayo de Western Blot | 27 |
| 4.5.7 | Microscopía confocal | 28 |
| 4.5.8 | Síntesis orgánica..... | 29 |
| 4.5.9 | Marcación con ^{99m} Tc | 30 |
| 4.5.10 | Ensayo de Dot Blot..... | 31 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.5.11 | Reacción bioortogonal en cultivo celular con 1d- ^{99m} Tc | 31 |
| 5 | Capítulo II..... | 33 |
| 5.1 | Objetivos específicos | 33 |
| 5.2 | Antecedentes y Fundamentos | 34 |
| 5.3 | Resultados..... | 35 |
| 5.3.1 | Química y Radioquímica..... | 35 |
| 5.3.2 | Evaluación biológica <i>in vitro</i> | 36 |
| 5.3.3 | Evaluación biológica <i>in vivo</i> | 38 |
| 5.4 | Discusión y conclusiones..... | 44 |
| 5.5 | Materiales y Métodos..... | 48 |
| 5.5.1 | Estabilidad de 1 | 48 |
| 5.5.2 | Marcación con ^{99m} Tc | 48 |
| 5.5.3 | Estabilidad de tetrazina radiomarcada..... | 48 |
| 5.5.4 | Coefficiente de reparto <i>n</i> -octanol/fase acuosa | 49 |
| 5.5.5 | Ensayo de unión a proteínas | 49 |
| 5.5.6 | Producción de CC49..... | 49 |
| 5.5.7 | Conjugación CC49 con NHS-TCO | 50 |
| 5.5.8 | Número de TCO reactivos por molécula de anticuerpo | 50 |
| 5.5.9 | Ensayo de bioactividad de CC49-TCO | 50 |
| 5.5.10 | Estudio de la reacción bio-ortogonal <i>in vitro</i> | 51 |
| 5.5.11 | Estudio de la reacción bio-ortogonal en cultivo celular | 51 |
| 5.5.12 | Estudios biológicos <i>in vivo</i> | 52 |
| 6 | Capítulo III | 54 |
| 6.1 | Objetivos específicos | 54 |
| 6.2 | Antecedentes y fundamentos | 55 |
| 6.3 | Resultados..... | 57 |
| 6.3.1 | Síntesis orgánica..... | 57 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6.3.2 | Marcación con ^{99m}Tc y estabilidad | 69 |
| 6.3.3 | Coeficiente de partición, unión a proteínas séricas y caracterización biológica | 70 |
| 6.3.4 | Cinética de la reacción entre el sistema TCO y ^{99m}Tc -3d | 72 |
| 6.3.5 | Número de TCO reactivos por anticuerpo e IEDDA <i>in vitro</i> | 73 |
| 6.3.6 | Actividad <i>in vitro</i> de bevacizumab-TCO..... | 74 |
| 6.3.7 | Evaluación biológica | 75 |
| | | 81 |
| 6.4 | Discusión y conclusiones..... | 82 |
| 6.5 | Materiales y Métodos..... | 87 |
| 6.5.1 | Síntesis orgánica..... | 87 |
| 6.5.2 | Marcación con ^{99m}Tc | 92 |
| 6.5.3 | Estabilidad de los derivados radiomarcados..... | 93 |
| 6.5.4 | Coeficiente de reparto n-octanol/fase acuosa | 93 |
| 6.5.5 | Ensayo de unión a proteínas | 93 |
| 6.5.6 | Cinética de la reacción bio-ortogonal | 93 |
| 6.5.7 | Conjugación de bevacizumab con NHS-TCO..... | 94 |
| 6.5.8 | Número de TCO reactivos | 94 |
| 6.5.9 | Actividad <i>in vitro</i> de bevacizumab-TCO..... | 94 |
| 6.5.10 | Evaluación biológica | 95 |
| 7 | Conclusiones y Perspectivas..... | 98 |
| 8 | Bibliografía..... | 99 |

1.1 Abreviaturas generales

AcMo: Anticuerpo monoclonal

AQB: Agente quelante bifuncional

CT: tomografía computada (del inglés, *computed tomography*)

CC : cromatografía en columna

CCF: cromatografía en capa fina

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal growth facot receptor*)

EM: Espectrometría de masas.

ESI: ionización por electrospray (del inglés, *electrospray ionization*)

Eq: equivalentes

HMBC: Correlación de enlace múltiple heteronuclear (del inglés, *heteronuclear multiple bond correlation*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance (del inglés, *high performance liquid chromathography*)

HRP: peroxidasa del rábano (del inglés, *horseradish peroxidase*)

HSQC: Correlación de enlace simple heteronuclear (del inglés, *heteronuclear single quantum correlation*)

IE: impacto electrónico.

Ig: Inmunoglobulina

ITLC-SG: Cromatografía en capa fina instantánea en sílica gel

MWCO: límite de peso molecular (del inglés, *molecular weight cut off*)

PET: tomografía de emisión de positrones (del inglés, *positron emisión tomography - computed tomography*)

PRIT: radioinmunoterapia pre-dirigida (del inglés, “*pretargeted radioimmunotherapy*)

RMN: resonancia magnética nuclear

SDS-PAGE:

SPECT-CT: tomografía computada de emisión de fotón único (del inglés, *single photon emission-computed tomography*).

TAG-72: glicoproteína 72 asociada a tumor (del inglés, *tumor associated glycoprotein 72*).

UV: ultravioleta

Abreviaturas Químicas

AcOEt: acetato de etilo

ACN: acetonitrilo

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

(Boc)₂O: di-*tert*-butildicarbonato

COSY: espectroscopía de correlación (del inglés, *correlation spectroscopy*)

cpVIII; proteína de la cápside VIII, (del inglés, *coat protein VIII*)

CuAAC: cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre (del inglés, *catalyzed azide-alkyne cycloaddition*)

Cy3: indocarbocianina

Cy5: indodicarbocianina
DCC: dicitclohexilcarbodiimida
DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina
DMF: dimetilformamida
DMSO: dimetilsulfóxido
DOTA: ácido 1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-ciclododecanotetraacético
DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético
EDDA: ácido etilendiamino-diacético
Et₃N: trietilamina
FDG: la 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa
FITC: fluoresceína-5-isotiocianato
HYNIC: ácido 6-hidrazinonicotínico
IEDDA: reacción de Diels Alder inversa (del inglés, *inverse electron demand Diels-Alder*)
MAG3: mercaptoacetiltriglicina
MeOH: metanol
NHS: *N*-hidroxisuccinimida
NOTA: ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
PBS: amortiguador de fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)
PF: punto de fusión
S_EAr: Sustitución electrofílica aromática
S_N: Sustitución nucleofílica
S_NAr: Sustitución nucleofílica aromática
SPAAC: cicloadición promovida por ciclos tensionados (del inglés “*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*”)
PVDF: membrana de polivinildifluoruro
RGD: arginina-glicina-ácido aspártico
T amb: Temperatura ambiente
t-BuOH: ter-butanol
TCO: *trans*-cicloocteno
TETA: 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetato
TFA: ácido trifluoroacético
THF: tetrahidrofurano
TMS: tetrametilsilano
TZ: [1,2,4,5]tetrazina
[¹⁸F]-SFB: 4-[¹⁸F]fluorobenzoato
[¹⁸F]-FBA: [¹⁸F]fluorobenzaldehído

2 Introducción

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas, constituyendo la segunda causa de muerte en el mundo.^{1,2} Es considerada un conjunto de enfermedades genéticas que se caracterizan por una proliferación alterada de células anormales, denominadas células cancerosas.³

Puede surgir a partir de cualquier tipo celular o tejido del organismo. A través de un proceso de acumulación de mutaciones, las células adquieren un conjunto de propiedades como la autosuficiencia en las señales de crecimiento y resistencia a las señales apoptóticas y antiproliferativas, dando lugar a la proliferación crónica.⁴ Los cambios morfológicos y la proliferación celular descontrolada, dan por resultado la formación de tumores. Con la progresión de la enfermedad, los tumores adquieren la capacidad de invadir el tejido normal y diseminarse a otras regiones del cuerpo a través de la sangre o la linfa, formando tumores secundarios o metástasis.³

El cáncer es una enfermedad heterogénea. Durante la tumorigénesis, la sucesiva acumulación de alteraciones genéticas, dan por resultado una heterogeneidad dentro del propio tumor y entre metástasis. Así, dentro del mismo tumor distintos grupos de células presentan características moleculares y fenotípicas diferentes.³

A pesar de lo compleja que es la enfermedad, los avances en genómica y proteómica de los últimos años han permitido mayor conocimiento de las características génicas y moleculares de los distintos tipos de cáncer.⁵ Lo que ha impulsado el surgimiento de nuevas herramientas diagnósticas, identificación de biomarcadores y blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos específicamente.⁶

En Estados Unidos en los últimos 30 años, la tasa de supervivencia a 5 años para todos los cánceres combinados ha aumentado un 20 %. Esta tendencia se traduce en una disminución de la mortalidad por cáncer en los últimos 20 años. Este progreso, puede explicarse en parte debido al impacto que han tenido los avances en la detección temprana, mejoras en los tratamientos y control de factores de riesgo, especialmente en los principales tipos de cáncer (pulmón, mama, próstata, y colorrectal).¹ Por ejemplo, el

pronóstico de vida de un paciente con diagnóstico de cáncer está muy relacionado con el grado de avance del cáncer al momento del diagnóstico. A mayor magnitud del tumor original y a mayor extensión en el cuerpo, más comprometido es el pronóstico. Así, la detección del cáncer en etapa inicial está asociada a una tasa de supervivencia a 5 años del 90 %.⁵

Sin embargo, a pesar de los avances, el cáncer es considerado un problema de salud pública a nivel mundial. En el 2012 se registraron 14.1 millones de nuevos casos y se estiman 20 millones de nuevos casos anuales para el 2025.⁷ Este escenario requiere de investigación clínica y básica continua enfocada en mejorar las prácticas de prevención, diagnóstico y tratamientos de los distintos tipos de cáncer.

2.2 Imagen molecular y cáncer

La imagen molecular implica estudiar los procesos biológicos en su entorno nativo a través de una detección externa. Distintas técnicas de imagen permiten la visualización y caracterización de los procesos fisiológicos y patológicos a nivel molecular, en células, tejidos y seres vivos, de forma no invasiva y en tiempo real.⁸⁻¹⁰ Si bien existen una gran variedad de técnicas de imagen a nivel celular o de tejidos, por ejemplo la microscopía óptica, las modalidades que pueden ser utilizadas en seres vivos se reducen a unas pocas. Entre ellas se destacan la tomografía computarizada por rayos X (CT), la resonancia magnética nuclear (RMN), modalidades de imagen que utilizan moléculas marcadas radioactivamente como la tomografía de emisión de positrones y de fotón único (PET y SPECT, respectivamente), imágenes ópticas y ultrasonido.

Generalmente, las técnicas de imagen molecular de alcance clínico involucran instrumentos de imágenes especializados, siendo en algunos casos, combinados con el uso de agentes de imagen. Además, los avances tecnológicos han permitido la fusión de técnicas que aportan información complementaria. Por ejemplo, técnicas como el CT y RMN aportan información morfológica y estructural, mientras que técnicas como el SPECT y PET aportan información funcional. Así, la fusión de técnicas como el SPECT-CT o PET-CT contribuye a la generación de imágenes con información complementaria.⁹

Las técnicas de imagen médicas cumplen un rol central en la clínica oncológica. Aportan información sobre tamaño y localización del tumor, afectación de nodos linfáticos y

presencia de metástasis distales.¹⁰⁻¹⁴ Los aportes de la imagenología no se limitan únicamente al diagnóstico de cáncer, sino que también tiene un rol relevante en el seguimiento de la enfermedad en respuesta al tratamiento.¹⁵

Sin embargo, la heterogeneidad de la enfermedad, los avances en la biología molecular del cáncer, el advenimiento de la medicina personalizada, requieren de agentes y técnicas de imágenes cada vez más sensibles y específicas, que permitan la detección temprana y proporcionen mayor información de los procesos que ocurren a nivel celular.

Debido a que el campo de la imagen molecular es multidisciplinar, su progreso depende de los avances en bioingeniería, nanotecnología, química de la bioconjugación y radiomarcación, bioinformática, genómica, metabolómica y proteómica, entre otras.¹⁴ En este sentido, se espera que las contribuciones de la imagen molecular, al diagnóstico clínico de cáncer, contribuyan a la localización de un proceso tumoral inicial o con diseminación en etapas iniciales, hasta la obtención de una imagen asociada a un valor pronóstico específico por la expresión aumentada de un marcador tumoral.

2.3 Medicina nuclear y radiofármacos

La imagen molecular en seres vivos tiene sus raíces en la medicina nuclear. Desde sus inicios ha contribuido al diagnóstico y seguimiento de pacientes de forma no invasiva.¹⁶ Las técnicas de imagen de medicina nuclear se basan en la utilización de agentes de imagen que contienen átomos radioactivos. Por definición, una sustancia química que posee uno a más radionucleidos, y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad es adecuado para ser administrado en seres humanos, se denomina radiofármaco. Los radiofármacos pueden producirse con fines de diagnóstico o terapia.^{17,18}

2.3.1 Radiofármacos de Diagnóstico

Los radiofármacos de diagnóstico o agentes de imagen, luego de su administración al paciente y distribución en el organismo, son detectados externamente mediante instrumentos de imágenes o cámaras. Su objetivo principal es obtener la visualización morfológica y funcional del tejido u órgano en estudio, de forma no invasiva. Se administran en cantidades de trazas, de forma de no generar efecto farmacológico o un efecto farmacológico mínimo y requieren de una pureza radioquímica (PRQ) superior al 90%. Según el tipo de radiación emitida por el radionucleido, se distinguen dos

modalidades de imagen. Los emisores gamma son utilizados en centellografía y SPECT, mientras que los emisores de positrones son utilizados en PET.¹⁴

Los radiofármacos de diagnóstico dan cuenta de la mayoría de los radiofármacos actualmente utilizados en clínica, entre los cuales se estima que un 80 % de los mismos son complejos de Tecnecio-99m (^{99m}Tc) o biomoléculas marcadas con ^{99m}Tc.^{19,20}

2.3.1.1 Radiofármacos de Tecnecio-99m

El ^{99m}Tc es un radioisótopo (artificial), emisor gamma con un período de semidesintegración ($T_{1/2}$) de 6.01 h. Decae por transición isomérica al isótopo relativamente estable ⁹⁹Tc ($T_{1/2} = 2.5 \times 10^5$ años), por emisión de un fotón gamma de 140.5 KeV. Con número atómico 43, es un metal de transición (Grupo VII) capaz de presentar estados de oxidación que van desde -1 a +7.

Es obtenido a partir de un generador de Molibdeno-99 (⁹⁹Mo, $T_{1/2} = 66$ h), por decaimiento β^- del ⁹⁹Mo al ^{99m}Tc (Figura 1), lo que permite su disponibilidad en los servicios de medicina nuclear en forma de generador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc. Obtenido del generador como ión pertecneiato (TcO_4^-), su incorporación a las moléculas de interés ocurre mediante la formación de compuestos de coordinación con ligandos donores de electrones. Debido a la baja reactividad del ión pertecneiato (+7), la formación de compuestos de coordinación implica su reducción a estados de oxidación menores, siendo el agente reductor mayormente utilizado el cloruro estannoso dihidratado ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$).²⁰

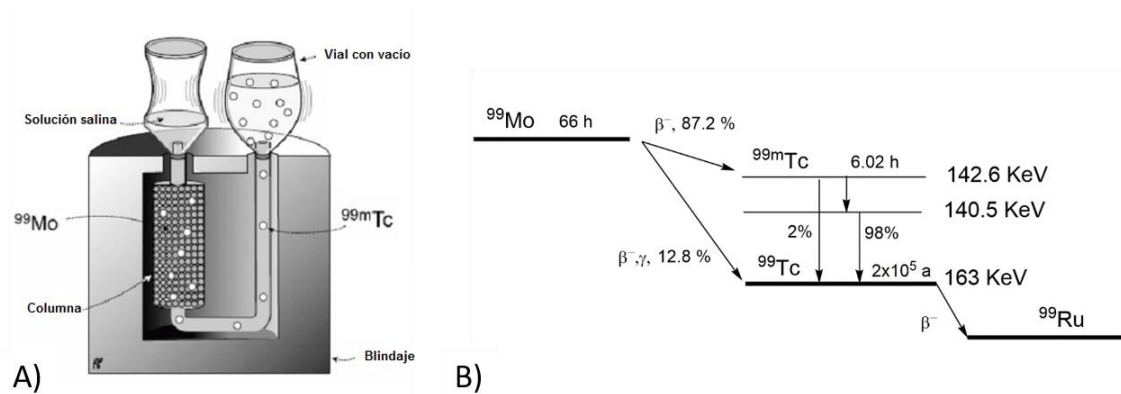


Figura 1. A) Esquema de generador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc B) Esquema de decaimiento radioactivo de ^{99m}Tc.

Los radiofármacos de tecnecio, pueden clasificarse según el grado de complejidad, en productos de primera, segunda y tercera generación. La primera generación de radiofármacos de tecnecio, consistió en complejos de tecnecio sencillos, y los mecanismos de su acumulación se basaron principalmente en propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción de dichos complejos. Por ejemplo, el uso de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para imagen tiroidea, ^{99m}Tc -coloidal para hígado, ^{99m}Tc -fosfonato para centellografía ósea y ^{99m}Tc -DTPA para centellografía renal.^{20,21}

Posteriormente surgió una segunda generación de radiofármacos, cuyo diseño se basó en el conocimiento de la química del tecnecio y la relación de la estructura del complejo con su comportamiento biológico. El desarrollo de nuevos ligandos y complejos de tecnecio dio lugar a una generación de radiofármacos cuya biodistribución y captación en el blanco dependen exclusivamente de su lipofilidad, tamaño y carga. Por ejemplo, los agentes de perfusión cardíaca ^{99m}Tc -MIBI (Cardiolite®) y perfusión cerebral ^{99m}Tc -HMPAO (Ceretec®) y ^{99m}Tc -ECD (Neurolite®) (Figura 2).^{20,21}

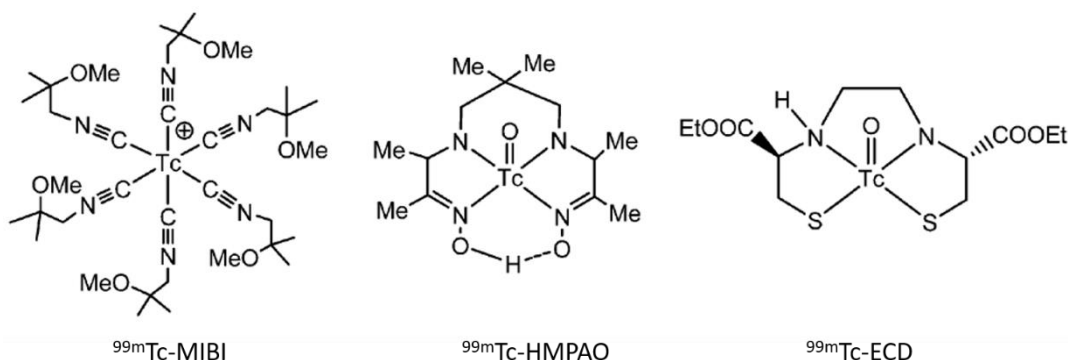


Figura 2. Radiofármacos de ^{99m}Tc segunda generación.

Finalmente, la tercera generación de radiofármacos se ha basado en la elección de biomoléculas, que ofician de moléculas portadoras del radionucleido a dianas biológicas específicas como receptores y transportadores. Su distribución biológica está determinada, en parte, por la afinidad de la unión por la molécula diana.²²

2.3.2 Agentes de imagen específicamente dirigidos

La sobreexpresión de antígenos, proteínas y receptores en distintos tipos de cáncer, en comparación con su densidad relativamente baja en condiciones fisiológicas, constituye

el fundamento de los agentes de imagen dirigidos específicamente a dichos blancos moleculares.^{23,24}

Un radiofármaco específicamente dirigido está constituido por una molécula vector a la cual se le incorpora el radionucleido. Las estrategias de marcación se basan principalmente en las propiedades químicas del radionucleido, e incluyen el marcado directo, el uso de agentes quelantes bifuncionales (AQB, ver definición más adelante) en el caso de radiometales, o grupos prostéticos.²⁵⁻²⁸

La molécula vector aporta la estructura principal del agente de diagnóstico y determina el destino del mismo a través de las interacciones con el blanco molecular y su distribución metabólica. Algunos ejemplos de moléculas vector incluyen moléculas orgánicas de baja masa molecular, oligonucleótidos, péptidos y anticuerpos monoclonales.²⁹ El AQB, es una molécula relativamente pequeña que se une covalentemente a la molécula vector y al mismo tiempo es capaz de quelar al radiometal.^{27,28}

Un agente de imagen dirigido específicamente a un blanco molecular debe presentar gran afinidad y especificidad por su diana biológica y accesibilidad eficiente al objetivo. Es deseable que presente mínima captación inespecífica en los tejidos normales, lo que contribuye en gran medida a lograr una mejor relación tumor/tejido no blanco y por ende una mejor imagen. Diseñar un agente de imagen con todas estas características es un gran desafío.

Uno de los agentes de imágenes oncológicas más relevantes para su uso en PET es la 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa o [¹⁸F]FDG, un análogo de la glucosa (Figura 3). Transportadores de glucosa específicos, reconocen la [¹⁸F]FDG y la transportan al interior celular, donde es fosforilada por la hexoquinasa para formar [¹⁸F]FDG-6-fosfato. Debido a la ausencia del grupo hidroxilo en posición 2 la [¹⁸F]FDG-6-fosfato no continúa la vía glucolítica y permanece atrapada en el interior celular. Si bien todas las células metabolizan glucosa, las células de cáncer presentan un metabolismo aumentado, lo que permite, por su acumulación preferencial, la detección de distintos tipos de tumores y metástasis.^{12,30}

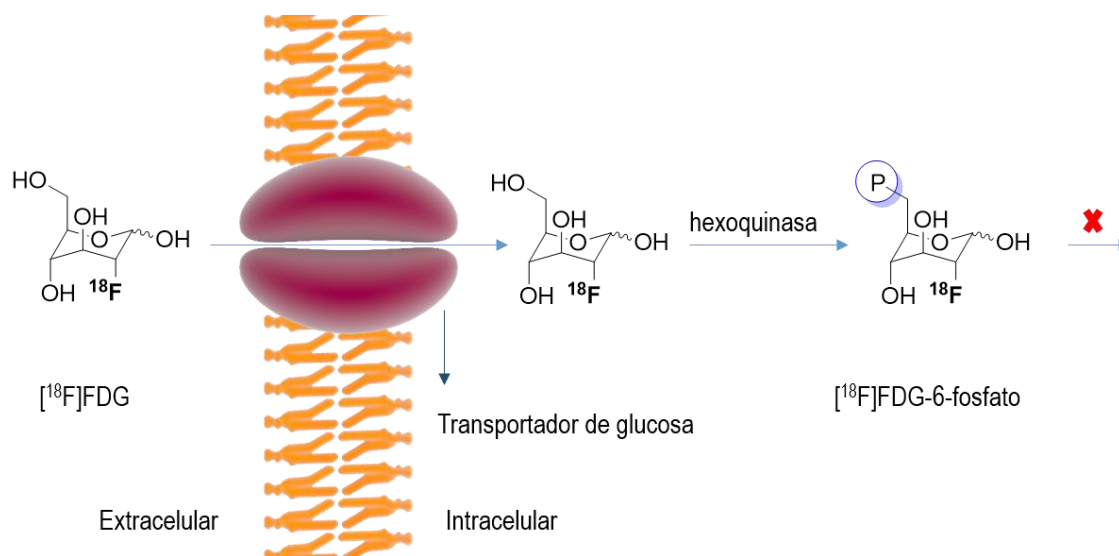


Figura 3. Estructura y metabolismo de la 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa.

Otra variedad de agentes de imagen se basan en estructuras peptídicas. Por ejemplo, varios tumores presentan expresión aumentada de receptores cuyos ligandos son hormonas peptídicas. Modificaciones sobre las estructuras originales de los péptidos dan lugar a una serie de análogos peptídicos radiomarcados, con gran especificidad y afinidad por blancos con relevancia oncológica.³¹ Entre los ejemplos más destacados, se encuentran los análogos de somatostatina, que se utilizan en la clínica para el diagnóstico y terapia de tumores que sobreexpresan receptores de somatostatina. Otras familias de péptidos que también han sido exploradas para su marcación son, por ejemplo, los péptidos de bombesina, arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y hormona melanocito estimulante.³²⁻³⁴

Una familia de moléculas ampliamente estudiada como moléculas vectores son los anticuerpos monoclonales. Su gran afinidad (en el orden de nM) y especificidad frente a antígenos asociados a tumores los convierte en herramientas atractivas para visualizar, caracterizar y tratar el tejido maligno.³⁵

2.4 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), son glucoproteínas producidas por los linfocitos B del sistema inmune, que tienen la capacidad de reconocer de forma específica

otras moléculas, denominadas antígenos. Se distinguen cinco clases de Ig: IgG, IgM, IgD, IgE, e IgA. En humanos, los anticuerpos o inmunoglobulinas tipo IgG están conformados por 4 cadenas polipeptídicas, que consisten en 2 cadenas pesadas de 470 aminoácidos (*H*, del inglés heavy) y 2 cadenas livianas de 215 aminoácidos (*L*, del inglés light) que se subdividen en kappa (κ) y gamma (λ). El ensamble de dichas cadenas es una estructura que recuerda una letra Y (Figura 4), que resulta en una estructura de 150 kDa aproximadamente. Cada cadena *L* está unida a una cadena *H* mediante un enlace disulfuro. Al mismo tiempo, las cadenas *H*, se encuentran apareadas en sus extremos carboxilo terminal y conectadas mediante enlaces disulfuro en la región “bisagra” a nivel de la parte media de esas cadenas. Desde un punto de vista funcional, cada cadena puede dividirse, en región variable (*V*) y región constante (*C*), siendo las regiones variables de las cadenas *L* y *H*, las regiones vinculadas al reconocimiento del antígeno. En la zona apical de las regiones V_L y V_H , confluyen tres regiones de mayor variabilidad, conocidas como dominios hipervariables o CDR (del inglés, complementary domain región, que constituyen zonas de interacción con el antígeno.³⁶

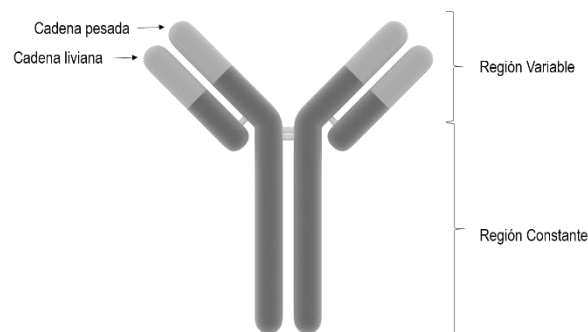


Figura 4. Estructura básica de una inmunoglobulina.

La capacidad de unirse con elevada especificidad y afinidad a una molécula diana, sumado a la descripción de la técnica de producción de anticuerpos a partir de la formación de hibridoma han permitido el uso de los anticuerpos como herramientas biológicas. La técnica de hibridoma, es un sistema de producción basado en inmortalizar linfocitos B murinos, productores de anticuerpos con determinada afinidad y especificidad por un blanco molecular, mediante la fusión con células tumorales. Lo que permitió la producción de un isotipo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno

específico, dando lugar a los AcMo.³⁷ Las líneas celulares de hibridoma dieron lugar a una variedad de AcMo terapéuticos.^{38,39} Sin embargo, los problemas de inmunogenicidad observados en pacientes y los concomitantes avances en ingeniería genética, llevaron al desarrollo de anticuerpos quiméricos, humanizados y totalmente humanizados. Los anticuerpos quiméricos, son construcciones donde la porción variable de un anticuerpo murino es combinada con la región constante de una inmunoglobulina humana. Por otro lado, en un anticuerpo humanizado sólo la porción CDR es de origen murino.³⁶ Por ejemplo, rituximab (Mabthera®), el primer anticuerpo monoclonal aprobado para terapia de linfoma y leucemia linfocítica crónica, es un anticuerpo quimérico dirigido contra el CD20. Otro anticuerpo quimérico de uso en clínica es el trastuzumab (Herceptin®), indicado para el tratamiento de cáncer de mama con sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her2). Mientras que bevacizumab (Avastin®), un anti VEGF es un ejemplo de AcMo humanizado.³⁹

2.4.1 Radioinmunoconjugados

El uso de radioinmunoconjugados como agentes de imagen y terapia, también ha sido explorado desde hace varios años. Distintos radionucleidos y estrategias de marcación, han sido estudiadas en la búsqueda de agentes de imagen adecuados para el diagnóstico y terapia del cáncer.⁴⁰

2.4.2 Estrategias de marcación clásica

Las estrategias de marcación de anticuerpos monoclonales se basan en la cuidadosa incorporación del radionucleido al AcMo, de forma de conservar la afinidad y especificidad de la molécula vector por su blanco molecular. Se pueden clasificar en marcación directa y marcación indirecta (Figura 5). A su vez, la marcación indirecta puede llevarse a cabo a través de grupo prostético o, en el caso de radiometales, a través de un agente quelante incorporado a la biomolécula.⁴¹

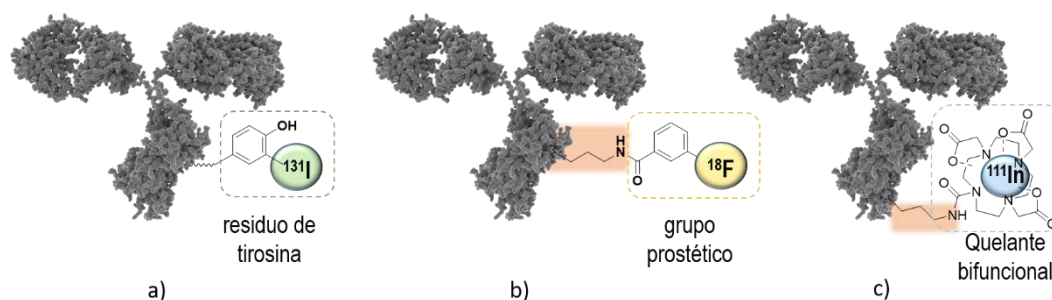


Figura 5. Estrategias de marcación clásicas de anticuerpos monoclonales. En a) un ejemplo de marcación directa. En b) y c) ejemplos de marcación indirecta.

2.4.2.1 Marcación directa

Un ejemplo de marcación directa es la utilizada para la incorporación de halógenos radioactivos, como los distintos isótopos de yodo y flúor, que consiste en la sustitución electrofílica aromática (S_{EAr}) en residuos de tirosina e histidina de la proteína.^{25,42}

En el caso del iodo, la utilización de agentes oxidantes como la cloramina T® y Iodogen®, permite la oxidación del radioiodo *in situ* y posterior S_{EAr} . Así, es posible la incorporación de los distintos isótopos de yodo (^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I) en condiciones de reacción suave.⁴² Si bien esta estrategia se ha utilizado para la marcación de dos anticuerpos anti CD20, tositumab y rituximab, de uso en clínica,^{43,44} es sólo adecuada para proteínas que presenten expuestos residuos de tirosina o histidina. Además, el fenómeno de dehalogenación que ocurre *in vivo* producto de enzimas dehalogenasas, provoca acumulación de iodo radioactivo a nivel de tiroides y estómago, características poco deseables, especialmente en terapia.⁴¹

De forma similar el flúor puede ser incorporado mediante marcación directa, tanto por, S_{EAr} o sustitución nucleofílica. Sin embargo, las proteínas suelen marcarse con ^{18}F a través de la utilización de grupos prostéticos, debido a que las condiciones de reacción son muy exotérmicas o requieren altas temperaturas.⁴⁵

En el caso de radiometales, una estrategia de marcación directa que se ha utilizado para la marcación de AcMo con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, es a través de la quelación del metal vía los grupos tiol provenientes de las cisteínas. Esta metodología requiere de un paso de reducción de los enlaces disulfuro presentes en la proteína, de forma de aumentar los grupos tiol disponibles. Si bien se han descrito marcaciones de distintos anticuerpos con esta

estrategia, la estructura de la biomolécula puede verse afectada lo que puede llevar a una pérdida de afinidad.⁴⁵

Si bien son varios los ejemplos de marcación directa de proteínas, en el caso de los anticuerpos, suelen utilizarse métodos de marcación indirecta de forma de preservar la integridad de la biomolécula.

2.4.2.2 Marcación indirecta: grupos prostéticos

Consiste en una estrategia que implica la marcación de precursores que poseen grupos prostéticos, permitiendo la conjugación a la biomolécula luego del proceso de marcación por alquilación, amidación, acilación, imidación, formación de oxima o hidrazonas y glicosilación. Así, por ejemplo, las marcaciones con ^{18}F ocurren mediante reacciones de sustitución nucleofílica, con $^{18}\text{F}^-$ promovido generalmente por la presencia de un aminopoliéter (Kryptofix 2.2.2). En la Figura 6, se muestran dos ejemplos de grupos prostéticos utilizados para la marcación de anticuerpos monoclonales el *N*-succinimidil-4- ^{18}F fluorobenzoato y ^{18}F fluorobenzaldehído.^{41,46,47}

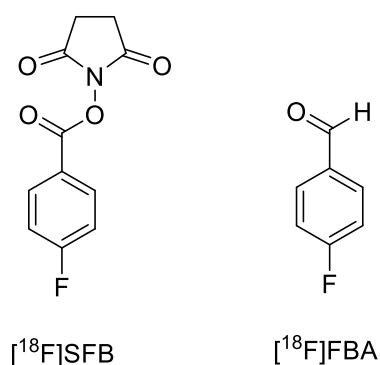


Figura 6. Grupos prostéticos utilizados para la marcación de proteínas con ^{18}F .

La marcación de anticuerpos monoclonales, a través de la marcación de grupos prostéticos, permite la marcación de moléculas que son sensibles a condiciones de reacción extremas. Además, la misma estrategia puede ser utilizada para la marcación de una variedad de biomoléculas. Sin embargo, presenta como desventaja los rendimientos de reacción bajo, resultado de los múltiples pasos de síntesis.⁴¹

2.4.2.3 Marcación indirecta: agentes quelantes bifuncionales

El uso de AQB es ampliamente utilizado para la marcación de anticuerpos con distintos radiometales, por ejemplo, ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{177}Lu , etc. Químicamente, un AQB es

un reactivo que presenta, por un lado, un grupo funcional capaz de formar un complejo de coordinación con el metal de interés y, por otro, un grupo funcional que permita la unión al anticuerpo. Generalmente, el AQB es conjugado inicialmente a la biomolécula para su posterior radiomarcación.^{27,28} En este sentido, el grupo quelante debe formar un complejo que sea estable *in vitro* y en condiciones fisiológicas, y que permita utilizar condiciones de marcación que no alteren las propiedades del anticuerpo. Los quelantes bifuncionales pueden clasificarse en cíclicos y acíclicos.⁴⁸

Entre los acíclicos, cabe destacar el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), mercaptoacetiltriglicina (MAG3) y ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC), utilizados principalmente para la marcación de ^{99m}Tc. Mientras que entre los cíclicos, en general macrociclos, se destacan el 1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-ciclododecanotetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) y 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetato (TETA).^{27,28,49} En la Figura 7 se muestran las estructuras y los radionucleidos que se utilizan generalmente con cada uno de ellos.

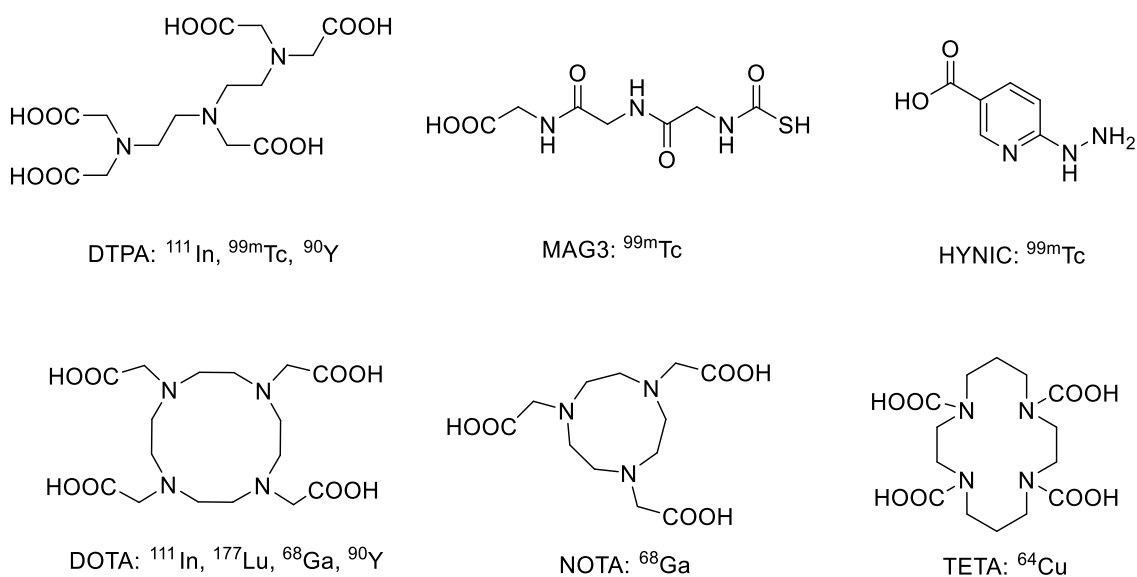
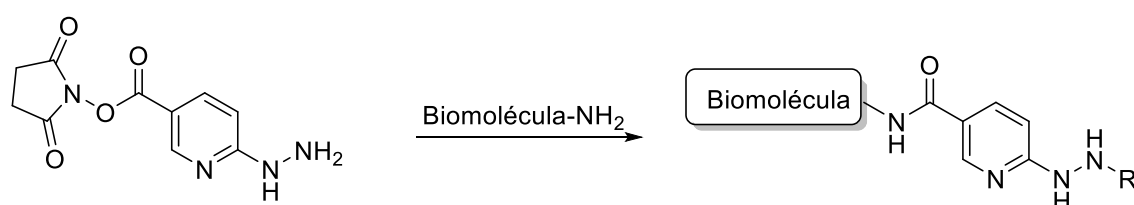


Figura 7. Agentes quelantes cíclicos y acíclicos utilizados frecuentemente para la marcación de biomoléculas.

En el caso de ^{99m}Tc, uno de los AQB más ampliamente utilizado es el ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC). Desde que fue descrito para la marcación de proteínas en

1990, ha sido utilizado para la marcación de una gran variedad de biomoléculas, probablemente debido a las elevadas purzas radioquímicas obtenidas en cortos tiempos y condiciones de reacción moderadas.⁵⁰⁻⁵⁴ Es conjugado a través de la formación de enlaces amida (Esquema 1), y debido a que puede coordinar al metal a través de dos sitios máximo (*N* del anillo de piridina y/o *N* del grupo hidrazino), es necesario la presencia de coligandos para la completa coordinación del tecnecio.^{28,55} Si bien la estructura del complejo aún no ha sido elucidada, estudios recientes sugieren que el estado de oxidación del tecnecio es +5, y que tanto la piridina como el grupo hidrazino participan coordinando.^{49,56} Además, debido a que el grupo hidrazino es altamente nucleofílico, es frecuente el uso de análogos de HYNIC, en las reacciones previas a la marcación, que presenten este grupo protegido (Figura 8).^{55,57-59}



Esquema 1. Ejemplo de reacción de bioconjugación del AQB HYNIC.

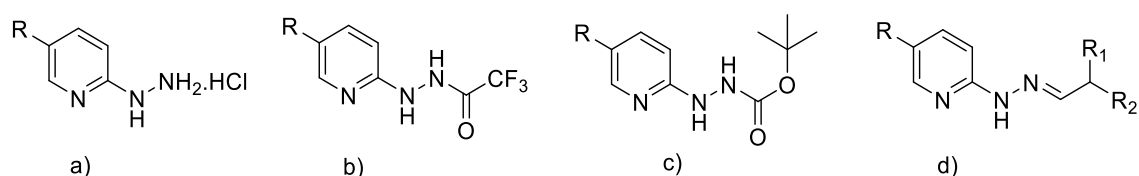


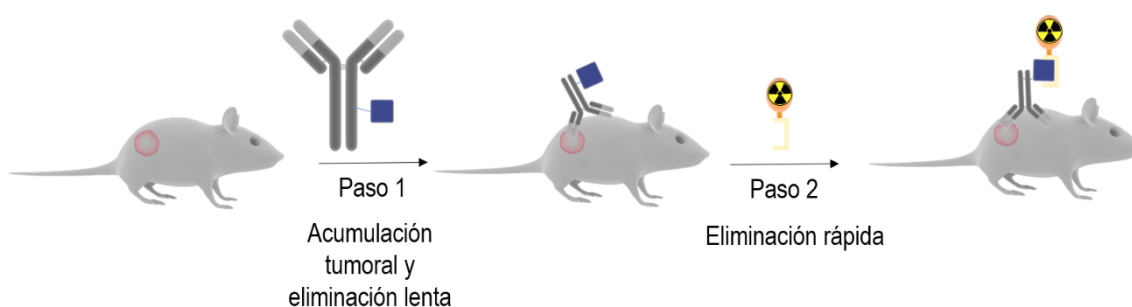
Figura 8. Estrategias utilizadas para proteger la función hidracina, mediante a) la forma de clorhidrato, b) grupo protector trifluoroacetilo, c) grupo protector Boc, y d) formación de hidrazonas.

2.4.3 Estrategias de marcación pre-dirigidas

Idealmente, los agente de imagen y terapia radiomarcados deberían acumularse en el tejido objetivo y eliminarse rápidamente de la circulación y de los tejidos normales. Sin embargo, cuando los radioinmunoconjugados son administrados se observan largos tiempos de residencia en la circulación y una progresiva acumulación a nivel del tumor,

características que limitan su uso como agentes de imagen y terapia.⁶⁰ Debido a que los anticuerpos tienen tiempos de vida media de varios días, los radionucleidos que se utilizan deben tener periodos de semidesintegración de varios días también. De forma que sea posible realizar la adquisición de imágenes luego de algunos días y así reducir la señal de fondo, o en el caso de los agentes terapéuticos asegurar su acumulación a nivel tumoral. Sin embargo, la combinación de largos tiempos de circulación y radioisótopos de largo periodo de semidesintegración, resulta en una combinación que conduce a altas dosis de radiación a los pacientes. Además limita el uso de los radionucleidos utilizados con mayor frecuencia en medicina nuclear, como por ejemplo el ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$) y ^{18}F ($t_{1/2} = 109 \text{ min}$).^{40,61}

Distintos abordajes han sido estudiados para sortear estos obstáculos. Una estrategia, se basa en mejorar la farmacocinética intrínseca de las inmunoglobulinas, mediante la generación de fragmentos de menor tamaño que se eliminen más rápido. Sin embargo, se ha observado, en algunos casos una reducción de la acumulación tumoral y retención a nivel renal. La otra estrategia, se basa en el concepto “pre-dirigido” (en inglés *pretargeted*), que consiste en separar la administración del anticuerpo y de átomo radioactivo, para que ocurra una combinación de ambos *in vivo*. Así el AcMo es administrado en una primera etapa, para permitir su acumulación a nivel tumoral y la depuración sanguínea, y en una segunda etapa se administra el componente radiomarcado para que interactúe con el AcMo *in vivo* (Esquema 2).⁶¹⁻⁶³



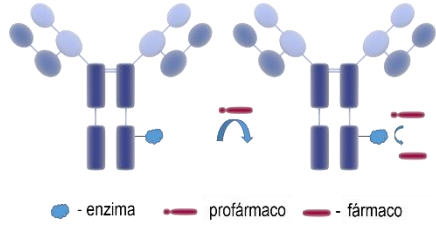
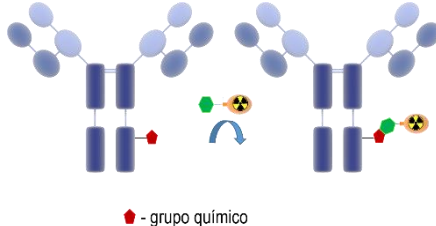
Esquema 2. Estrategia de marcación pre-dirigida.

Desde que fue propuesto en 1985, distintas estrategias han sido planteadas para llevar a cabo el concepto “pre-dirigido”.⁶⁴⁻⁶⁶ La propuesta inicial implica el uso de anticuerpos bi-específicos que por un lado reconocen el antígeno y por otro lado reconocen un

complejo radiomarcado.⁶⁴ Desde entonces los abordajes planteados comparten algunas características: a) la administración de los componentes en múltiples pasos, b) administración inicial de un AcMo que no solo reconoce el antígeno sino que también permite la interacción con el segundo componente de manera específica, c) utilizar en una etapa posterior, una molécula portadora del radionucleido, que sea de menor tamaño y de eliminación rápida. Los métodos pre-dirigidos pueden dividirse en 6 tipos como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de estrategias pre-dirigidas.

| Estrategias pre-dirigidas | |
|---|--|
| AcMo bi-específicos contruidos de forma de poseer un sitio de unión al hapteno y uno o dos sitios de reconocimiento del antígeno. ^{65,67,68} | <p>- antígeno - Hapteno marcado</p> |
| AcMo conjugados a estreptavidina o avidina, para luego interaccionar con biotina marcada. ⁶⁹⁻⁷² | <p>- Avidina/Estreptavidina - Biotina marcada</p> |
| AcMo biotinilados capaces de interaccionar con estreptavidina o avidina en un paso intermedio y posterior unión a biotina marcada. ^{73,74} | <p>- Biotina - Avidina/Estreptavidina - Biotina marcada</p> |
| AcMo conjugados a secuencias de ADN que permiten la interacción con el segundo componente mediante secuencias complementarias. ^{75,76} | <p>- oligómero de ADN - oligómero ADN marcado</p> |

| | |
|--|--|
| <p>Anticuerpos conjugados a enzimas, de forma de activar un profármaco en el sitio de acción.⁷⁷</p> |  <p>- enzima - profármaco - fármaco</p> |
| <p>Mediante el uso de reacciones químicas <i>in vivo</i>.⁷⁸</p> |  <p>- grupo químico - grupo químico marcado</p> |

2.5 Bioconjugación

La necesidad de explorar las interacciones moleculares que ocurren a nivel biológico ha aunado los esfuerzos de químicos y biólogos en pos de nuevas estrategias de bioconjugación que permitan el monitoreo molecular de sistemas biológicos.

De forma amplia, el término bioconjugación hace referencia a la unión de dos o más moléculas, generalmente mediante un enlace covalente, siendo al menos una de ellas una biomolécula. Como resultado, a partir de la conjunción de dos moléculas, se obtiene una molécula de mayor complejidad que combina las propiedades de ambas.

La aplicabilidad de un conjugado reside en visualizar las propiedades del conjugado final y así encontrar los componentes que han de ser necesario combinar para crearlo. Los diseños más utilizados incluyen, entre otros, la conjugación de a) AcMo con sondas fluorescentes o radioactivas, b) AcMo conjugados con fármacos, c) enzimas conjugadas a streptavidina o biotina, d) inmovilización de ligandos de alta afinidad sobre nanopartículas o superficies, e) conjugación de entidades biológicas a polímeros sintéticos. Las combinaciones posibles son múltiples y constituyen una herramienta fundamental para el desarrollo de las ciencias de la vida y médicas.

Así, a la hora de elegir el método de conjugación apropiado se debe:

- 1) tener en cuenta el objetivo para el cual dicho conjugado está siendo diseñado, 2) visualizar los grupos funcionales presentes en las moléculas a conjugar, 3) seleccionar la

molécula conectora apropiada de forma que reaccione con dichos grupos funcionales, 4) considerar el efecto de las condiciones de reacción seleccionadas sobre la funcionalidad de las biomoléculas involucradas.⁷⁹

Los avances en química, biología y tecnología han determinado una evolución de los métodos de conjugación y las aplicaciones de los mismos. Un claro ejemplo de ello es la evolución que han tenido los anticuerpos monoclonales radiomarcados. Inicialmente estos radioinmunoconjugados fueron ampliamente utilizados en distintas técnicas de investigación y diagnóstico *in vitro*, como el radioinmunoanálisis. Sin embargo, la aparición de nuevas estrategias de bioconjugación de anticuerpos conjugados a enzimas reemplazó el uso de los mismos en dicha aplicación. Así, actualmente la aplicación de anticuerpos monoclonales radiomarcados está enfocada a la creación de agentes de imagen y terapia específicos por blancos moleculares.

2.6 Química en sistemas biológicos

La comprensión de los procesos biológicos depende en gran parte de la habilidad para rastrear las moléculas que participan en dichas interacciones. En la búsqueda constante de nuevas herramientas de síntesis química y de bioconjugación, la química bio-ortogonal surge recientemente como un área que abraza el desafío de realizar reacciones químicas en sistemas biológicos. El objetivo consiste en encontrar y desarrollar reacciones que pueden ser llevadas a cabo en la complejidad de los entornos biológicos, y en explorar el abanico de potenciales aplicaciones que surgen a partir de las mismas.

El término bio-ortogonal, acuñado por Carolyn Bertozzi en 2003, hace referencia a un tipo de reacción quimioselectiva cuyos componentes no interactúan con el medio biológico.⁸⁰ Las reacciones bio-ortogonales implican el uso de grupos funcionales que reaccionan selectivamente entre sí, en un medio acuoso y que sean inertes a funcionalidades biológicas.^{80,81}

Se debe recordar que las células son ambientes acuosos ricos en una gran variedad de funcionalidades químicas producto de la presencia de distintas entidades como las proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, iones inorgánicos, entre otras (Figura 9). Por tal motivo, los grupos funcionales bio-ortogonales, suelen ser entidades químicas no prevalentes en sistemas biológicos. Además, no deben ser sensibles a la presencia de

agua ni al ambiente celular reductor, así como tampoco deben requerir condiciones de temperatura, presión y concentración elevadas para reaccionar. Otra característica deseable es que el producto de reacción sea estable y no citotóxico. Por otro lado, los reactivos bio-ortogonales complementarios deben reaccionar selectivamente y de forma eficiente.⁸²

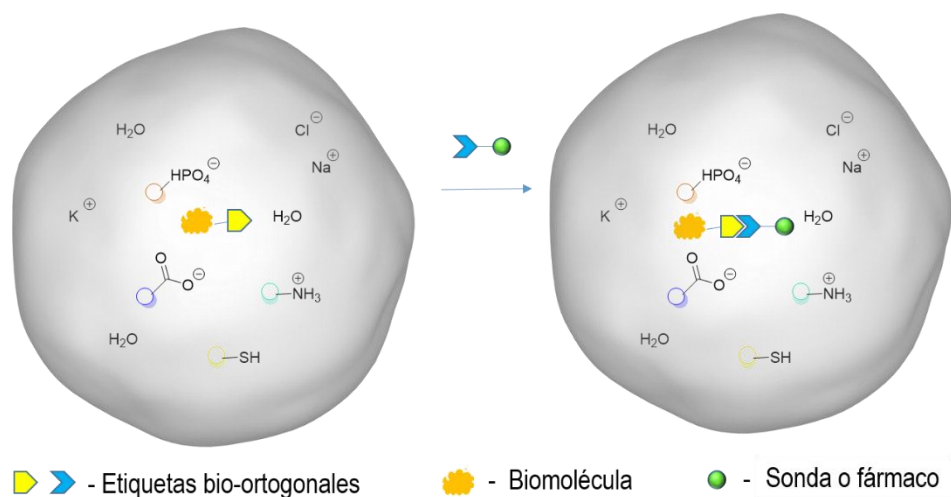


Figura 9. Reacción bio-ortogonal. Se basa en la incorporación de un grupo funcional o etiqueta bio-ortogonal (de origen no natural) en la biomolécula en estudio. Dicha etiqueta equipa a la biomolécula con una funcionalidad distinta a las presentes en la naturaleza. Seguidamente es introducida en el entorno biológico de forma de permitir su interacción con su diana molecular. En una segunda etapa es adicionada la segunda etiqueta bio-ortogonal, portadora de la sonda o fármaco, de forma que reaccione covalentemente con la primera.

Si bien la selectividad química es requisito indispensable para una reacción *in vivo* entre componentes bio-ortogonales, la cinética intrínseca de la reacción es determinante para su aplicación en sistemas biológicos. La mayoría de las reacciones que se utilizan para conjugar biomoléculas selectivamente presentan una cinética de segundo orden respecto a ambos reactantes y, en consecuencia, sus velocidades dependen de las concentraciones de los dos componentes de la reacción y de la constante cinética de la misma. Si bien en reacciones *in vitro* es posible controlar dichos parámetros, *in vivo* hay otras consideraciones a tener en cuenta. Por ejemplo, deben poseer una cinética elevada en condiciones fisiológicas de lo contrario es necesario utilizar una mayor concentración de al menos uno de los reactivos para favorecer la reacción, lo cual puede generar problemas de toxicidad.^{78,82}

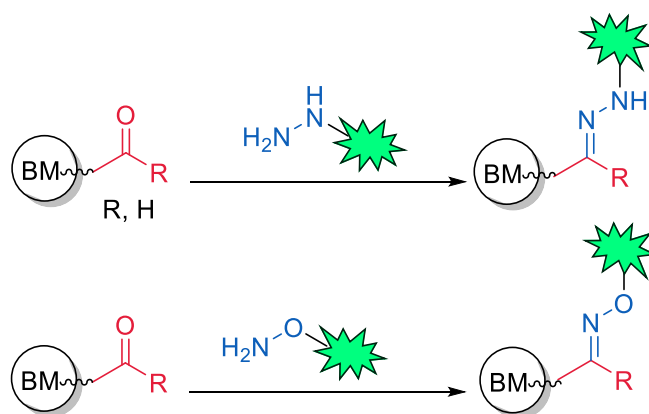
Estas exigencias reducen el repertorio de reacciones químicas pasibles de ocurrir en sistemas biológicos a un grupo limitado. A mayor complejidad biológica, mayores son

los requisitos que deben reunir. A continuación se detallará la evolución que han tenido los abordajes bio-ortogonales, sus aplicaciones y sus limitaciones.

2.7 Reacciones bio-ortogonales

2.7.1 Condensación de carbonilos con nitrógenos con efecto alfa

Una de las primeras reacciones considerada bio-ortogonal es la condensación entre aldehídos o cetonas con grupos hidrazina u aminooxi para formar hidrazonas y oximas respectivamente (Esquema 3).⁸³⁻⁸⁵ Si bien ha sido ampliamente utilizada como herramienta de bioconjugación, la quimioselectividad de los reactivos y la baja prevalencia de los grupos funcionales en los biopolímeros naturales, permitieron estudiarla como una reacción bio-ortogonal. Por ejemplo, la reacción entre hidrazina y aldehído ha sido utilizada para acoplar dos fármacos de forma intracelular, observándose un efecto citotóxico sinérgico.⁸³ Un abordaje similar, fue utilizado en la síntesis de un inhibidor enzimático mediante la formación de una hidrazona a nivel de cultivo celular.⁸⁶



Esquema 3. Reacción de condensación entre aldehídos o cetonas con grupos hidrazina u aminooxi para formar hidrazonas y oximas respectivamente

Posteriormente, la introducción selectiva de grupos cetona y aldehídos en proteínas y carbohidratos amplió el espectro de aplicaciones.^{84,87-89} Por ejemplo, en 1997 el grupo de Carolyn Bertozzi plantea utilizar los grupos carbonilo como etiqueta bio-ortogonal de membrana celular debido a la ausencia de dichas funciones químicas en la superficie celular. Su estrategia consistió en incorporar los grupos cetonas a las glicoproteínas de la membrana plasmática a través de la biosíntesis del ácido siálico, un carbohidrato que está presente en las porciones terminales de las mismas. El ácido siálico, es sintetizado a partir del precursor *N*-acetilmanosamina, sin embargo derivados con sustituyentes acilo no

naturales son tolerados e incorporados en la síntesis del ácido siálico (Figura 10). Una vez incorporados en las glicoproteínas de membrana, demostraron que los grupos cetona reaccionan selectivamente con un derivado hidrazida-biotinilado, el cual posteriormente interacciona con un derivado avidina-FITC.⁸⁷ En un abordaje similar, Paulson et al, describen la formación de una oxima, catalizada por la presencia de anilina, entre grupos aldehído a nivel de las glicoproteínas de membrana y biotina portadora de un grupo aminooxi.⁹⁰

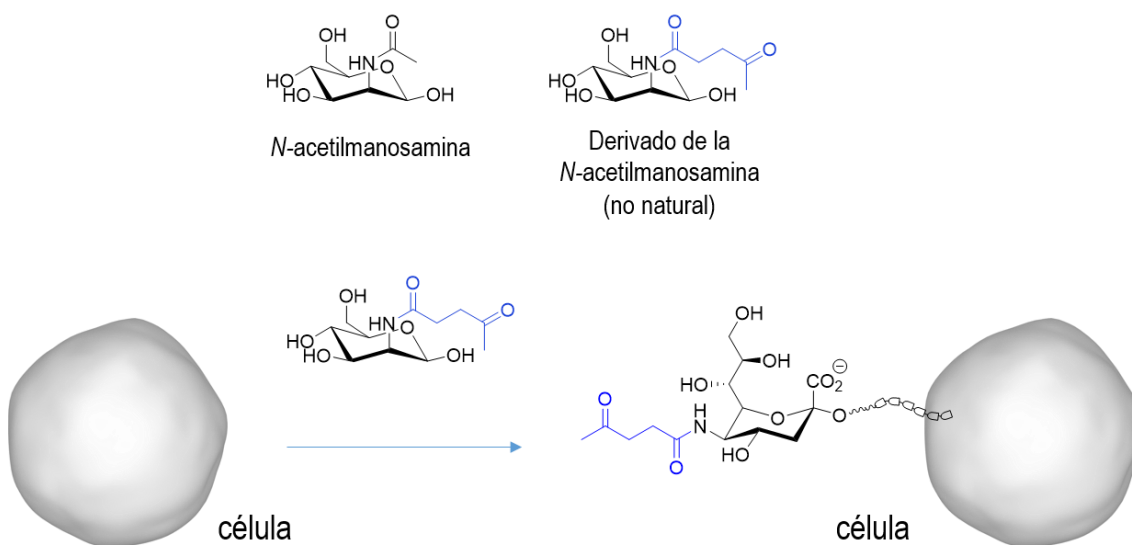


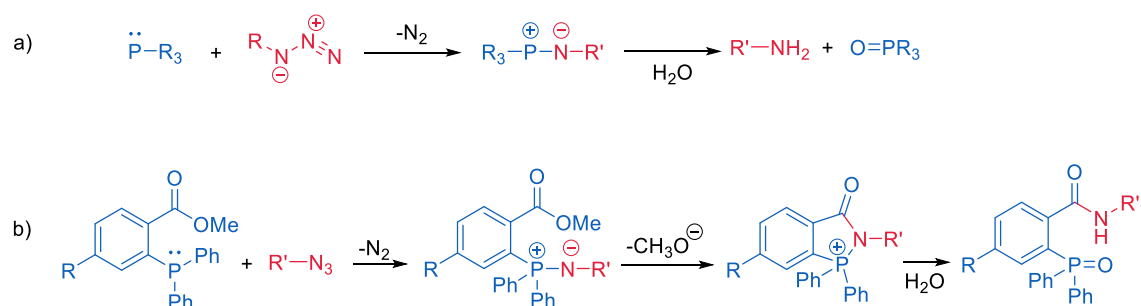
Figura 10. Incorporación de grupos funcionales cetonas, a través de la biosíntesis del ácido siálico de las glicoproteínas de superficie de membrana.

Si bien los ejemplos anteriores significaron un notable avance y dieron inicio a la química bio-ortogonal, su utilización para la modificación de proteínas intracelulares o en organismos vivos no ha sido tan expandida. Posiblemente, algunas limitaciones fueron encontradas en términos del pH de la reacción (pH óptimo entre 3 a 5),⁹¹ o a la competencia con cetonas y aldehídos a nivel de cofactores y azúcares intracelulares (glucosa y piruvato).^{78,92}

2.7.2 Reacción de Staudinger entre azidas y triarilfosfinas.

En la búsqueda de reacciones quimioselectivas, una reacción que atrajo la atención es la descrita por Staudinger y Meyer en 1919 entre el grupo azida y trifenilfosfina en presencia de agua (Esquema 4, a).^{93,94} Una reacción rápida donde la trifenilfosfina reacciona con la azida formando un azailuro intermedio que se descompone para producir óxido de trifenilfosfina y una amina primaria.

A pesar de ser una reacción ampliamente utilizada en química orgánica para la síntesis de aminas, no había sido explotada como herramienta de conjugación de biomoléculas. Sin embargo, Bertozzi et al., visualizaron que posee requisitos como para ser realizada en medios biológicos. Entre ellos se destaca que ambos reactivos (azidas y trifenilfosfina) están ausentes en sistemas biológicos, reaccionan de forma quimioselectiva y en presencia de agua. Además la azida presenta tamaño pequeño, es químicamente inerte, estable en condiciones fisiológicas, requisitos deseables para un grupo funcional bio-ortogonal.^{78,95} Con esto en mente, surge una adaptación de la reacción de Staudinger, conocida actualmente como ligación de Staudinger-Bertozzi; donde se describe la formación de un enlace amida a partir de una azida y una arilfosfina funcionalizada con un grupo metoxicarbonilo en uno de los arilos (Esquema 4, b).⁹⁶



Esquema 4: a) Reacción de Staudinger, b) Ligación de Staudinger-Bertozzi.

La quimioselectividad de la reacción en diferentes ambientes y la utilización de la azida como etiqueta bio-ortogonal, promovieron la incorporación de *N*-azidoacetilmanosamina en la biosíntesis de ácido siálico. De esta forma, luego de introducir los grupos azida en la red de glicoconjugados de la superficie celular, fue posible la modificación química mediante reacción con una triarilfosfina biotilada y posterior detección con un derivado avidina-FITC mediante citometría de flujo (Figura 11).⁹⁶

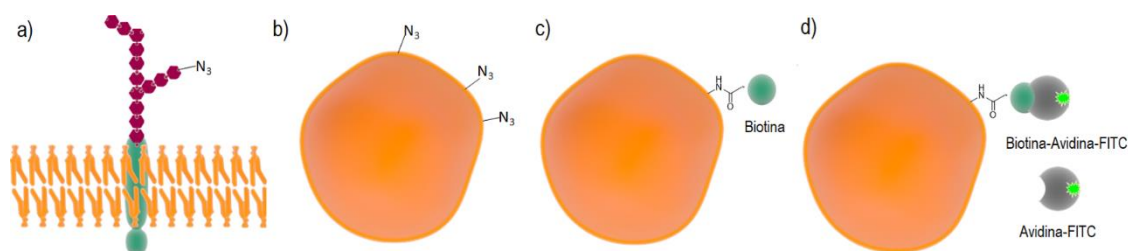


Figura 11. Reacción bio-ortogonal en la superficie celular entre azidas y triarilfosfinas. a) y b) Incorporación de grupos funcionales azida, a través de la biosíntesis del ácido siálico de las glicoproteínas de superficie de membrana. c) reacción bioortogonal entre azida y una triarilfosfina biotinilada. d) adición de sonda fluorescente (avidina-FITC).

El éxito de la estrategia a nivel de células vivas motivó, poco tiempo después, la ejecución de la reacción en animales vivos. Así, mediante citometría de flujo fue posible confirmar la modificación de las superficies glicosiladas de los esplenocitos en su ambiente nativo, un evento químico hasta el momento sin precedentes.^{82,97}

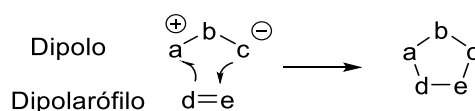
Desde su descripción, la ligación de Staudinger-Bertozzi, ha sido utilizada para la detección de glicosidasas en mezclas complejas y monitorear actividad glicosiltransferasas mediante ensayos de inmovilización en placa.^{81,98-100} También ha permitido la marcación de proteínas mediante la incorporación de aminoácidos no naturales portadores de un grupo azida.¹⁰¹

A pesar del éxito de dicha reacción como herramienta de bioconjugación. Su aplicación en el diseño de agentes de imagen en animales vivos se ha visto limitado, principalmente por una cinética de reacción relativamente lenta ($k=0.0020 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siendo el ataque nucleofílico de la fosfina el paso limitante de la reacción.¹⁰² Esta característica implica utilizar concentraciones elevadas de triarilfosfinas ($>250 \mu\text{M}$), lo que resulta en imágenes con elevada señal de fondo, reduciendo de esta forma sus aplicaciones.

2.7.3 Cicloadición entre azidas y alquinos

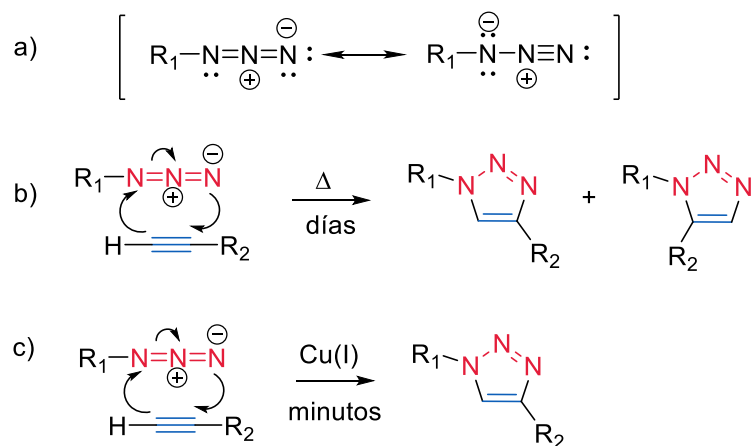
El objetivo de realizar reacciones en seres vivos, impuso la necesidad de hallar reacciones más rápidas. Las características favorables del grupo azida como etiqueta bio-ortogonal motivó a procurar reacciones con azidas que transcurran a mayor velocidad, lo que enfocó los esfuerzos en el estudio de reacciones de cicloadición [3+2] ó 1,3-dipolares entre azidas y alquinos.

El concepto de cicloadición [3+2] fue introducido por Rolf Huigsen en 1960 y a lo largo de los años ha sido ampliamente utilizada en la síntesis química de heterociclos.¹⁰³ Permite la creación de dos enlaces σ , carbono-carbono o carbono-heteroátomo, en un único paso, con gran eficiencia y selectividad. En una cicloadición [3+2] típica, un 1,3-dipolo reacciona con un sistema de enlaces múltiples, generalmente alqueno o alquino, dipolarófilo, para generar un anillo de 5 miembros (Esquema 5). Desde un punto de vista bio-ortogonal, su mayor atractivo reside en la selectividad intrínseca de los reactivos que participan y en la posibilidad de modificar sus propiedades electrónicas para promover la cicloadición.¹⁰⁴



Esquema 5. Cicloadición [3+2] típica.

Entre los grupos funcionales que pueden actuar en esta reacción como 1,3-dipolar, probablemente las azidas y alquinos, para formar [1,2,3]triazoles, han sido los de mayor impacto (Esquema 6). La reacción original requiere de condiciones de temperatura o presión elevadas, además de reflujo de tolueno o tetracloruro de carbono (12-60 h), condiciones que la excluirían para trabajar con biomoléculas.¹⁰⁵ Sin embargo, en el 2002 dos grupos de investigación en simultáneo describieron una alternativa para acelerar la reacción, adicionar cantidades catalíticas de cobre (I).^{106,107} Esta modificación además de aumentar la cinética (reacción transcurre en minutos) y regioselectividad de la reacción (favorece la formación del regioisómero 1,4), permite que la misma transcurra en medio acuoso. Esta reacción química, es conocida actualmente como “*cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre*” (CuAAC, del inglés, *catalyzed azide-alkyne cycloaddition*).¹⁰⁸



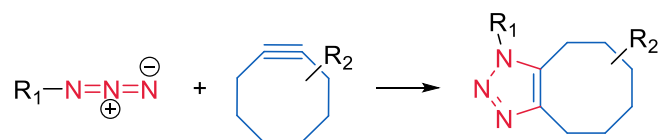
Esquema 6. a) Representaciones de Lewis que contribuyen al híbrido de resonancia del grupo funcional azida b) y c) Reacción entre azida y alquino para la formación de [1,2,3]triazoles. En b) condiciones térmicas generan regioisómeros 1,4 y 1,5 en cantidad equimolar. En c) reacción catalizada por Cu(I) favorece la formación del regioisómero 1,4.

Casi en simultáneo Sharpless et al., introducen el concepto de química “click” o “click chemistry”, para describir un abordaje químico en el cual las reacciones sean sencillas, rápidas, altamente selectivas y regioespecíficas, cuyos reactivos puedan oficiar de bloques de construcción de forma de obtener productos con alta eficiencia, tolerable al agua y con productos secundarios fácilmente removibles.⁷⁷ En este sentido, si bien hay varias reacciones tipo “click” es la “*cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre*” la más representativa, por lo cual también es reconocida como “*azide-alkyne click reaction*”.¹⁰⁹

2.7.4 “Click chemistry” libre de cobre: cicloadición entre azidas y alquinos promovida por ciclos tensionados

Si bien la cicloadición catalizada por Cu(I) procede aproximadamente siete órdenes de magnitud más rápido que la cicloadición sin catalizar, y ha tenido gran impacto en la síntesis química de fármacos y otros materiales, su aplicación en sistemas biológicos se ha visto limitada por la citotoxicidad del Cu(I).^{78,110-113} Una alternativa que se ha estudiado para llevar a cabo una cicloadición con azidas y alquinos libre de cobre consiste en la utilización de alquinos cíclicos tensionados, por ende altamente reactivos.^{78,82,114,115} La cicloadición promovida por ciclos tensionados (SPAAC, del inglés “*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*”) es el resultado de varias observaciones a lo largo de los años. La distorsión de los ángulos de enlace de alquenos y alquinos al formar un ciclo, resulta en un aumento de la reactividad y velocidad de la cicloadición.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Así, en base

a antecedentes de Wittig y Krebs que en 1961 describieron la reacción entre cicloalquino y una fenil azida como “explosiva”, Bertozzi exploró la cicloadición entre el grupo funcional azida y un derivado ciclooctino biotinilado (Esquema 7).¹¹⁴ En un abordaje similar, utilizando como etiqueta bio-ortogonal el grupo azida (incorporado metabólicamente) se comprobó la modificación covalente en la superficie celular en la complejidad del cultivo celular, sin observar efecto citotóxicos aparentes (Figura 12).



Esquema 7. Reacción de cicloadición entre una azida y un ciclooctino.

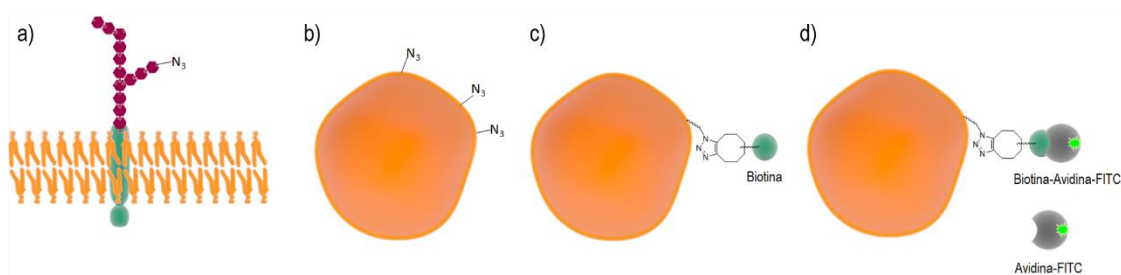


Figura 12. Reacción bio-ortogonal en la superficie celular entre azidas y ciclooctino. a) y b) Incorporación de grupos funcionales azida, a través de la biosíntesis del ácido siálico de las glicoproteínas de superficie de membrana. c) reacción bioortogonal entre azida y un derivado ciclooctino biotinilado. d) adición de sonda fluorescente (avidina-FITC).

Si bien la prueba de concepto de que la cicloadición entre azidas y alquinos promovida por ciclos tensionados es de utilidad para la modificación selectiva de biomoléculas en células vivas, la constante de segundo orden $k=0.024 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ motivó a estudiar distintos derivados de ciclooctino, con el fin de lograr una reacción adecuada para su aplicación *in vivo*. Las sustituciones sobre el ciclooctino, fueron orientadas a mejorar parámetros como velocidad de reacción, solubilidad, toxicidad, etc. Uno de los abordajes combina la tensión del ciclo con la incorporación de grupos electrón atrayente, lo que resulta en un aumento de la constante de segundo orden. Por ejemplo el difluoro-derivado “DIFO” reacciona una 30 veces más rápido que derivados no fluorados o que la ligación de Staudinger (Figura 13).^{114,119,120} El uso de “DIFO” permitió, por primera vez, la imagen *in vivo* de glicanos en zebrafish un organismo vivo. Otra estrategia, por ejemplo, se enfocó en aumentar aún más la tensión cíclica mediante la fusión de dos anillos de benceno al

ciclooctino, siendo “BARAC” el derivado que logró una constante de segundo orden mayor ($k=0.96 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Figura 14).^{121–124}

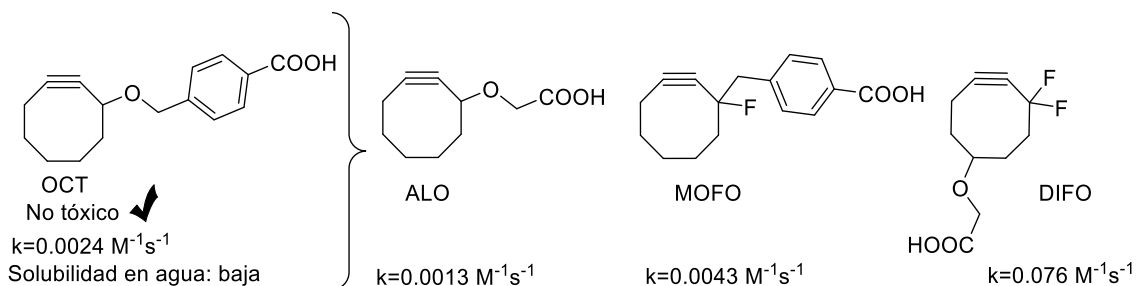


Figura 13. Ejemplos de derivados ciclooctino sustituidos con grupos electrón atrayente y su efecto en la velocidad de reacción 1,3-dipolar.

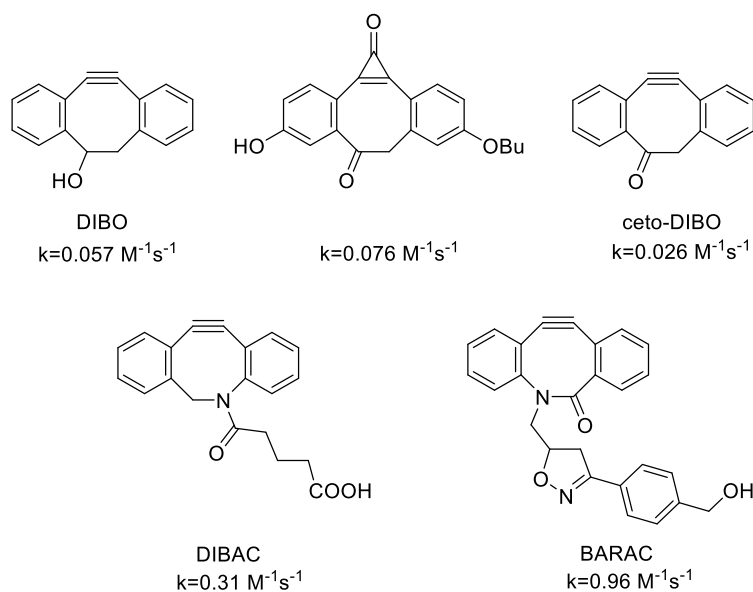
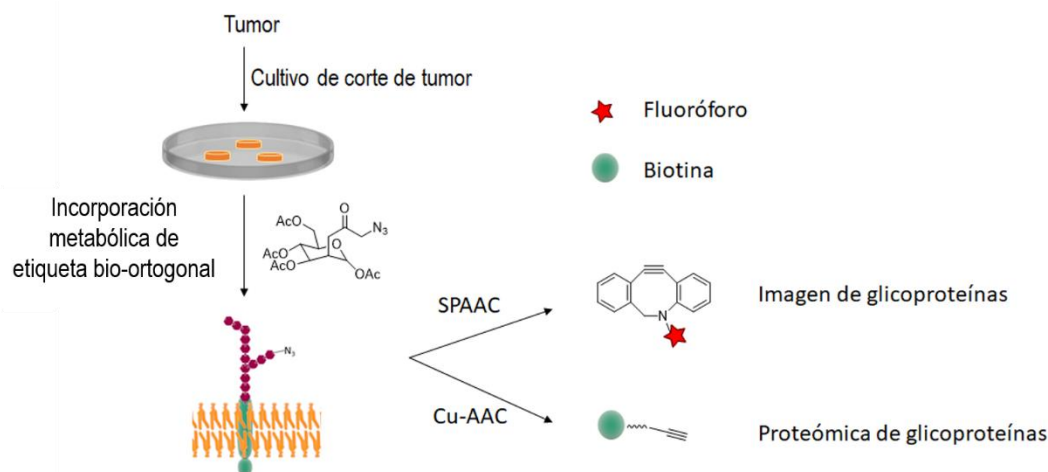


Figura 14. Ejemplos de derivados ciclooctino con anillos fusionados y su efecto en la velocidad de reacción.

Una aplicación reciente de las cicloadiciones entre azidas y alquinos, consiste en la incorporación de azido-azúcares en las glicoproteínas de células tumorales provenientes del cultivo de cortes de tumor de próstata. Este desarrollo, ha permitido imágenes de microscopía de las glicoproteínas de membrana a nivel de células tumorales, por reacción del ciclooctino DIBAC conjugado a un fluoróforo. Alternativamente, permitió también la separación e identificación de nuevos biomarcadores tumorales, a través de

funcionalización de las mismas con un alquino biotilado, que reacciona a través de “click chemistry” catalizada con Cu y posteriormente es capturado en esferas funcionalizadas con avidina (Esquema 8).¹²⁵

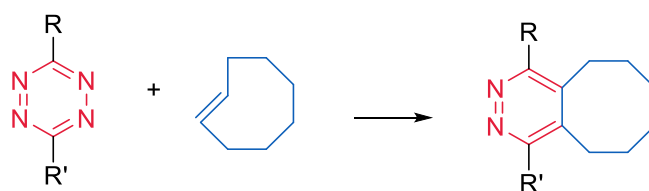


Esquema 8. Plataforma bio-ortogonal enfocada a la caracterización tumoral a nivel clínico.

2.7.5 Reacciones de Diels-Alder entre tetrazinas y olefinas

2.7.5.1 Cicloadición entre tetrazinas y *trans*-cicloocteno

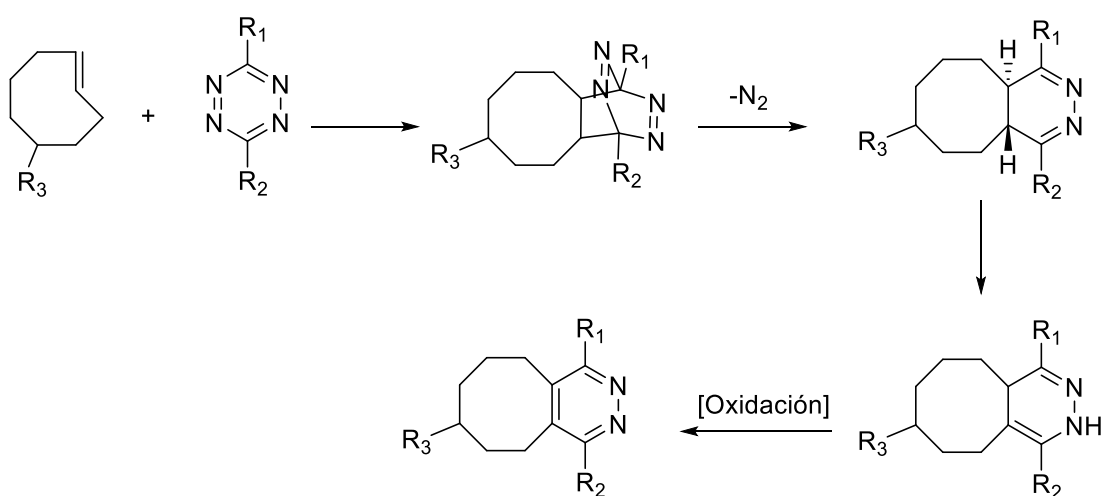
En la búsqueda de reacciones con velocidades de reacción excepcionalmente altas, Fox et al., decidieron explorar la reacción entre [1,2,4,5]tetrazinas y *trans*-cicloocteno como herramienta de bioconjugación (Esquema 9).¹²⁶



Esquema 9. Reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazinas y *trans*-cicloocteno.

Antecedentes previos, indicaban que las [1,2,4,5]tetrazinas reaccionan como dienos poderosos frente a alquenos y alquinos.¹²⁷ En 1990, Sauer et al., estudiaron las constantes cinéticas de [1,2,4,5]tetrazinas con varios dienófilos como ciclopropeno, norboreno, ciclooctino y los isómeros *cis* y *trans* de cicloocteno, entre otros. Observaron que el *trans*-cicloocteno (TCO) presentaba la mayor reactividad, siendo 7 órdenes de magnitud más rápido que el isómero *cis*-.^{128,129}

El primer paso en el mecanismo de reacción (Esquema 10) implica una reacción de Diels-Alder inversa, donde la tetrazina actúa como dieno, y el TCO actúa como dienófilo, dando como resultado un aducto bi-cíclico altamente tensionado que mediante liberación de N_2 , via retro-Diels Alder, rápidamente se convertirá en un conjugado estable [4,5]dihidropiridazina que seguidamente se isomeriza al [1,4]dihidro-isómero. Finalmente, un paso de oxidación conduciría a la formación de la correspondiente piridazina. Además, debido al mecanismo concertado de la cicloadición [4+2] de Diels-Alder, la reacción se caracteriza por presentar una cinética de segundo orden.^{126,130,131}



Esquema 10. Mecanismo de reacción entre [1,2,4,5]tetrazina y TCO.

2.7.5.2 Reactividad

En una cicloadición [4+2] de Diels-Alder “directa” 4 electrones π de un dieno reaccionan con 2 electrones π de un dienófilo. El dieno generalmente es rico en electrones y el dienófilo sustituido con grupos electrón atrayentes. La reacción puede ser racionalizada en término del orbital molecular ocupado más alto (HOMO, del inglés, *highest occupied molecular orbital*) y el orbital molecular no ocupado más bajo (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*) como se muestra en la Figura 15. Por el contrario, en una reacción de Diels-Alder inversa o IEDDA (del inglés, *inverse electron demand Diels-Alder*), la polaridad electrónica dieno/dienófilo se invierte (Figura 15).

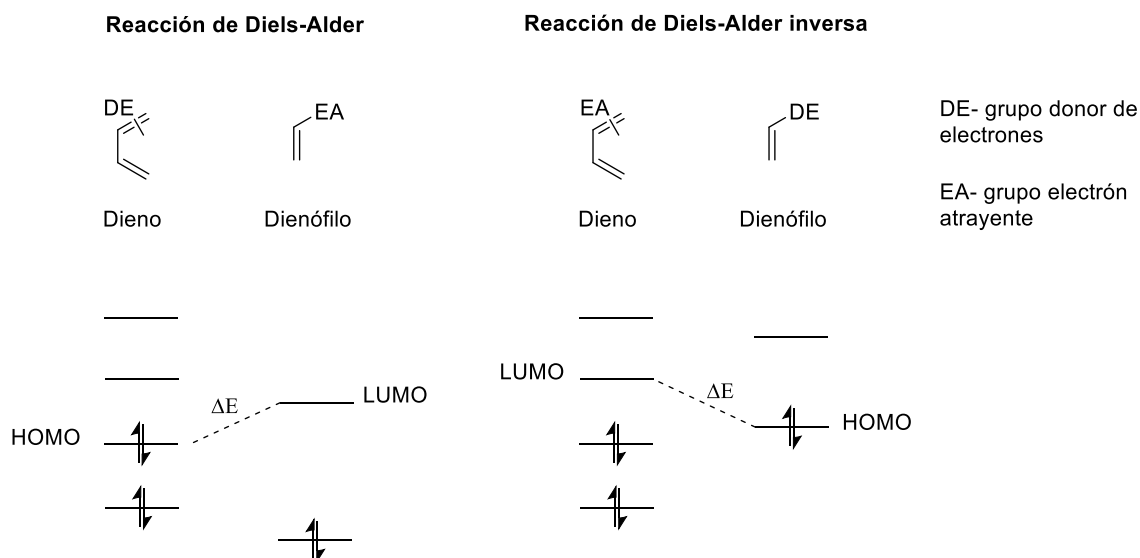


Figura 15. Las reacciones de Diels-Alder pueden ser racionalizadas considerando la diferencia de energía en los orbitales moleculares de frontera HOMO-LUMO de los reactivos.

La tetrazina (dieno) es deficiente en electrones, mientras que el TCO (dienófilo) es rico en electrones.¹³² Estas características determinan que la reactividad de la reacción puede, en principio, ser aumentada mediante modificaciones estructurales sobre los reactivos. Hasta el momento, se ha estudiado la reacción de IEDDA con una variedad de [1,2,4,5]tetrazinas con distintos sustituyentes en las posiciones 3 y 6, así como también con distintos dienófilos (Figura 16).¹³⁰ La utilización de distintos métodos para la determinación de las constantes cinéticas, dificulta comparar reactividades, sin embargo es posible observar algunas tendencias. Por ejemplo, según las estructuras representadas en la Figura 14, la reacción de los alquinos cíclicos 1 y 2 con las tetrazinas 1 y 9, resultan en constante de segundo orden en el entorno de 1×10^{-2} y $4.5 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹³³ De forma similar, el uso de norborneno (3) con las tetrazinas 6 y 10 resultó en constantes cinéticas en el rango de 1 y $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^{131,134} Aumentos notorios de reactividad, se observan cuando se utilizan análogos de TCO, con constantes cinéticas en el orden 10^3 a 10^4 dependiendo de la metodología utilizada.^{135,136} Entre los derivados TCO más reactivos se encuentran el 6 y el biciclo 7, que resultaron en constantes de 26×10^4 y $280 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente frente a un análogo de la tetrazina 8.^{137,138} Sin embargo, aumentos en la reactividad se han visto asociados con un aumento de la inestabilidad, como es el caso del derivado TCO 7. En el caso de las tetrazinas, también se ha observado una tendencia

similar, un aumento de reactividad resulta en aumento de la inestabilidad del heterociclo.¹³⁵

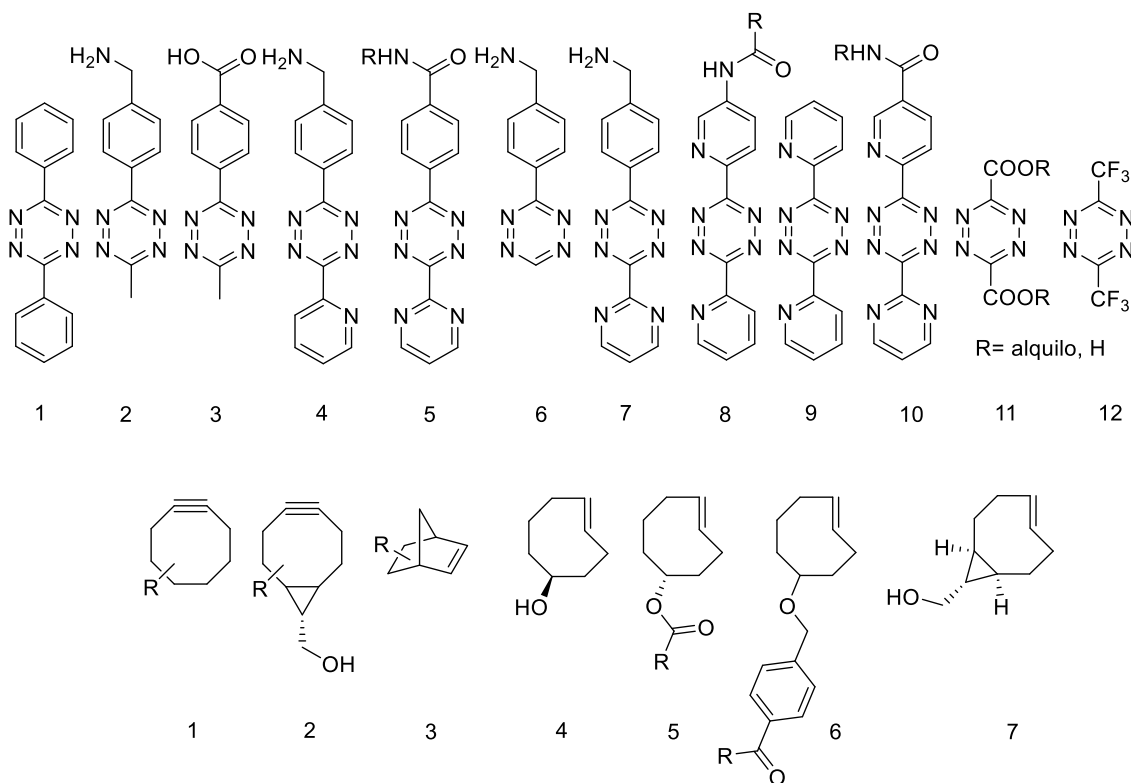
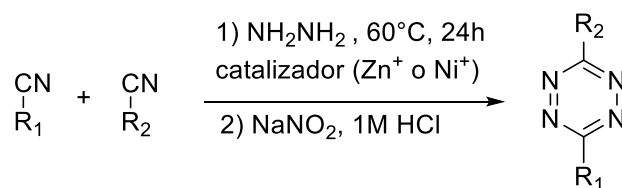


Figura 16. Algunos de los derivados [1,2,4,5]tetrazinas y TCO utilizados para estudiar la reacción IEDDA.

Un estudio teórico reciente, de la reactividad entre [1,2,4,5]tetrazinas y TCO, reveló que sustituyentes electrón atrayentes en las posiciones 3 y 6 de las tetrazinas, disminuyen la energía del LUMO, lo que resulta en energías de interacción más fuertes.¹³⁹⁻¹⁴¹ De forma similar dienófilos con sustituyentes ricos en electrones, favorecen la reactividad ya que elevan la energía del HOMO. Al comparar la reactividad entre alquenos y alquinos, se observó que los alquenos tienen energías HOMO mayores a las de los alquinos, y por lo tanto, los alquenos tienen energías de interacción más fuertes con las tetrazinas. Además, los dienófilos como el TCO y ciclooctino, presentan mayor reactividad en las cicloadiciones, debido a que poseen una estructura pre-distorsionada por lo que requieren menor energía de distorsión para alcanzar el estado de transición.¹⁴¹

2.7.5.3 Síntesis de [1,2,4,5]tetrazinas y TCO

Una estrategia clásica de obtención de [1,2,4,5]tetrazinas es a partir de nitrilos en presencia de hidracina o acetato de formamidina, seguido de un paso de oxidación.⁹³ Sin embargo esta estrategia, resulta en bajos rendimientos cuando se utilizan nitrilos de alquilo. Recientemente, se ha descrito la reacción en un único paso, mediante catálisis con un ácido de Lewis (triflatos de Zn o Ni), lo que ha permitido la obtención de tetrazinas con buenos rendimientos.¹⁴² Cabe destacar que debido a que algunas [1,2,4,5]tetrazinas son de naturaleza explosiva, sumado a la elevada reactividad de la hidracina, y a la liberación de gases de óxido de nitrógeno, la síntesis de las mismas son llevadas a cabo en campanas con gran ventilación y los reactivos manipulados con precaución.¹⁴² La gran mayoría de las [1,2,4,5]tetrazinas se obtienen como sólidos de color rojo o fucsia, y presentan una longitud de absorción característico en el rango de 520-540 nm. Este pico de absorción característico, desaparece luego de la reacción de cicloadición o ante eventual inestabilidad.^{130,143}



Esquema 11. Síntesis de [1,2,4,5]tetrazinas catalizada con Zn o Ni.

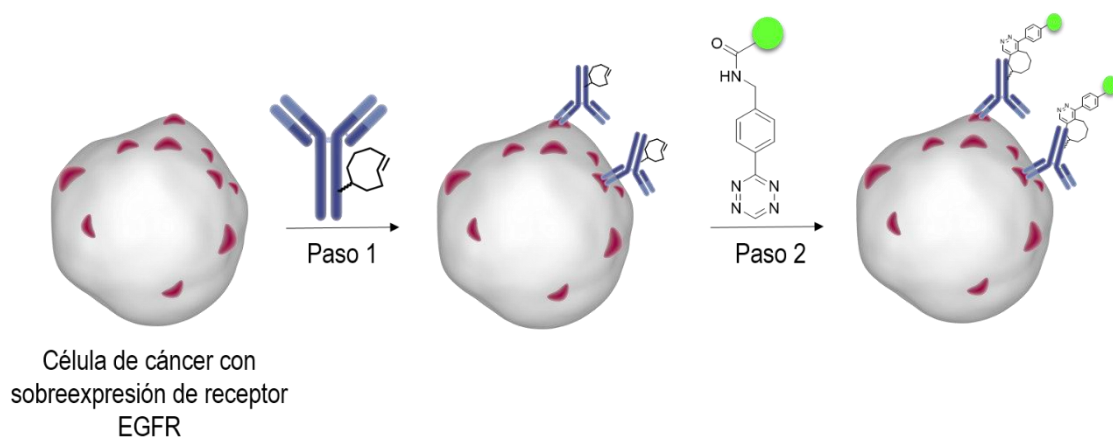
Por otro lado, el *trans*-cicloocteno se obtiene mediante fotoisomerización a partir del *cis*-cicloocteno por irradiación con UV de 254 nm. Debido a que el TCO forma complejos estables con cationes de plata, el TCO es purificado mediante el pasaje del mismo por una columna de sílica con AgNO₃, siendo el *cis*-cicloocteno eluido y sometido a fotoisomerización mediante un sistema cerrado que permite su recirculación.¹⁴⁴ Si bien la técnica descrita permite alcanzar una escala de varios gramos, los costos económicos vinculados al sistema requerido para su síntesis (reactor UV comercial y matraces de cuarzo) limitan su realización.

2.8 Reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazina y TCO en el diseño de agentes de imagen y terapia

2.8.1 Desarrollo de agentes de imagen

Las características excepcionales de la reacción entre [1,2,4,5]tetrazinas y TCO, despertó gran interés en el área de la imagen molecular. Dos trabajos pioneros visualizan el potencial bio-ortogonal de la misma. Por un lado, Weissleder et al., demuestran que la reacción puede ser llevada a cabo *in vitro* en cultivo celular, utilizando como agente de imagen una sonda fluorescente. Mientras que poco tiempo después Robillard et al., demuestran la exquisita bioortogonalidad de la reacción y el potencial de la misma para resolver las desventajas que presentan los radioinmunoconjugados como agentes de imágenes y terapia.

En su trabajo, Weissleder et al., describen la detección de EGFR en células A549 de cáncer de pulmón, utilizando una sonda fluorescente mediante el uso de una estrategia pre-dirigida. Así, en una primera etapa las células fueron incubadas con el AcMo anti EGFR (Cetuximab) conjugado a TCO, para el reconocimiento del mismo por su receptor blanco, y en una segunda etapa se realizó la adición de un derivado tetrazina portador de un fluoróforo (Esquema 11).¹⁴⁵ Mediante estudios de microscopia y citometría de flujo comprobaron la selectividad de la reacción y la viabilidad de la estrategia pre-dirigida para el desarrollo de agentes de imagen molecular, entre otras cosas. Además, describieron la síntesis de un derivado tetrazina (3-(4-benzilamino)-[1,2,4,5]tetrazina) que mostró ser estable en amortiguador de fosfato salino (PBS) y suero, presentando una constante de segundo orden de $6000 \pm 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ cuando reacciona con TCO a 37 °C.^{131,145}



Esquema 12. Diseño experimental de estrategia de marcación pre-dirigida in vitro. En paso 1, se incubó el cultivo celular con cetuximab-TCO para su interacción con el EGFR. En paso 2, se administró el derivado tetrazina portador de la sonda fluorescente para su reacción con los AcMo-TCO en la superficie celular.

Poco tiempo después, Robillard et al., describen el primer abordaje pre-dirigido en animales para imágenes SPECT-CT basado en IEDDA.¹³⁷ En dicho trabajo se describe la síntesis del derivado 3,6-di-(2-piridinil)-[1,2,4,5]tetrazina acoplado al quelante DOTA mediante un espaciador de polietilenglicol (Figura 17) y su posterior marcación con ¹¹¹In para imágenes SPECT. El derivado tetrazina sintetizado presenta una cinética excepcional, con una constante de segundo orden de $27.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ cuando reacciona con el TCO en PBS a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Como prueba de concepto de la estrategia pre-dirigida, los autores estudiaron el reconocimiento del AcMo CC49 por la glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), una mucina que se encuentra sobreexpresada en distintos tipos de cáncer y además presenta una internalización limitada.¹⁴⁶ Así, el CC49 es conjugado a TCO a través de grupos amino presentes en la proteína, y administrado a un ratón portador de un tumor inducido con células LS 174T. Luego de un periodo de 24 horas, en el cual CC49-TCO se acumula progresivamente en el tumor y depura de la circulación sanguínea, la tetrazina radiomarcada es administrada (Esquema 12). Finalmente, los estudios de biodistribución e imágenes SPECT-CT revelaron una clara visualización del tumor, con una acumulación de actividad de 4.2 \% DI/g de tumor, y una relación tumor/músculo de 13.1.¹³⁷ Resultados promisorios que los autores mejoran en trabajos posteriores mediante la administración de paso intermedio de un agente secuestrador del AcMo-TCO circulante en sangre, y mediante el uso de un derivado *trans*-cicloocteno, sustituido en posición axial con éter bencílico que presenta mayor estabilidad y reactividad ($k_2 = 270.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Figura 18).¹³⁸

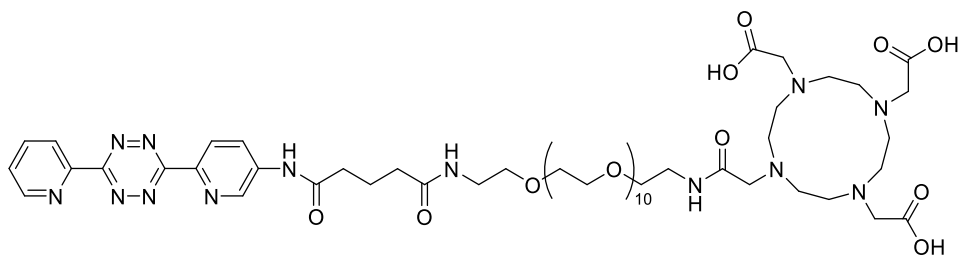
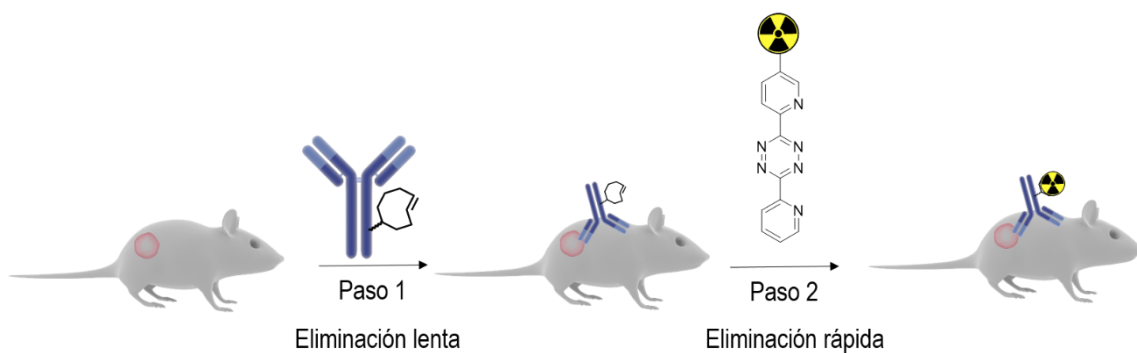


Figura 17. Derivado tetrazina sintetizado por Robillard et al.¹³⁷



Esquema 13. Diseño experimental de estrategia de marcación pre-dirigida *in vivo*. En paso 1, se administra el AcMo-TCO y se permite su acumulación a nivel del tumor y depuración sanguínea durante 24h. En paso 2, se administra el derivado tetrazina radiomarcado para su reacción con los AcMo-TCO que se encuentran en la superficie de las células tumorales.

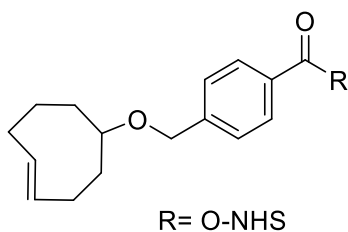


Figura 18. : Derivado TCO de alta reactividad utilizado por Robillard et al.¹³⁸

2.8.1.1 Desarrollos con aplicación en PET

Los resultados alentadores de los trabajos hasta el momento, en combinación con la versatilidad del abordaje en estudio, impulsaron a explorar la reacción con fines de diagnóstico utilizando radionucleidos emisores de positrones, especialmente con aquellos de periodo de semidesintegración corto.

Por ejemplo, el acople del quelante NOTA a un derivado tetrazina (Figura 19), permitió la marcación con cobre-64.¹⁴⁷ En dicho trabajo, como prueba de concepto se utilizó un AcMo (A33) dirigido contra un antígeno altamente expresado en las células SW1222 de cáncer de colon. De esta manera, Lewis et al., describen una estrategia basada en IEDDA para PET, que resultó en imágenes y relaciones tumor/músculo similares a las obtenidas mediante una estrategia de marcación clásica con ⁶⁴Cu o ⁸⁹Zr pero reduciendo la dosis absorbida entre 3 y 34 veces respectivamente.¹⁴⁷

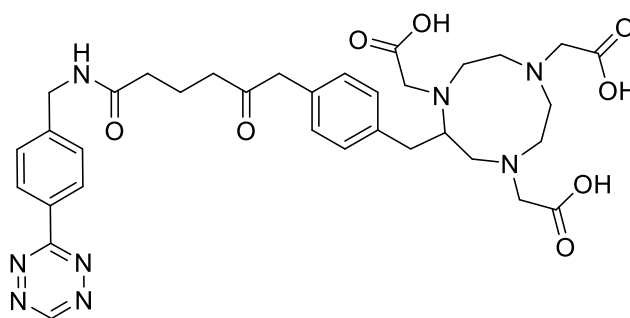


Figura 19. Derivado tetrazina sintetizado por Lewis et al.¹⁴⁷

Por otro lado Weissleder et al., aplicaron la estrategia pre-dirigida para PET mediante el diseño de macromoléculas de dextrano marcadas con ¹⁸F y portadoras de una [1,2,4,5]tetrazina.¹⁴⁸

En los últimos 5 años, en la búsqueda de mejores rendimientos de reacción, una variedad de metodologías radio-sintéticas ha dado como resultado distintas [1,2,4,5]tetrazinas marcadas con ¹¹C y ¹⁸F (Figura 20).¹⁴⁹⁻¹⁵⁵

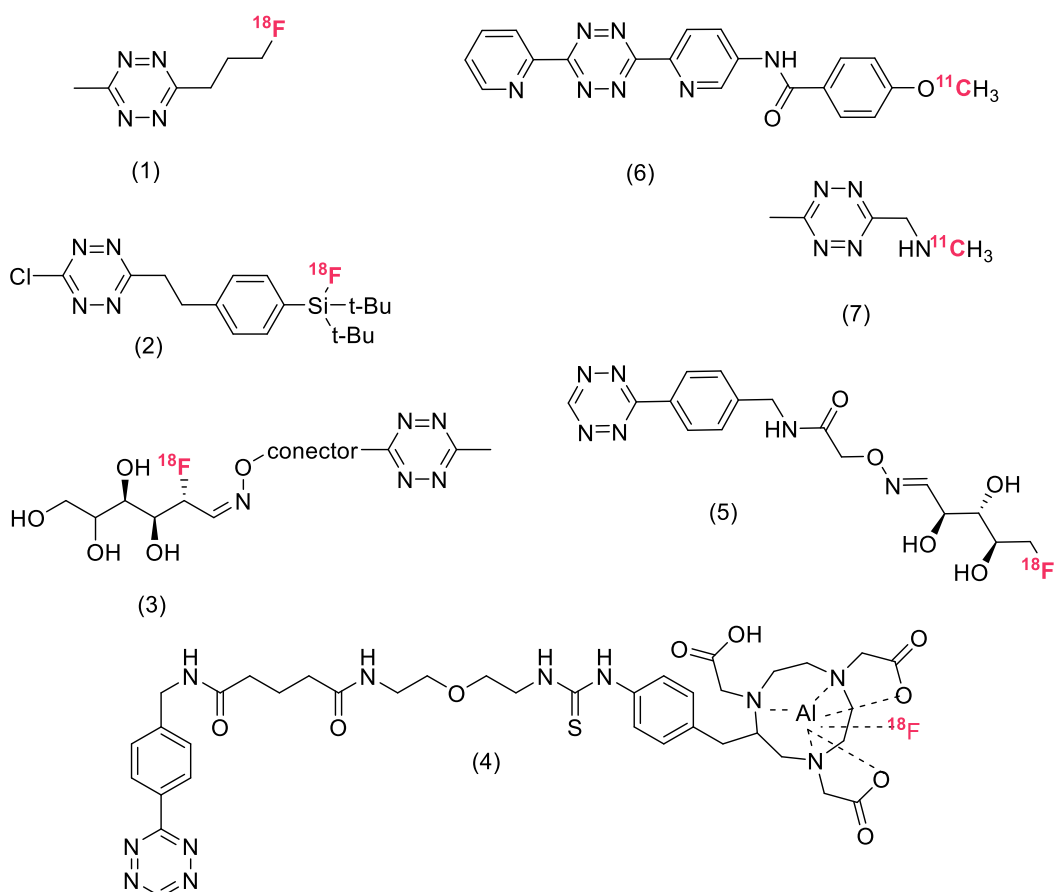


Figura 20. Derivados tetrazina marcados con ^{18}F y ^{11}C . Rendimientos obtenidos: 1 (16%)¹⁵⁴, 2 (78%)¹⁵³, 3 (25%)^{152*}, 4 (56%)¹⁵¹, 5 (50%)¹⁵⁰, 6 (33%)¹⁵⁵, 7 (55%)¹⁴⁹. Los valores de rendimiento son corregidos por decaimiento excepto para 3.

2.8.1.2 Desarrollos con aplicación en SPECT

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el radionucleido más utilizado en medicina nuclear, por lo que algunos grupos se han enfocado en estudiar el potencial de la reacción entre tetrazinas y TCO, como herramienta de marcación para imágenes SPECT.

En base a la experiencia previa de nuestro grupo en la marcación de distintos anticuerpos monoclonales con $^{99\text{m}}\text{Tc}$,¹⁵⁶⁻¹⁶¹ se decide explorar la marcación de anticuerpos de forma pre-dirigida durante la realización de la presente tesis.

En este sentido, algunos trabajos incluyen la formación de complejos de tecnecio utilizando HYNIC.^{162,163} En la Figura 21 se muestra el derivado tetrazina desarrollado posterior al inicio de esta tesis por Valliant et al.¹⁶³ Por otro lado se han usado otros estados de oxidación del Tc, por ejemplo, la marcación a través de complejos de Tc(I) [2+1] a partir de bipyridina e imidazol,¹⁶⁴ mediante la síntesis de un derivado tetrazina

portador de un grupo imidazol (Figura 22).¹³⁶ Otra estrategia alternativa, implica la formación de un complejo de Tc(I) a través de un quelante tridentado basado en imidazol (Figura 22)¹⁶⁵

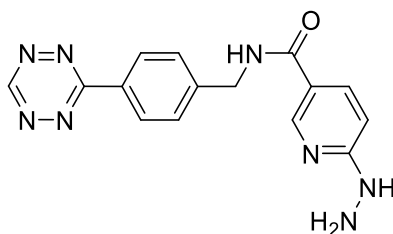


Figura 21. Derivado tetrazina-HYNIC desarrollado por Valliant et al.¹⁶³

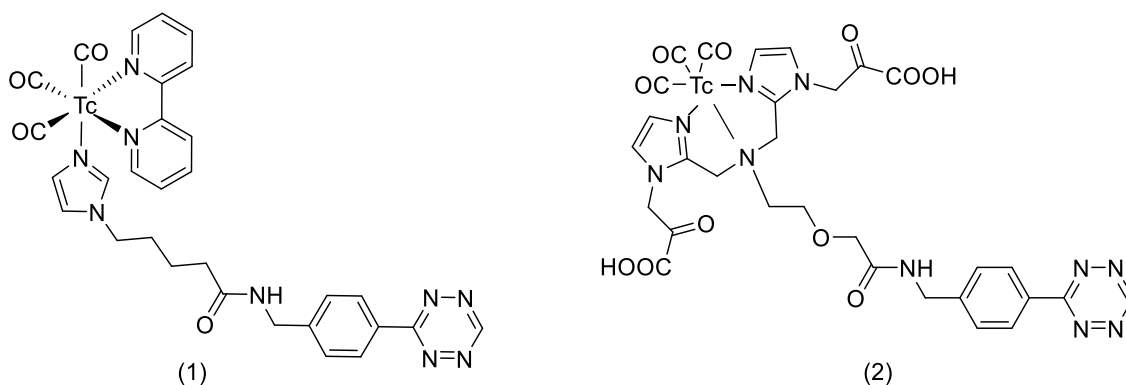


Figura 22. Formación de Complejos de Tc utilizados en reacción via IEDDA. Compuesto (1) complejo de Tc(I) [2+1] a partir de bipyridina e imidazol ¹³⁶ y complejo (2) complejo de Tc(I) a través de un quelante tridentado basado en imidazol.¹⁶⁵

2.8.2 Desarrollo de agentes de terapia

El abordaje de esta estrategia con fines terapéuticos ha sido enfocado principalmente en radioinmunoterapia pre-dirigida (PRIT, del inglés “pretargeted radioimmunotherapy) y en un sistema de la liberación de fármacos activado por IEDDA.^{63,166}

Inicialmente, Rossin and Robillard, demostraron el potencial de la radioinmunoterapia pre-dirigida, mediante la marcación de derivados tetrazina marcados con ¹⁷⁷Lu a través del quelante DOTA, optimización de la reactividad y estabilidad del TCO y el uso de una estrategia de marcación en tres pasos, que incluye la administración de un agente

secuestrante.^{138,167-169} El primer trabajo en valorar la eficacia de la PRIT fue realizado por Zeglis et al., que describen el primer estudio longitudinal en un modelo de cáncer de páncreas murino. Para ello utilizaron un AcMo anti CA19.9 y un derivado tetrazina marcado con ¹⁷⁷Lu, observando un efecto terapéutico dependiente de la dosis inyectada de tetrazina radiomarcada.¹⁷⁰

Recientemente Quinn et al., evaluaron el efecto terapéutico de la estrategia radioinmunoterapia pre-dirigida, utilizando ²¹²Pb, un radioisótopo emisor de partículas α . En dicho estudio, grupos que recibieron PRIT resultaron en disminución del crecimiento del tumor y efectos citotóxicos, así como también un aumento de sobrevida, en comparación con los grupos control y con el grupo que recibió el radioinmunoconjugado previamente marcado.¹⁷¹

3 Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto consiste en desarrollar una estrategia de marcación de biomoléculas con ^{99m}Tc *in vivo*.

En este sentido, se estudiará la reacción bio-ortogonal entre [1,2,4,5]tetrazinas y *trans*-cicloocteno, como estrategia de marcación de biomoléculas, utilizando el radionucleido tecnecio-99m previamente incorporado a uno de los reactivos, [1,2,4,5]tetrazina.

Se planteará el desarrollo de derivados de [1,2,4,5]tetrazina adecuadamente sustituidos para su marcación con ^{99m}Tc y posterior evaluación de la reacción bio-ortogonal *in vivo*. En este sentido se aplicará el enfoque pre-dirigido en la marcación *in vivo* de biomoléculas específicamente dirigidas a blancos moleculares

Por último se aspira evaluar el potencial de la estrategia desarrollada en el diagnóstico de cáncer.

4 Capítulo I

4.1 Objetivos específicos

- 1- Estudio de la reacción bio-ortogonal entre derivados de [1,2,4,5]tetrazina y *trans*-cicloocteno en la superficie de bacteriófagos presentadores de péptidos en entornos biológicos de complejidad creciente.
- 2- Evaluar el uso de los bacteriófagos como agentes de imagen mediante un abordaje pre-dirigido.
- 3- Diseño y síntesis de un derivado de [1,2,4,5]tetrazina para su marcación con ^{99m}Tc y su aplicación en la marcación de bacteriófagos presentadores de péptidos mediante un abordaje pre-dirigido.

4.2 Antecedentes y Fundamentos

Esta tesis doctoral se ha enfocado en el estudio de la reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazina y *trans*-cicloocteno (TCO) en la superficie de biomoléculas.

Como prueba de concepto, la biomolécula en estudio consistió en un bacteriófago filamentoso presentador de péptidos, seleccionado frente a Galectina-3 inmovilizada, a partir de una biblioteca de “phage display” (f88-Cys6) por el grupo de la Prof. Susan Deustcher de la Universidad de Missouri.¹⁷² El bacteriófago elegido, G3-C12, reconoce Galectina-3, una proteína de 30 KDa que presenta un dominio de reconocimiento y de unión a carbohidratos. Así, el clon G3-C12 expresa una secuencia peptídica que reconoce específicamente Galectina-3 con una afinidad de 70 nM.¹⁷²

Como primera aproximación a las reacciones bio-ortogonales, inicialmente se trabajó con derivados comerciales de [1,2,4,5]tetrazinas portadores de fluoróforos y con un derivado de TCO portador de un grupo cromóforo. La estrategia de marcación pre-dirigida se planteó en base a los antecedentes disponibles en el comienzo del trabajo.^{137,173} Así, se propuso utilizar el TCO como primer etiqueta bio-ortogonal y el derivado tetrazina como segunda etiqueta bio-ortogonal.

El sistema de estudio planteado, se seleccionó en base a:

- 1) El clon de G3-C12, se puede describir como una macromolécula que expresa en su superficie un estimado de 100-150 copias de secuencias peptídicas por virión, fusionadas a la proteína de la cápside VIII (cpVIII). La cápside del fago, que contiene unas 3900 cpVIII, representan una gran superficie de aminoácidos. Se planteó la hipótesis de que al tratarse de una macromolécula, la conjugación del fago con la primera etiqueta bio-ortogonal no debería afectar el reconocimiento del mismo. Además, permitiría incorporar un mayor número de etiquetas por virión.
- 2) Galectina 3 se expresa en una variedad de cánceres, y su expresión se correlaciona con procesos de transformación neoplásica y metástasis. Además, según el ligando, puede hallarse asociada a membrana o en el interior celular.¹⁷⁴
- 3) Existencia de antecedentes del uso de bacteriófagos seleccionados por “phage display” como herramientas de imagen.¹⁷⁵ Así, como el uso de la secuencia peptídica obtenida del clon G3-C12, como agente de imagen SPECT en un modelo murino de cáncer de mama.¹⁷⁶

4.3 Resultados

4.3.1 Propagación, purificación y cuantificación del fago G3-C12

Inicialmente, el trabajo se enfocó en generar un stock de partículas. Para ello se procedió a propagar el clon con reconocimiento específico por galectina-3 (G3-C12) y el vector de expresión f88-fd, el cual se utiliza a lo largo de este capítulo como biomolécula control por carecer de una secuencia peptídica en su superficie.

Ambos clones se propagaron mediante infección de la cepa *E. coli* K91BluKan. El proceso de purificación de los fagos propagados incluyó una primera etapa de precipitación con polietilenglicol, seguido de sucesivas etapas de ultra-centrifugación. Finalmente, los preparados fueron dializados en PBS a través de 3 ciclos de 24 horas y cuantificados mediante espectrofotometría (269 nm), resultando en un stock de 7.7×10^{13} V/mL¹ de G3-C12 y 1.71×10^{14} V/mL de f88-fd. La disolución de G3-C12 obtenida presentó una concentración 5.85×10^{12} UI/mL² durante el procedimiento de titulación. La secuencia de ADN correspondiente al péptido expresado en la superficie del fago fue determinada por secuenciamiento de ADN en el “ADN core” de la Universidad de Missouri. Dicho análisis confirmó la secuencia peptídica ANTPCGPYTHDCPVKR correspondiente a la secuencia identificada previamente para G3-C12.¹⁷⁷

4.3.2 Conjugación de bacteriófagos con NHS-TCO (UV-tracer™)

Inicialmente se estudió la conjugación del grupo bio-ortogonal trans-cicloocteno al fago a través de los grupos amino terminal presentes en la proteína de la cápside cpVIII. Para ello se utilizó un derivado de TCO, disponible comercialmente, que porta un cromóforo y está activado con un agrupamiento *N*-hidroxisuccimidilo NHS-TCO (UV-tracer™, Figura 23). Dicho reactivo permitió cuantificar el número de TCO incorporados por molécula de fago, expresados como el porcentaje de cpVIII conjugada. Las condiciones de conjugación estudiadas se presentan en la tabla 2. Las reacciones de conjugación incluyeron excesos molares, 330:1, 1000:1, 4000:1 (NHS-TCO UV-tracer™:mol partículas virales). Los tiempos de reacción ensayados fueron de 2 h para las reacciones con excesos molares de 330 y 1000, mientras que tiempos de 15 y 30 min fueron

¹ V/mL: viriones por mL.

² UI/mL: unidades infectivas/mL

estudiados cuando se utilizó una relación molar de 4000. Así, cuando se utilizó un exceso molar de 1000 veces de TCO y se incubó 2 h a temperatura ambiente, se obtuvo el mayor nivel de conjugación de unos 700 grupos de TCO/virión.

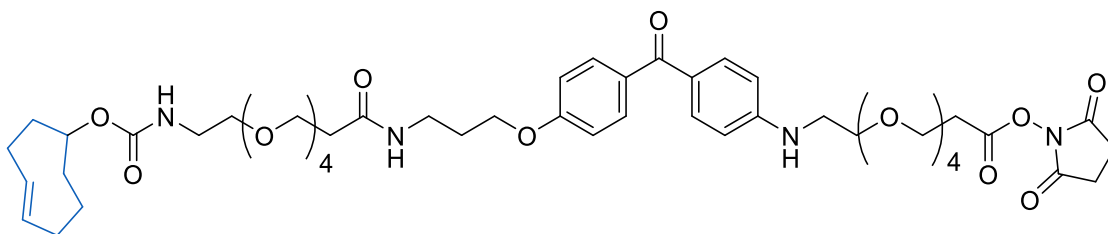


Figura 23. Derivado TCO utilizado en la conjugación de los bacteriófagos.

Tabla 2. Condiciones de conjugación estudiadas.

| Condición de conjugación | Etiqueta | Bacteriófago conjugado | Exceso molar TCO/fago | Tiempo de reacción (min) | % de proteína cpVIII conjugada | N° TCO /virión |
|--------------------------|----------|------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------|
| 1 | Stock 1 | G3-C12 | 1000:1 | 120 | 19% | 700 |
| 1 | Stock 1 | f88-fd | 1000:1 | 120 | 19% | 680 |
| 2 | Stock 2 | G3-C12 | 330:1 | 120 | 11% | 430 |
| 2 | Stock 2 | f88-fd | 330:1 | 120 | 7% | 270 |
| 3 | Stock 3 | G3-C12 | 4000:1 | 15 | 8% | 310 |
| 3 | Stock 3 | f88-fd | 4000:1 | 15 | 6% | 230 |
| 4 | Stock 4 | G3-C12 | 4000:1 | 30 | 9% | 350 |
| 4 | Stock 4 | f88-fd | 4000:1 | 30 | 8% | 300 |

4.3.3 Estudio de la reacción bio-ortogonal *in vitro*

Seguidamente se procedió a verificar la reacción de cicloadición en la superficie del fago, utilizando un derivado tetrazina portador del fluoróforo Cy3 (Tz-Cy3, Figura 24). Para ello, se trabaja con los conjugados obtenidos en las condiciones 1 y 2 (Tabla 2).

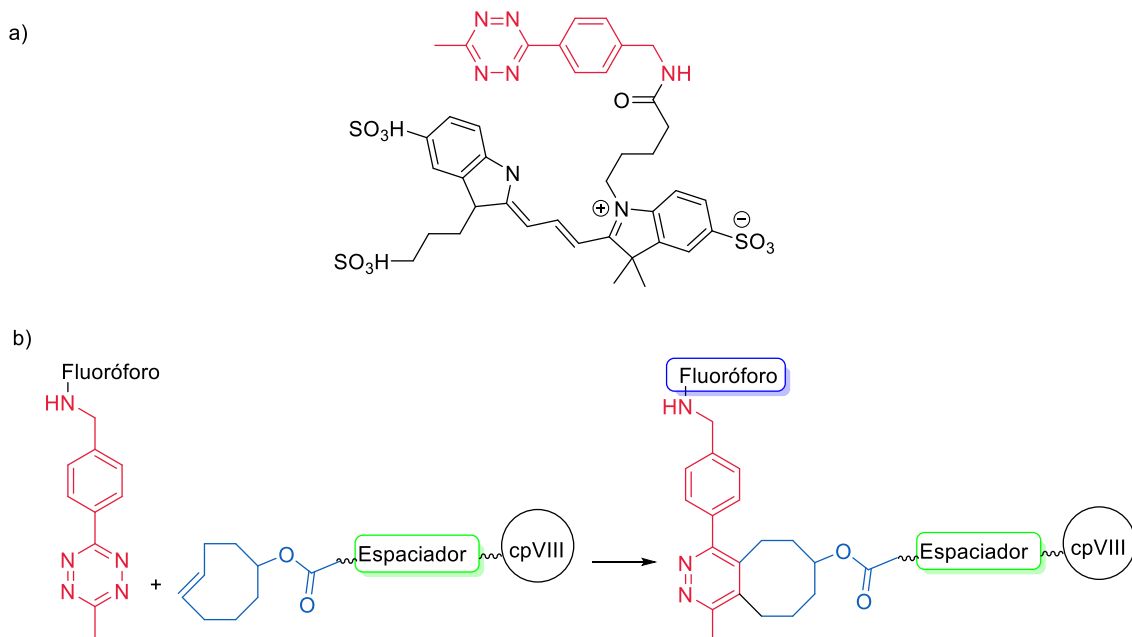


Figura 24. a) derivado tetrazina portador del fluoróforo Cy3 utilizado. b) Reacción de cicloadición en la superficie de los bacteriófagos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 25. En primer lugar, la señal de fluorescencia observada únicamente en los fagos conjugados con TCO, demuestra la reacción de cicloadición entre los grupos TCO presentes en la superficie de los bacteriófagos y el derivado Tz-Cy3, y no debido a una adsorción inespecífica de la Tz-Cy3 en la superficie de los mismos. En segundo lugar, se observó que la marcación es dependiente del grado de conjugación del mismo, es decir, a mayor número de TCO por virión, mayor es la intensidad de fluorescencia observada. En tercer lugar, el sistema de purificación utilizado para remover el derivado tetrazina no reaccionante, fue eficiente, tal y como se observa en las bajas señales de fluorescencia presentadas en el control con PBS, como en los fagos sin conjugados con TCO.

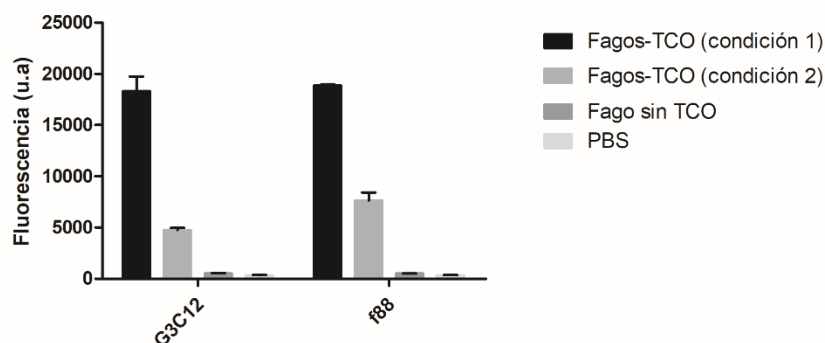


Figura 25. Reacción de cicloadición *in vitro* en la superficie de los bacteriófagos. G3C12 y f88-fd conjugados con TCO (condición de conjugación 1 y 2) y sin TCO reaccionan con derivado Tz-Cy3. La intensidad de fluorescencia es determinada posterior al sistema de purificación.

Seguidamente a la confirmación de la reacción *in vitro* en la superficie del fago, se decide explorar la reacción de cicloadición inmovilizando G3-C12-TCO en un ensayo de tipo ELISA; y así evaluar la relación molar de Tz-Cy3 necesaria para saturar los grupos de TCO reactivos presentes en la superficie del fago. Un anticuerpo anti-fago adsorbido en una placa de ELISA de 96 pocillos, permitió capturar el G3-C12-TCO (19 % cpVIII conjugada), para que quede disponible para reaccionar con el derivado Tz-Cy3. Como se muestra en la figura 26, se observa un aumento de la señal fluorescente asociada a un aumento de la concentración de Tz-Cy3, alcanzando la saturación a partir de un exceso molar de 50:1. Lo que sugiere que posiblemente no todos los TCO incorporados están expuestos o reactivos para reaccionar con la segunda etiqueta bio-ortogonal. Además, este experimento brindó evidencia de que los grupos de TCO permanecen reactivos cuando se los expone a la presencia de seroalbúmina bovina (BSA) 5 % durante al menos 2h.

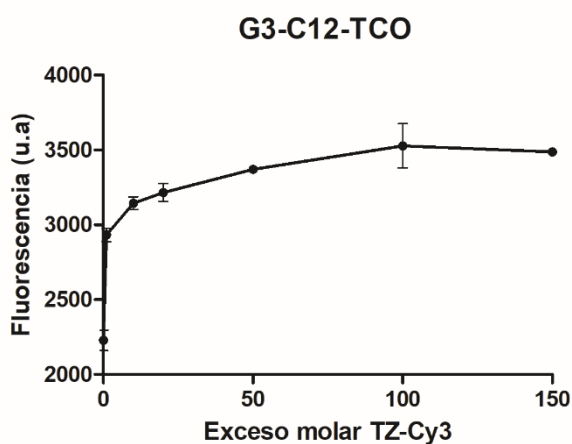


Figura 26. Estudio de la reacción de cicloadición sobre fago-TCO inmovilizado.

El siguiente paso, consistió en estudiar la reacción de cicloadición *in vitro* para aproximarse a la estrategia pre-dirigida. Con esto en mente, se realizó un ensayo tipo ELISA inmovilizando galectina-3, y permitiendo en un paso posterior el reconocimiento específico de G3-C12-TCO a través de las secuencias peptídicas expresadas en el mismo. Así, se estudió la unión de los fagos conjugados en las condiciones 1 (mayor grado de conjugación) y 3 (menor grado de conjugación) de la tabla 2. Finalmente, la adición del derivado Tz-Cy3, permitió evaluar la estrategia de marcación con sonda fluorescente a través de medidas de fluorescencia. Los resultados obtenidos, revelaron marcación inespecífica cuando se utilizaron concentraciones de fago superiores a 1×10^8 V/mL y/o conjugados con elevada proporción de TCO. Una diferencia significativa se observó entre G3-C12-TCO y f88-fd-TCO cuando se utilizó una concentración de fagos de 1×10^8 V/mL y el stock de fagos con un 8% de cpVIII conjugada a TCO en la superficie (Figura 27).

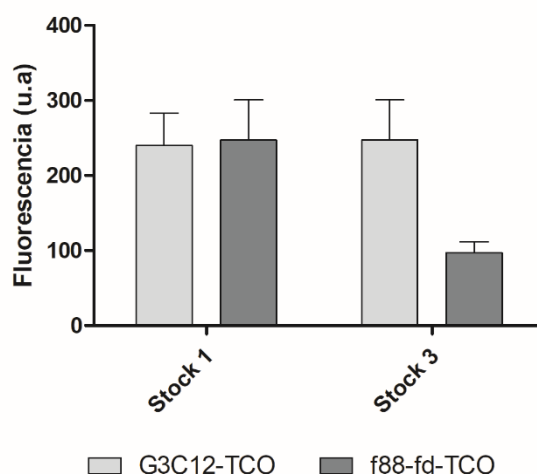


Figura 27. Ensayo de elisa frente a galectina-3. Stock 1 y 3 de G3-C12 (19% y 8 % de cpVIII conjugada a TCO, respectivamente). Stock 1 y 3 de f88-fd (19% y 6 % de cpVIII conjugada a TCO, respectivamente).

4.3.4 Estudio de la reacción bio-ortogonal *in vitro* en cultivo celular

Con el objetivo de estudiar la cicloadición en un cultivo celular, se determinó la expresión de galectina-3 en distintas líneas celulares. Para ello se realizó la extracción de proteínas totales de las líneas celulares de cáncer humanas BT474, MDA-MB-468, MDA-MB-435, BT-549sense, BT-549parent, y las líneas celulares de cáncer murino B16-F10 y B16-F1. Debido al nivel de expresión de galectina-3 observado en dichas líneas (Figura 28), es que se decide evaluar la reacción bio-ortogonal en la línea MDA-MB-435.

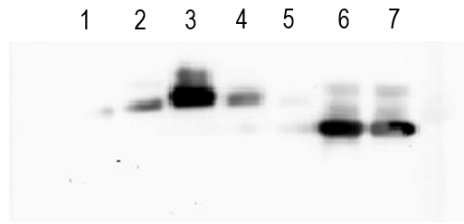


Figura 28. Expresión de galectina-3 en distintas líneas celulares mediante Western Blot. Del carril 1-5 extractos proteicos de las líneas celulares humanas BT474, MDA-MB-468, MDA-MB-435, BT-549sense, BT-549parent, respectivamente, y del 6-7 las líneas celulares de cáncer murino B16-F10 y B16-F1.

Mediante microscopía confocal, se estudió el potencial de G3-C12 como agente de imagen (Figura 29). Dos modalidades de marcación fueron evaluadas sobre células vivas. En Figura 27 A) se realizó una marcación previa de G3-C12-TCO con Tz-Cy3 y posterior incubación con el cultivo celular durante 1 h. En Figura 29 B) se utilizó una estrategia pre-dirigida, los fagos-TCO fueron incubados 1 h y luego de eliminar aquellos que no permanecen interaccionando con las células, se realiza la reacción bio-ortogonal con Tz-Cy3. En las condiciones utilizadas el derivado Tz-Cy3 mostró baja unión inespecífica, tal y como se observa en la figura 29 C). Cuando se utilizaron los fagos previamente marcados con Cy3 (panel A) se observó una marcación celular homogénea tanto cuando se utilizó G3-C12 como en f88-fd, lo que sugiere un marcado inespecífico. Cuando se utilizó la estrategia pre-dirigida, se observó una marcación que sugiere estar asociada a la presencia de G3C12-TCO a nivel celular, ya que si bien se observa una marcación cuando se utiliza f88-fd, es notablemente menor. En otras condiciones estudiadas, por ejemplo con células fijadas en una primer etapa, se observa una retención inespecífica de los bacteriófagos (resultados no mostrados).

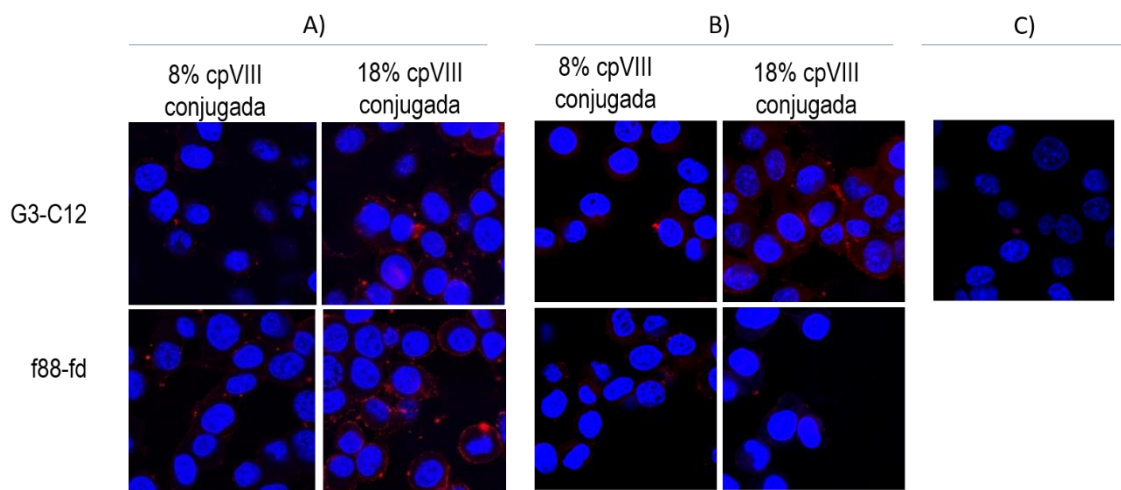


Figura 29. Microscopía confocal de células MDA-MB-435. A) Células incubadas con fagos-TCO-TZ-Cy3, en el panel superior se observa G3-C12 y en el panel inferior f88-fd. B) Fagos-TCO son incubados en una primera etapa, seguido de una incubación con TZ-Cy3, en el panel superior se observa G3-C12 y en el panel inferior f88-fd. C) G3-C12. En rojo -TZ-Cy3 y en azul DAPI (para teñir núcleos).

Estos resultados, sugirieron un modesto reconocimiento de los bacteriófagos dirigidos específicamente por diana biológica en las condiciones evaluadas.

Por ello se plantearon que tres aspectos podían estar influyendo negativamente:

- 1) Un grado de conjugación alto podría estar alterando el reconocimiento de la secuencia peptídica. Considerando que el péptido expresado contiene una lisina, una de las hipótesis supuso que altas relaciones molares podían llevar a la conjugación del TCO a través del grupo amino presente en la lisina del péptido y como consecuencia perder reconocimiento por su blanco molecular.
- 2) La extensión de la cadena del NHS-TCO (UV-tracer™) (Figura 21) podría estar enmascarando o interfiriendo con las secuencias peptídicas, impidiendo la interacción con el blanco molecular.
- 3) La estrategia de marcación con una sonda fluorescente, TZ-Cy3, no tiene sensibilidad suficiente desde el punto de vista imagenológico.

Estas hipótesis nos condujeron a estudiar un derivado TCO sin espaciador hidrofílico y sin cromóforo UV (NHS-TCO). Además, se estudió la conjugación utilizando un exceso molar de NHS-TCO por virión de 5:1, 15:1 y 30:1. Una vez obtenidos los conjugados, se procedió a evaluar la reacción de cicloadición en la superficie de los bacteriófagos,

utilizando el mismo derivado tetrazina pero, en esta oportunidad, conjugado al fluoróforo Cy5.

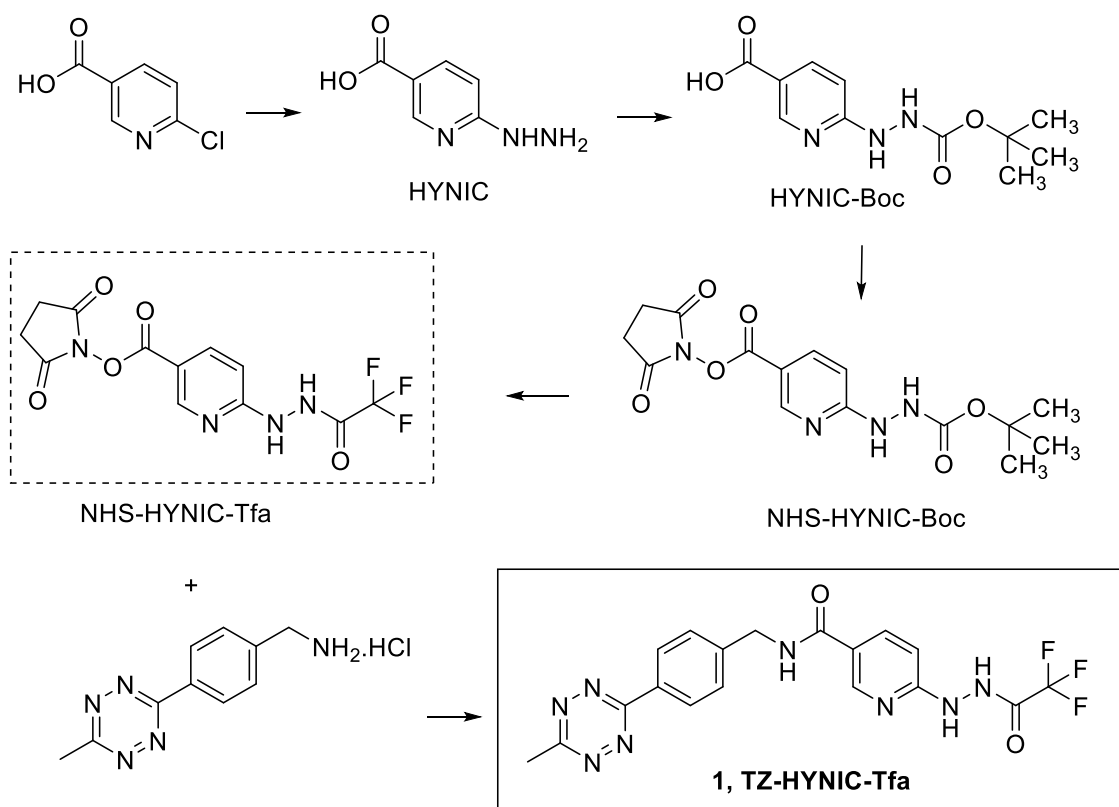
Seguidamente, se procedió a estudiar la reacción en un ensayo de ELISA inmovilizando Galectina-3. Sin embargo, no fue posible observar la marcación específica de G3-C12-TCO, presentando una marcación inespecífica o una alta señal de fondo. En este sentido, con el fin de hallar las condiciones adecuadas, se estudiaron: distintas disoluciones de boqueo (BSA 5 %, albúmina humana 5 %, PBS-tween (0.1 %), buffer de bloqueo Rockland, leche libre de grasa al 5 %, medio de cultivo celular y gelatina de pescado); distintos ciclos de lavados utilizando PBS-tween 0.1% o buffer Tris. Sin embargo, no fue posible optimizar el ensayo.

4.3.5 Síntesis de derivado tetrazina portador de agente quelante para marcación con ^{99m}Tc

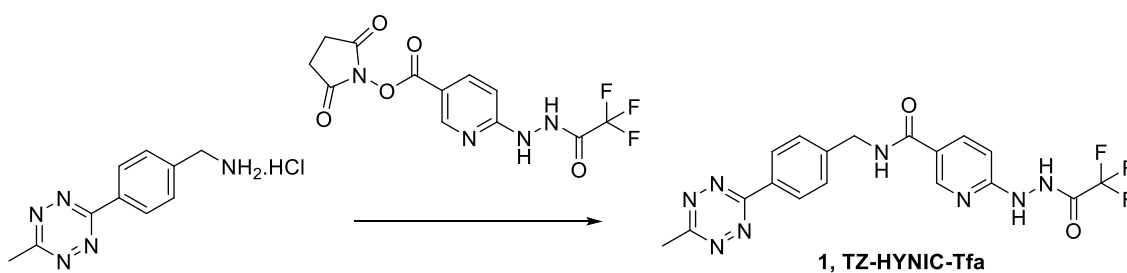
En el supuesto que la sensibilidad en la imagen del procedimiento por fluorescencia fuese el responsable de los resultados negativos, el siguiente paso consistió en desarrollar un derivado tetrazina portador de un agrupamiento quelante de ^{99m}Tc . El mismo se diseñó pensando en la reacción del bifuncional HYNIC con un derivado de [1,2,4,5]tetrazina.

4.3.5.1 Síntesis de derivado tetrazina-HYNIC.

La metodología sintética propuesta para la síntesis del primer derivado de [1,2,4,5]tetrazina portador del ligando hidrazinopiridinilo se presenta en el esquema 14. Para ello, inicialmente se trabajó en la síntesis de un derivado de HYNIC activado y con la función hidracina protegida con un grupo trifluoroacetilo.^{156,162} Posteriormente, a través de una reacción de amidación utilizando una bencilamina derivada de una [1,2,4,5]tetrazina 3-metil-sustituída, de origen comercial, se obtuvo el compuesto **1**. Las condiciones de reacción estudiadas y los resultados obtenidos para la amidación se muestran en la Tabla 3. La baja solubilidad de los reactivos, llevó al uso de mezclas de disolventes. Dos aminas terciarias fueron estudiadas para desprotonar el hidrocloreuro, a saber trietilamina (Et_3N) y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Las dos mejores condiciones de reacción, fueron aquellas en las que se utilizó DIPEA y se purificó el producto final mediante cromatografía utilizando alúmina como fase estacionaria y $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5) como fase móvil (evitando el reparto previo de la mezcla de reacción con fase acuosa).



Esquema 14. Ruta sintética realizada para la obtención del derivado **1**.



| | Reactivos ^a | Condiciones ^b | Purificación | Rendimiento (%) ^c |
|----------|---|--|---|-------------------------------------|
| 1 | Metil-TZ-NH ₂ (20 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.1 eq), DIPEA (1.1 eq). | THF/CH ₂ Cl ₂ (1:1), 24 h, T _{amb} + 10 h 75°C. | Cromatografía en alúmina y CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5) | 19% |
| 2 | Metil-TZ-NH ₂ (15 mg, 1 eq), NHS-HYNIC- | THF/DMF (4:1), 24 h, T _{amb} | Extracciones H ₂ O/ AcOEt | Mezcla |

| | | | | |
|----------|--|--|--|------------|
| | Tfa (1.1 eq), DIPEA (1.1 eq). | | | |
| 3 | Metil-TZ-NH ₂ (20 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.2 eq), Et ₃ N (1.5 eq). | THF/DMF (4:1), 48 h, T _{amb} | Extracciones H ₂ O/ AcOEt, seguido de cromatografía en alúmina y CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5) | 3% |
| 4 | Metil-TZ-NH ₂ (20 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.2 eq), DIPEA (2 eq). | THF/DMF (4:1), 24 h, T _{amb} | Cromatografía en capa fina en alúmina y CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5) | 27% |

Tabla 3. Condiciones estudiados para la obtención de TZ-HYNIC-Tfa (**1**). En la tabla se muestra la relación molar de los reactivos y condiciones de calentamiento. ^a hidrocloreuro de 4-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)metanamina; Metil-TZ-NH₂. ^b todas las condiciones se llevaron a cabo en atmósfera de N₂ (g). ^c El rendimiento obtenido luego del procesamiento de reacción y purificación del producto.

La elucidación del producto obtenido se realizó mediante experimentos de ¹H RMN, COSY, HSQC, HMBC, ¹³C RMN y espectrometría de masas (EM). En la figura 30, se observa el espectro de ¹H RMN.

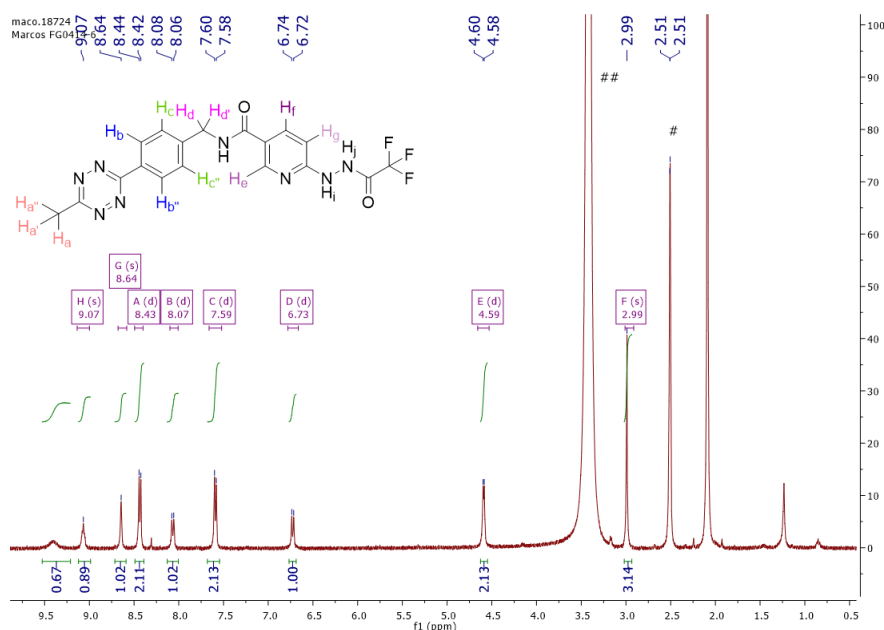


Figura 30. Espectro de ¹H-RMN en DMSO-d₆ del compuesto **1**, procesado con software MestReNova. # y ## corresponden al disolvente no deuterado y agua respectivamente.

A continuación y a modo de ejemplo se describirán las señales que condujeron a la elucidación estructural de **1**. Analizando la figura 30, las señales que aparecen a mayor

desplazamiento químico (resonancia a campos magnéticos menores), señal ancha a 9.40 ppm y señal a 8.41 corresponden a H intercambiables, posiblemente al protón del NH de la hidracina y al protón del NH de la amida. Las señales que siguen con mayor desplazamiento químico se corresponden con señales de grupos aromáticos. Así, en dicha región es posible distinguir los 3 protones del anillo de piridina H_e , H_f y H_g que aparecen a 8.49, 7.91 y 6.75 ppm respectivamente, y las señales correspondiente a 4 protones del grupo bencilo $H_b:H_b'$ y $H_c:H_c'$ (área de integración = 2) que aparecen como dobletes a 8.43 y 7.58 ppm respectivamente. En el caso del anillo de piridina, el protón H_e en posición 2 del anillo, resulta en el protón más desblindado (desplazamiento mayor). Esto se debe principalmente al efecto resonante aceptor del N, que resulta en una deficiencia de electrones en las posiciones 2, 4 y 6 del anillo y al efecto aceptor por efecto resonante e inductivo que presenta el grupo amida. De forma opuesta, el H_g en la posición 5 del anillo, se encuentra bajo el efecto donador por resonancia del grupo hidrazina, lo que resulta en la posición con mayor blindaje, siendo ese protón el de menor desplazamiento. La multiplicidad observada en H_g y H_f son del tipo doblete, como es de esperar en el acople de protones vecinos. Por otro lado, las intensidades de las dos señales de dobletes 8.43 y 7.58 ppm correspondientes con los protones bencílicos $H_b:H_b'$ y $H_c:H_c'$, presentando cada señal un área de integración que equivale a 2 H. Las constantes de acoplamiento de $H_b:H_b'$ y $H_c:H_c'$ tienen los valores de 8.4 y 7.6 Hz, respectivamente, lo que indica un sistema aromático con sustitución 1,4 (sistema *para*-disustituido). Continuando con el análisis, la señal que sigue a menores desplazamiento 4.59 ppm en forma de doblete (integración = 2 H) corresponde a los hidrógenos bencílicos que se acoplan con el NH del agrupamiento amida. Por otra parte, la señal en forma de singulete a 2.99 ppm (integración = 3 H) corresponde a los hidrógenos del sustituyente metilo de la tetrazina.

El experimento de HSQC permite observar la correlación de cada tipo de protón con su correspondiente carbono en la molécula (correlación H-C a un enlace de distancia). En el espectro (Figura 31), se observan las señales de los C 1, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14 y 16 a valores de δ de 21.0, 127.8, 128.4, 42.5, 137.4, 106.5 y 147.7 ppm, respectivamente. Por otra parte, el espectro HMBC (correlación H-C a más de un enlace) permitió identificar las señales de C que no se encuentran unidos a un enlace con átomos de hidrógeno (Figura 32). A modo de ejemplo, las señales que corresponden a los carbonos de la tetrazina, a 130.5 y 167.5 ppm, se determinan a través de los acoplos con $H_b:H_b'$ y H_a respectivamente.

La caracterización mediante ^{13}C RMN del producto **1**, permitió observar un acoplamiento heteronuclear a un enlace ($\text{F}_3\text{-C-}$) entre ^{13}C y los átomos de ^{19}F del grupo trifluoroacetilo (Figura 33). Así, es posible visualizar una señal como cuarteto a 113 ppm con una constante de acoplamiento, J , de 297 Hz (acoplamiento a un enlace) similar a lo observado en trabajos previos.¹⁷⁸ Este acoplamiento se explica, debido a que el flúor natural, ^{19}F , presenta una abundancia isotópica del 100 %. Así, con un número cuántico de espín $I = \frac{1}{2}$ produce acoplamiento con el ^{13}C . De esta forma, es posible verificar la presencia de flúor en la molécula mediante la RMN de Carbono-13.

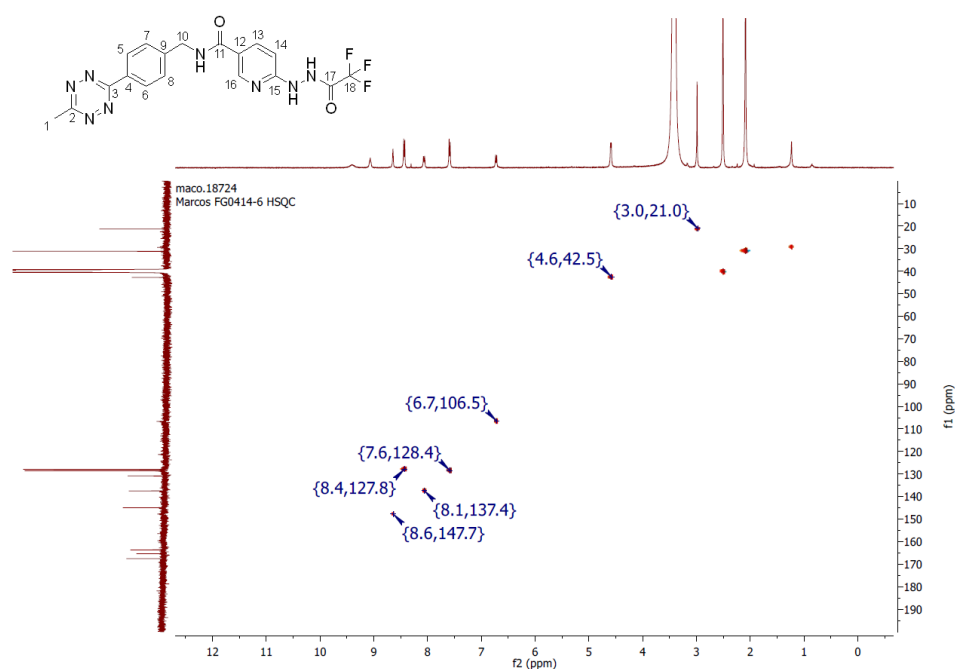


Figura 31. Experimento heteronuclear HSQC para compuesto **1** en DMSO-d₆.

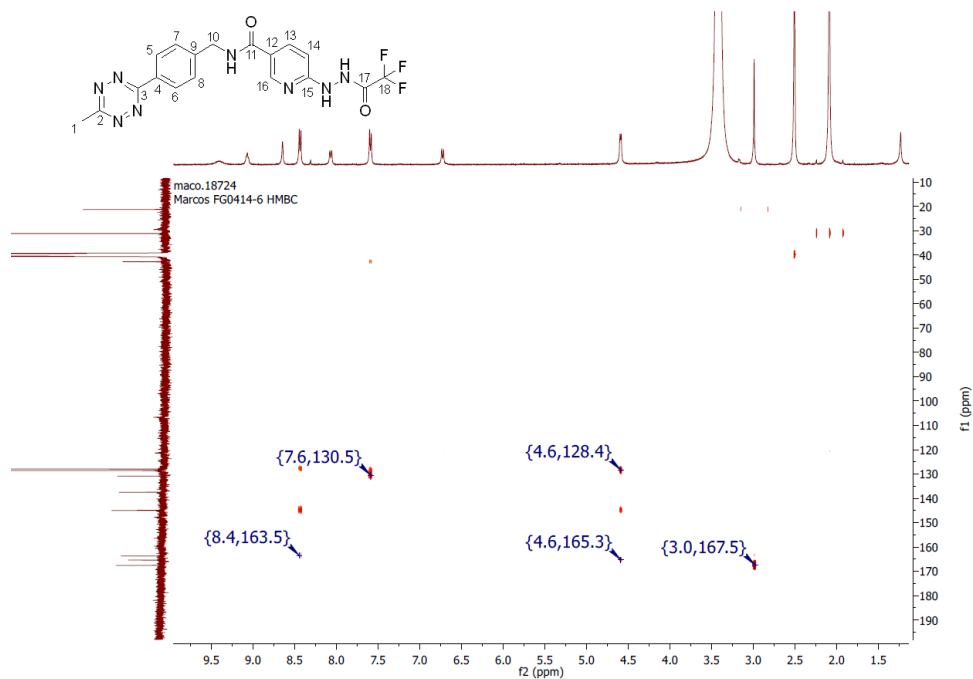


Figura 32. Experimento heteronuclear HMBC para compuesto **1** en DMSO-d₆.

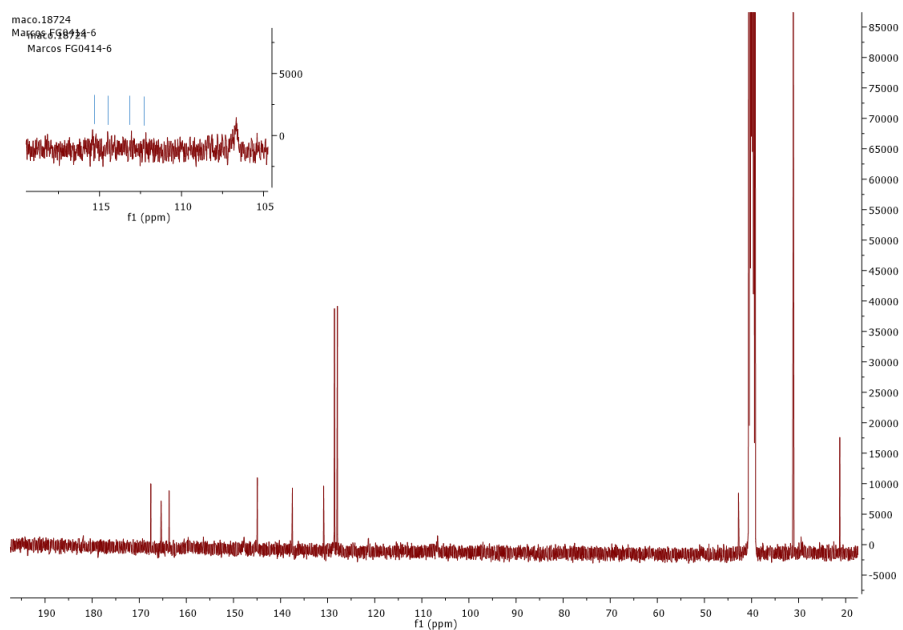


Figura 33. Espectro de ¹³C-RMN en DMSO-d₆ del compuesto **1**. Insertado a la izquierda y arriba: se observa la región del espectro que confirma la presencia de átomos de F en la molécula.

Finalmente, en el experimento de espectrometría de masas con el método de ionización por Electrospray (IES-EM) se observó un fragmento de relación m/z de 433.12 que corresponde al ión molecular protonado $(M+H)^+$ (Figura 34).

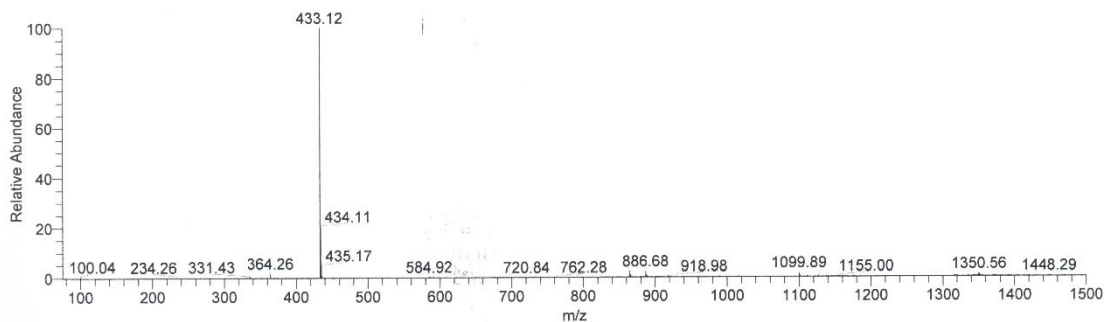


Figura 34. Espectro de masas (IES) del compuesto **1**.

4.3.6 Marcación con ^{99m}Tc

La marcación del compuesto **1** con ^{99m}Tc se realizó utilizando SnCl_2 como agente reductor y tricina como coligando.^{28,34} Distintas condiciones de marcación fueron estudiadas para alcanzar rendimientos de marcación elevados, las mismas se presentan en la tabla 4. En todas las condiciones ensayadas se observó una pureza radioquímica (PRQ) mayor del 90 %. Tanto a 25 °C como a 37 °C se obtuvieron marcaciones superiores al 95 %, sin embargo la temperatura de 37 °C, permitió tiempos de reacción menores. En la figura 35 se presenta el perfil de HPLC observado para la marcación del compuesto.

Durante el proceso de marcación el grupo protector trifluoroacetilo se pierde,⁵⁸ lo que permite dejar disponible el agrupamiento hidracina para la coordinación con el radiometal. Siendo el producto final radiomarcado un derivado de **1** desprotegido (**1d**).

Tabla 4. Efecto de la temperatura y tiempo de reacción en la eficiencia de la marcación del compuesto **1**, utilizando tricina como coligando (n=4). ^a PRQ: pureza radioquímica

| Temperatura (°C) | Tiempo de reacción (min) | % PRQ ^a |
|------------------|--------------------------|--------------------|
| 25 | 60 | 97 ± 2 |
| 25 | 30 | 92 ± 1 |
| 37 | 30 | 97 ± 2 |
| 37 | 15 | 96 ± 1 |

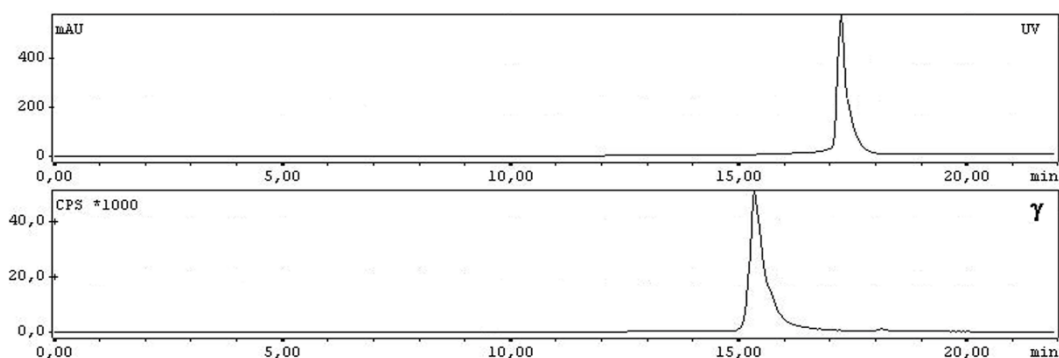


Figura 35. Análisis de HPLC de fase reversa de la reacción de marcación con ^{99m}Tc del compuesto **1** utilizando tricina como coligando. Se muestra, arriba la detección a 280 nm (tiempo de retención 17.3 min) y abajo la detección gamma (tiempo de retención 15.3 min).

4.3.7 Reacción bio-ortogonal *in vitro* utilizando $1\text{d-}^{99m}\text{Tc}$

Una vez obtenido el derivado tetrazina radiomarcado con ^{99m}Tc , el siguiente paso consistió en evaluar la reacción de cicloadición en la superficie del fago. Para ello, se realizó un experimento tipo “Dot-Blot”, en el cual inicialmente el fago es adsorbido en una membrana de Polivinildifluoruro (PVDF) y en una segunda etapa es incubado con una disolución de $1\text{d-}^{99m}\text{Tc}$ de forma de reaccionar con los TCO presentes en la superficie de los fagos. Así, se estudió la cicloadición sobre G3-C12-TCO y se utilizó G3-C12 no conjugado como control negativo de la reacción. Finalmente, luego de eliminar el exceso de radiomarcado que no reacciona, se adquiere una imagen de la membrana. En la figura 36 es posible confirmar el éxito de la reacción bio-ortogonal con el derivado [1,2,4,5]tetrazina portador del quelante HYNIC marcado con ^{99m}Tc , mediante la reacción con los fagos conjugados con TCO. Además, no se observa marcación inespecífica del fago sin conjugar.

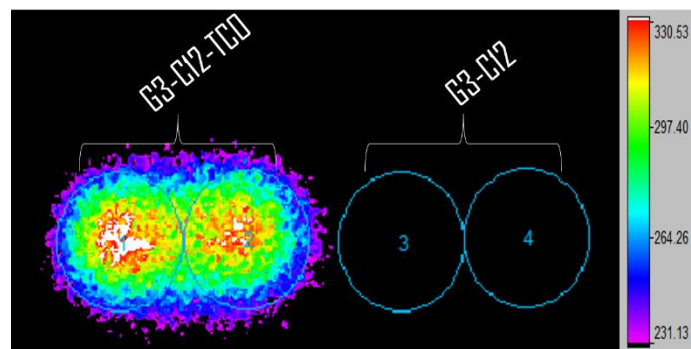


Figura 36. Estudio de la reacción bio-ortogonal con el derivado $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$, en la superficie de G3-C12 mediante ensayo de Dot-Blot.

4.3.8 Reacción bio-ortogonal *in vitro* en cultivo celular utilizando $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$

El siguiente paso, consistió en estudiar la reacción bio-ortogonal con el derivado radiomarcado, a nivel de un cultivo celular. Para ello, al igual que previamente, se utilizó la línea celular MDA-MB-435. Con el fin de aproximarse a una estrategia pre-dirigida, los fagos (G3-C12-TCO, f88-fd-TCO, G3-C12 y f88-fd) fueron incubados con las células durante 1 h, para su interacción con el blanco molecular. Seguidamente, luego de eliminar las moléculas no unidas a la diana molecular, se adicionó el derivado $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$. Así, luego de 30 minutos de reacción, se eliminó el exceso de reactivos y se lavó el cultivo, para finalmente medir la radioactividad en cuentas por minuto.

Debido a la elevada, expresión de galectina-3 en la células MDA-MB-435 observada en el experimento de Western Blot, se esperaba un marcado superior cuando se utiliza G3-C12-TCO respecto de f88-fd-TCO. Sin embargo, los resultados obtenidos (Figura 37) no revelan una diferencia significativa entre los distintos sistemas estudiados. La diferencia de señal observada entre G3-C12-TCO y G3-C12, control positivo y control negativo, respectivamente, podría atribuirse entonces, a la unión inespecífica de los bacteriófagos, que al estar conjugados con TCO, resultan en un aumento de las cuentas.

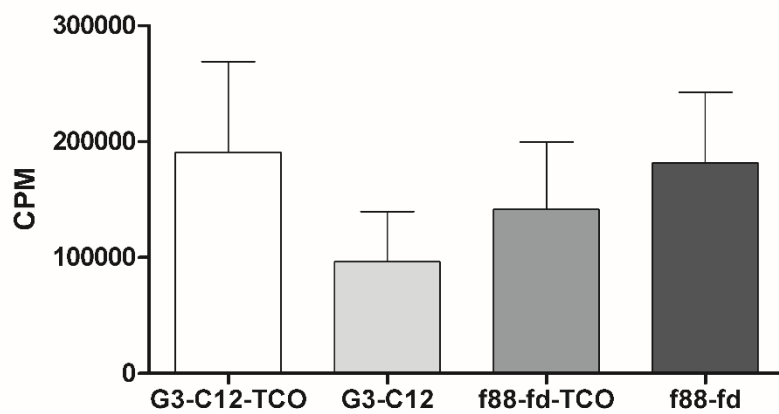


Figura 37. Estudio de la reacción bio-ortogonal en un cultivo celular MDA-MB-435, utilizando **1d**-^{99m}Tc y los fagos G3-C12-TCO, f88-fd-TCO, G3-C12 y f88-fd con un abordaje pre-dirigido.

4.4 Discusión y conclusiones

El desarrollo de nuevos agentes de imagen basados en la reacción bio-ortogonal entre derivados de [1,2,4,5]tetrazina y TCO, abrió un abanico de posibilidades a ser exploradas. Al momento del comienzo del trabajo experimental que se describe en este capítulo, emergían los primeros trabajos basados en esta química, principalmente enfocados en demostrar las propiedades bio-ortogonales de la reacción y al mismo tiempo demostrar su potencial aplicación en estrategias pre-dirigidas. La naturaleza modular de la estrategia pre-dirigida, planteó en esta tesis una variedad de combinaciones posibles a explorar. Hasta ese momento, el grupo de radionucleidos utilizados para marcar alguna de las dos etiquetas bio-ortogonales en cuestión, se limitaba al ^{111}In , ^{177}Lu , ^{64}Cu y ^{18}F .^{137,147,173,179,180} Sin embargo, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, el radionucleido de mayor uso en medicina nuclear, aún no había sido explorado. Por tal motivo, es que se decide abordar la temática a través de la marcación de alguno de los componentes de la reacción bio-ortogonal con dicho radionucleido.

Lo siguiente fue seleccionar el sistema biológico que permitiera implementar la estrategia pre-dirigida con el propósito de verificar que la misma fuese susceptible de ser aplicada, mediante el uso de reacciones bio-ortogonales, en el diseño de agentes de imagen. En este sentido, la molécula con reconocimiento específico que se eligió consistió en un bacteriófago que presenta en su superficie varias copias de una secuencia peptídica que reconoce con alta afinidad la glicoproteína galectina-3 de relevancia en las células tumorales. El bacteriófago fue seleccionado previamente a partir de una biblioteca de fagos, por presentación de la secuencia peptídica ANTPCGPYTHDCPVKR fusionada a las proteínas de la cápside. En principio, al ser partículas multivalentes, se esperaría una mayor avidéz por el objetivo deseado en comparación con los anticuerpos, que son bivalentes. Además, poseen la ventaja de conjugarlos fácilmente a través de sus proteínas de revestimiento (cp, del inglés coat protein), lo que permitiría la incorporación de múltiples sondas por cada virión.

Trabajos previos, del grupo y de otros autores, han explorado el potencial de los fagos como agentes de imagen, principalmente con dos objetivos, el uso de los mismos como agentes portadoras de sondas específicamente dirigidas a blancos moleculares o como herramienta para la selección de fagos *in vivo*.^{175,181–184}

Durante este trabajo de doctorado inicialmente el trabajo se enfocó en generar un stock de partículas suficiente para los experimentos futuros. En este sentido, fue posible propagar con éxito los dos clones de fagos con los que se trabajó. Los mismos fueron obtenidos en gran cantidad, 1.5 mL con una concentración de 7.7×10^{13} V/mL en el caso de G3-C12 y 1.71×10^{14} V/mL en el caso de f88-fd. Además, a través de la titulación se confirmó la viabilidad de los mismos. Seguidamente, se abordó la estrategia de conjugación con la primera etiqueta bio-ortogonal. La elección de la primera etiqueta se basó en el trabajo pionero de Rossin y Robillard que demostraron que un 75 % de CC49-TCO permanece reactivo luego de 24 h en circulación en sangre, lo que nos impulsó a conjugar los bacteriófagos con el grupo químico TCO.¹³⁷

Lo siguiente fue decidir, que grado de conjugación era conveniente para las partículas virales. En este sentido, Weissleder et al., describieron que con una relación de 700 fluoróforos por cada partícula de fago, se obtiene una señal óptima (fluorescencia vs “quenching”) para experimentos *in vivo*.¹⁸² Además, se han descrito reacciones de biotinización de fagos con relaciones molares 1000:1.¹⁸⁴ En el presente trabajo se exploraron excesos molares de 330, 1000 y 4000 de NHS-TCO (UV-tracer™) respecto de las partículas virales, así como también tiempos de reacción de 15, 30 y 60 minutos. Gracias a la presencia del grupo cromóforo fue posible determinar el número de grupos incorporados, obteniéndose un rango de conjugación en 200-700 TCO por virión, dependiendo de la condición.

Sin embargo, cuando se evaluó la reacción bio-ortogonal, permitiendo en un primer paso el reconocimiento específico del fago G3-C12-TCO por su blanco molecular galectina-3, y en un segundo paso la cicloadición con el derivado fluorescente de tetrazina TZ-Cy3, se observó marcación inespecífica cuando se utilizaron concentraciones de fago superiores a 1×10^8 V/mL o conjugados con elevada proporción de TCO. Resultados similares se observó cuando se evaluó la reacción en un cultivo celular de células MDA-MB-435, pero a diferencia del ensayo de tipo ELISA, fue el stock con mayor grado de conjugación el que permitió observar cierto grado de marcación a nivel celular. Si bien, dicho experimento evidenció la viabilidad de la reacción bio-ortogonal, los resultados sugieren pérdida de reconocimiento por su diana molecular, lo que lleva a un número de partículas muy bajo luego de los lavados. Por otro lado, al aumentar la concentración de los fagos se observó un aumento de la señal inespecífica, ya sea cuando se incuban los fagos previamente marcados, o cuando se utiliza la estrategia en dos pasos.

Dichos resultados llevaron a simplificar el sistema, utilizando un derivado de TCO de menor tamaño y en menor cantidad, de forma de no afectar la capacidad de reconocimiento del péptido presentado en el fago. Por otro lado, se desarrolló un derivado de [1,2,4,5]tetrazina sustituido adecuadamente para su marcación con ^{99m}Tc , a través de la reacción con el agente bifuncional HYNIC. La elección del mismo se basó en que permite marcaciones con elevadas purzas radioquímicas y especialmente en condiciones de reacción suave. Además, la experiencia previa con que contaba el grupo en la síntesis de distintos análogos de HYNIC permitía distintas opciones a la hora de abordar la estrategia sintética.

De esta forma, fue posible la síntesis de un derivado de tetrazina portador de una subestructura coordinante derivada de HYNIC, con su grupo hidrazino protegido mediante un trifluorometilcarbonilo, que según los trabajos de Blower et al.,^{57,185,186} y como posteriormente lo comprobó nuestro grupo,³⁴ permite la marcación con ^{99m}Tc sin necesidad de exposición previa del grupo quelante. Distintas condiciones de marcación fueron estudiadas para el derivado obtenido, todas ellas con elevadas purzas radioquímicas, incluso superiores al obtenido para un derivado similar marcado con ^{99m}Tc via HYNIC.¹⁶³

Seguidamente, se evaluó el proceso de marcación analizando si el derivado de tetrazina aún conservaba la reactividad y era posible que reaccionase con el TCO en la superficie de los fagos. Así, fue posible la marcación de los fagos, previamente inmovilizados, mediante la reacción de cicloadición entre la tetrazina y el TCO.

Sin embargo, el abordaje de la estrategia pre-dirigida en un cultivo celular no condujo a resultados alentadores, descartando la hipótesis que sea un problema de sensibilidad, o pérdida de reconocimiento por elevada presencia de grupos TCO en la superficie

En suma,

- Se comprobó la reacción de cicloadición en la superficie de los bacteriófagos a través de la reacción bio-ortogonal entre [1,2,4,5]tetrazina y TCO.
- No fue posible hallar las condiciones adecuadas para la marcación de los mismos en entornos biológicos, de forma reproducible, utilizando una estrategia predirigida.
- Se diseñó y sintetizó el primer derivado [1,2,4,5]tetrazina portador de un quelante para ^{99m}Tc .

- Se logró una marcación eficiente del derivado de [1,2,4,5]tetrazina con ^{99m}Tc .
- Se comprobó la reacción de cicloadición entre un derivado TCO y una [1,2,4,5]tetrazina radiomarcada con ^{99m}Tc en la superficie de una biomolécula.

4.5 Materiales y metodologías

A continuación se describen reactivos y materiales utilizados:

Nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA); tricina, SnCl₂, DMSO, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, H₂O MilliQ; NaCl; EtOH (BioPak), HCl (36,5-38,0%) (Merck), MeOH calidad HPLC (Merck), ITLC-SG (Pall Corporation), generador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc (TecnoNuclear). Todos los disolventes utilizados para síntesis orgánica fueron previamente destilados (diclorometano, metanol, acetona). Las cromatografías en capa fina, TLC, fueron realizadas utilizando como soporte alúmina (MERCK).

Se emplearon los siguientes equipos:

Microscopio Leica TCP SP8 MP. Sistemas de Imágenes In-Vivo MS FX PRO. Personal Molecular Imager™ (PMI™) System - Bio-Rad.

4.5.1 Producción de stocks de los clones G3-C12 y f88-fd.

Los clones fueron seleccionados y cedidos por el grupo de la Prof. Susan Deustcher a partir de la biblioteca generada por el Prof. George Smith, ambos de la Universidad de Missouri.

4.5.1.1 Propagación de los clones G3-C12 y f88-fd.

Se inoculó 10 mL de medio NYZ conteniendo 50 µg/mL kanamicina, con las bacterias *E. coli* (cepa K91 BluKan) y se mantuvieron en un agitador orbital a 37 °C durante 24 h. Seguidamente se realizó un nuevo cultivo de *E. coli* sembrando 100 µL del cultivo iniciado la noche anterior en 6 mL de medio LB con 6 µL de kanamicina (50 µg/mL) y se creció a 37 °C durante 4 h. En una placa de 96 pocillos se colocó 20 µL de TBS gelatina en dos de las filas (2 × 12). Se realizaron diluciones seriadas (1/10) a lo largo de la fila por duplicado, iniciando con 22 µL de la biblioteca de fagos. Una vez realizadas las diluciones seriadas, se adicionaron 20 µL del cultivo de *E.coli* de 4 h y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para que ocurra la infección. Finalmente se adicionaron 200 µL de medio NYZ (0.2 µg/mL de tetraciclina), seguido de una incubación de 40 min a 37 °C en oscuridad. Los controles negativos no incluyeron la adición de clones. Una vez transcurrido el período de incubación, 20 µL de cada pocillo son sembrados en una placa de titulación con grilla (conteniendo NZY agar con 100 µg/mL de kanamicina y 40

µg/mL de tetraciclina). Se permite secar las gotas sembradas a temperatura ambiente y se incuba a 37 °C de forma invertida durante toda la noche. Al día siguiente, 1 L de medio NYZ es inoculado con una única colonia de la placa de titulación y se incuba para su propagación durante toda la noche, a 37 °C en agitación vigorosa.

4.5.1.2 Purificación

Luego de la propagación de los clones, se procede a purificar los mismos del cultivo. Para ello, el cultivo es fraccionado en 4 tubos de centrifuga de 250 mL y centrifugado a 4.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante es transferido a nuevos tubos de 250 mL y centrifugado nuevamente a 8.000 rpm durante 20 min. Se retira el sobrenadante de los 4 tubos, se mezclan y se vuelven a fraccionar en 5 tubos de 250 mL. Los 5 tubos de sobrenadante son adicionados con 45 mL de una disolución de polietilenglicol/NaCl (16.7% PEG 8000/3.3 M), se mezcla mediante múltiples inversiones y almacena a 4 °C durante 24 h para su precipitación. Finalmente, los fagos son centrifugados a 15.000 rpm durante 15 min. Se descarta el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 10 mL de PBS 1X, se centrifuga durante 10 min a 12.000 rpm, se transfiere el sobrenadante, se adiciona un 15 % de volumen de disolución de polietilenglicol/NaCl y se vuelve a centrifugar el precipitado durante 15 min a 12.000 rpm. Finalmente, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet con 1 mL de PBS mediante una agitación lenta.

4.5.1.3 Cuantificación y titulación

La concentración de ambos stocks fue realizada mediante espectrofotometría. Para ello, se realizó una dilución 1/50 de cada stock en PBS (1X, pH 7.5). Se agitó con vortex y se realizó un espectro de barrido midiendo la absorbancia desde los 240 nm a los 350 nm. Finalmente, la concentración en viriones/mL (V/mL) se determinó mediante A_{269} y A_{320} , considerando 9312 bases por virión, y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viriones/mL} = \frac{(A_{269} - A_{320})(\text{factor de dilución})(6 \times 10^{16})}{\text{número de bases/virión}}$$

El número de unidades infectivas/mL (UI/mL) fue determinado mediante un ensayo de titulación de las disoluciones previamente obtenidas. Para ello, se inoculó 10 mL de medio NYZ conteniendo 50 µg/mL kanamicina, con las bacterias *E. coli* (cepa K91

BluKan) y se mantuvieron en un agitador orbital a 37 °C durante 24 h. Seguidamente se realizó un nuevo cultivo de *E. coli* sembrando 100 µL del cultivo iniciado la noche anterior en 6 mL de medio LB con 6 µL de kanamicina (50 µg/mL) y se pusieron a crecer a 37 °C durante 4 h. En una placa de 96 pocillos se colocó 20 µL de TBS gelatina en dos de las filas (2x12). Se realizaron diluciones seriadas (1/10) a lo largo de la fila por duplicado, iniciando con 22 µL de la biblioteca de fagos. Una vez realizadas las diluciones seriadas, se adicionaron 20 µL del cultivo de *E. coli* de 4 h y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para que ocurra la infección. Finalmente se adicionaron 200 µL de medio NYZ (0.2 µg/mL de tetraciclina), seguido de una incubación de 40 min a 37 °C en oscuridad. Los controles negativos no incluyeron la adición de clones. Una vez transcurrido el período de incubación, una gota (20 µL) de cada pocillo son sembrados en una placa de titulación con grilla (conteniendo NZY agar con 100 µg/mL de kanamicina y 40 µg/mL de tetraciclina). Se permite secar las gotas sembradas a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C de forma invertida durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo del número de colonias en 20 µL y se calculó el número de unidades infectivas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades infectivas/mL} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ colonias}/0.02 \text{ mL}) \times 0.024 \text{ mL} \times \text{factor dilución}}{0.002 \text{ mL}}$$

4.5.1.4 Extracción de ADN y secuenciamiento de ADN

En paralelo al cultivo de propagación de 1L, se inoculan 3 mL de medio NYZ (0.2 µg/mL de tetraciclina) con una única colonia de la placa de titulación. Luego de 24 h, el cultivo fue centrifugado a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C hasta la formación del pellet, el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, el ADN de los bacteriófagos fue extraído utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. La muestra a secuenciar se preparó de manera de obtener una concentración de ADN de 1000 ng en un volumen final de 16 µL, con el agregado de la secuencia “primer” a una concentración de 20 pmol (5´-CGACTCTTGTTTCCTATGCTA-3´, +). La secuenciación se realizó en el “DNA core” de la Universidad de Missouri.

4.5.2 Conjugación bacteriófago-TCO

4.5.2.1 Conjugación con NHS-TCO (UV-tracer™)

Para la conjugación de los bacteriófagos en estudio, 2 mg de NHS-TCO (UV-tracer™, 1015.15 g/mol, Click Chemistry Tools) se disolvieron en 200 µL de DMSO seco y adicionaron en exceso molar a una disolución de G3-C12 o f88-fd (concentración final 1×10^{13} V/mL en PBS pH 7.4). Las distintas relaciones molares utilizadas (4000:1, 1000:1, 330:1) se calcularon a partir del número de moles de partículas de fago presentes en el tubo de reacción. Luego de incubar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente en agitación lenta, se agregaron 400 µL de etanolamina (3 M) para detener la reacción, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El exceso de NHS-TCO que no reaccionó fue eliminado mediante columna de exclusión molecular, seguido de diálisis en PBS a 4 °C (3 ciclos de 24 h, 1L por mL de muestra en Slide-A-Lyzer 10K MWCO, Thermo). Finalmente, la concentración en V/mL se determina mediante A_{269} y A_{320} , considerando 9312 bases por virión, y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viriones/mL} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{número de bases/virión}}$$

El porcentaje de conjugación del UV-tracer™TCO-NHS se calculó en base a las proteínas de la cápside totales. La absorbancia a 350 nM, permitió calcular la molaridad UV-tracer™TCO-NHS en la disolución de conjugado purificado ($\epsilon_{350} = 19500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A partir de la concentración de fagos en V/mL (A_{269} y A_{320}), se calculó la molaridad de partículas virales en dicho volumen, y por último se calculó la molaridad de cpVIII considerando 3900 cpVIII/virión. Finalmente se calculó el porcentaje de cpVIII conjugada con TCO.

4.5.2.2 Conjugación con NHS-TCO

Para la conjugación de los bacteriófagos en estudio, 2 mg de NHS-TCO (267.30 g/mol, ConjuProbe) se disolvieron en 200 µL de DMSO seco y adicionaron en exceso molar a una disolución de G3-C12 o f88-fd (concentración final 1×10^{14} V/mL en PBS pH 7.4). Las distintas relaciones molares que fueron utilizadas (30:1, 15:1, 5:1) se calcularon a partir del número de moles de partículas de fago presentes en 1 mL. Luego de incubar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente en agitación lenta, los fagos conjugados se purificaron, mediante columna de exclusión molecular, seguido de diálisis en PBS a 4 °C

(3 ciclos de 24 h, 1L por mL de muestra en Slide-A-Lyzer 10K MWCO, Thermo). Finalmente, la concentración en V/mL se determina mediante A_{269} y A_{320} , considerando 9312 bases por virión, y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viriones/mL} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{número de bases/virión}}$$

4.5.3 Reacción bio-ortogonal en la superficie del bacteriófago

La reacción de cicloadición fue realizada en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Para ello, en tubos de 1.5 mL se ponen a reaccionar 1 mL de 1×10^{12} V/mL de los distintos clones conjugados (G3-C12-TCO 19% cpVIII, G3-C12-TCO 8% cpVIII, f88-fd-TCO 19% cpVIII, f88-fd-TCO 6% cpVIII, G3-C12, f88-fd) con el derivado comercial metil-tetrazina-Cy3 (Click chemistry Tools, $\lambda_{\text{exc}}=553/\lambda_{\text{em}}=566$) en una relación molar 10:1 respecto de la molaridad de viriones. Las mezclas se incuban durante 120 min, en agitación lenta y en oscuridad. El resto de TZ-Cy3 no reaccionante se elimina mediante cromatografía de exclusión molecular (Zeba spin desalting column, 7000 MWCO). Como control del sistema de purificación se incluye un tubo de reacción conteniendo PBS + TZ-Cy3. Finalmente, alícuotas de 100 μL son transferidos a una placa de 96 pocillos y se mide la intensidad de fluorescencia.

4.5.4 Reacción bio-ortogonal “in vitro” sobre bacteriófago inmovilizado

En una placa de ELISA (High Binding Nunclon) se incuban 100 μL por pocillo de una disolución de anticuerpo anti-fago (10 $\mu\text{g/mL}$ en buffer bicarbonato 0.1 M, pH 9.5), durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se elimina la disolución y se lava dos veces con PBS-tween 0.1 %. Se bloquea con 400 μL de BSA al 5% durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se incuba durante 1h con una disolución de G3-C12-TCO stock 1 en una concentración de 1×10^{12} V/mL, por triplicado, y se lava 3 veces con PBS-tween 0.1 %. Finalmente, se incuba con concentraciones crecientes de TZ-Cy3, utilizando las siguientes relaciones molares 1:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1, 150:1 (TZ-Cy3:viriones). Luego de 1 h de reacción a temperatura ambiente, se elimina la TZ-Cy3 que no reacciona, se lava 3 veces con PBS-tween 0.1 % y se mide intensidad de fluorescencia (552/570 nm).

4.5.5 Reacción bio-ortogonal “in vitro” sobre bacteriófago pre-dirigido

En una placa de ELISA (High Binding Nunclon) se incuban 100 μL de una disolución de galectina-3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer bicarbonato 0.1 M, pH 9.5) por pocillo, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se elimina la solución y se lava una vez con PBS-tween 0.1 %. Se bloquea con 300 μL de BSA al 5% durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se incuba durante 1 h con las disoluciones de fago-TCO (G3-C12-TCO stock 1, G3-C12-TCO stock 3, f88-fd-TCO stock 1, f88-fd-TCO stock 3) en una concentración de 1×10^8 V/mL, por triplicado, y se lava 2 veces con PBS-tween 0.1 %. Finalmente, se incuba durante 60 min con Tz-Cy3 en una relación molar 10:1 respecto de la molaridad de viriones. Se elimina la Tz-Cy3 que no reacciona, se lava 2 veces con PBS-tween 0.1 % y se mide intensidad de fluorescencia (552/570 nm). Los pocillos blanco, no se les adiciona fago-TCO.

4.5.6 Ensayo de Western Blot

4.5.6.1 Cultivo celular y preparación de muestras

Las líneas de cáncer de mama BT549_{parent} and BT549_{sense} (transfectada con cADN que codifica galectina-3) fue cedida por la Prof. Susan Deustcher.

Se realizó un cultivo celular de las siguientes líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-435, BT549_{parent}, BT549_{sense}, BT474, B16F1, B16F10. Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI (glutamina 4 mM, 10% SFB, gentamicina 0.25 mg/mL), excepto BT549_{sense} donde se utiliza RPMI (glutamina 4 mM, 10% SFB, gentamicina 0.25 mg/mL, aminoácido no esenciales, geneticina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para la preparación de las muestras se realizaron cultivos de hasta un 80 % de confluencia. Luego de aspirar el medio, las células son lavadas con PBS 1X y se levantan con un raspador celular. Seguidamente las muestras son transferidas a un tubo de 1.5 mL y sonicadas (10 x 1 seg, en frío). Los extractos son conservados a -20 °C. Las proteínas totales se cuantificaron mediante “Bio-Rad protein assay” de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.5.6.2 Electroforesis y transferencia de proteínas

Alícuotas de 500 μL de los distintos extractos (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2-mercaptoetano (1/6 v:v)) son calentadas durante 10 min a 90-95 °C. Seguidamente 20 μg de cada muestra son

sembradas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % (Novex, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels) y separadas mediante electroforesis utilizando un buffer de corrida MOPS SDS NuPAGE®. El gel se resolvió en 2 h a 100 V. Seguidamente los geles son transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante buffer de transferencia Tris-glicina-metanol (48 mM Tris, 30 mM glicina, 20 % metanol). La transferencia se efectuó a 25 V, durante 2.5 h.

4.5.6.3 Inmunodetección

Para la inmunodetección, la membrana fue bloqueada con leche 5 % (leche en polvo libre de grasa en TBS³). Se incubó el anticuerpo primario anti-galectina 3 (Invitrogen) en una dilución 1:1000, a 4 °C durante la noche. Seguidamente, se lavó la membrana y se adicionó el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata conjugado a HRP⁴ (0.1 µg/µL). La detección se realizó mediante quimioluminiscencia con el sustrato Supersignal™ de ThermoScientific.

4.5.7 Microscopía confocal

El estudio de la reacción de cicloadición en un cultivo celular, aproximándonos a una estrategia pre-dirigida con los fagos G3-C12-TCO, se realizó en células MDA-MB-435 y se evaluó mediante microscopia confocal. El protocolo en común consistió en plaquear la células 24 h previas al experimento, una etapa de fijación o lavado del cultivo, etapa de bloqueo, etapa de incubación con las muestras de fagos (1×10^{12} V/mL), etapa lavado, adición del segundo componente bioortogonal (Tz-Cy3), y una última etapa de lavado o fijación de células según corresponda. Como controles, se utilizó f88-fd-TCO y f88-fd, así como también un experimento en paralelo con los fagos previamente marcado con Tz-Cy3 y purificados por columna de exclusión molecular (Zeba). El diseño de la placa y las condiciones estudiadas se presentan en la figura 38 y en la tabla 5. Finalmente, todos los cultivos fueron preparados con medio de montaje con DAPI (VectaShield H-1500) y analizados en un microscopio confocal Leica.

³ Solución TBS: Tris 50 mM, 15 mM NaCl.

⁴ HRP: Horseradish Peroxidase.

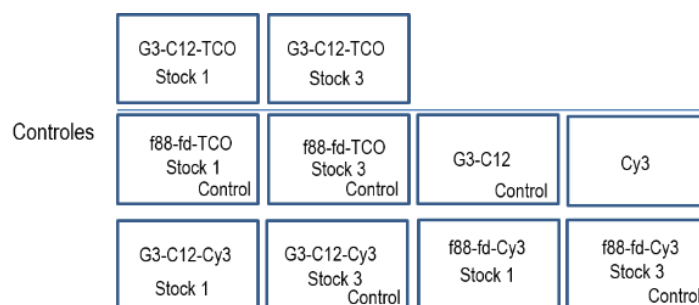


Figura 38. La reacción de bio-ortogonal se estudió en células MDA-MB-435. Para ello se incubaron en un primer paso con G3-C12-TCO (stock 1 y 3, 19% y 8 % de cpVIII conjugada a TCO, respectivamente) y en un segundo paso con Tz-Cy3. Como control se utilizaron los stock 1 y 3 de f88-fd (19% y 6 % de cpVIII conjugada a TCO, respectivamente), G3-C12, Tz-Cy3, así como los stock 1 y 3 G3-C12 y f88-fd previamente marcados con Tz-Cy3.

Tabla 5. Condiciones estudiadas para evaluar la reacción bioortogonal en cultivo celular mediante microscopía óptica confocal.

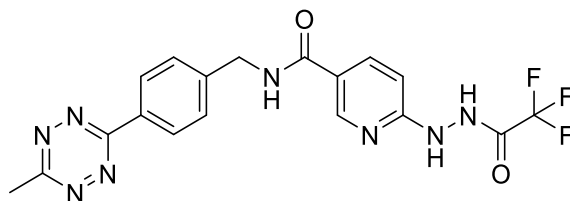
| <i>Etapas</i> | <i>Placa 1</i> | <i>Placa 2</i> | <i>Placa 3</i> | <i>Placa 4</i> |
|------------------------------------|--|---|--|--|
| <i>Cultivo</i> | Fijación, 4% formaldehído | Fijación, 4% formaldehído | Células vivas | Células vivas |
| <i>Bloqueo</i> | buffer Rockland | buffer Rockland | Medio de cultivo (10% SFB) | Medio de cultivo (10% SFB) |
| <i>Muestras (1° etiqueta, TCO)</i> | fagos 100 µL, 1×10 ¹² V/mL. 1 h Incubación a 37°C | fagos 100 µL, 1×10 ¹² V/mL. 1 h Incubación a T amb | fagos 100 µL, 1×10 ¹² V/mL. 1 h Incubación a 37°C | fagos 100 µL, 1×10 ¹² V/mL. 1 h Incubación a 37°C |
| <i>Lavado</i> | 500 µL PBS | 500 µL PBS | Aspiro exceso | Aspiro y lavo con 500 µL PBS |
| <i>(2° etiqueta, Tz-Cy3)</i> | 100 µL Relación molar 10:1, 30 min 37°C | 100 µL Relación molar 10:1, 30 min a T amb | 100 µL Relación molar 10:1, 30 min 37°C | 100 µL Relación molar 10:1, 30 min 37°C |
| <i>Lavado</i> | 500 µL PBS | 500 µL PBS | 500 µL PBS | 500 µL PBS |
| <i>Final</i> | - | - | Fijación, 4% formaldehído | Fijación, 4% formaldehído |

4.5.8 Síntesis orgánica

4.5.8.1

A una mezcla conteniendo hidrocloreto de 4-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)metanamina (20 mg, 84.14 µmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (2 equivalentes) en THF:DMF (4:1) (4 mL), se adicionan 1.2 equivalentes de 6-trifluoroacetilhidracinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidinilo. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El volumen del disolvente fue reducido a vacío y el producto final se obtuvo luego de una purificación mediante cromatografía en capa fina preparativa, utilizando CH₂Cl₂:MeOH (95:5) como fase móvil y alúmina como fase estacionaria. Luego de la evaporación del

disolvente a vacío, el producto final se obtuvo como un sólido de color rosado intenso (10 mg, 27 %, punto fusión: 242-243 °C). La pureza de **1** fue verificada mediante HPLC.



^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 9.40 (sa, 2H, NHNH), 8.81 (ta, $J = 4.8$ Hz, 1H, NHCOPy), 8.49 (s, 1H, Py), 8.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ar), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Py), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ar), 6.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Py), 4.55 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2), 2.98 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167.22 (CCH_3), 165.86 (Py-CO), 163.15 (Ar- CN_2), 158.20 (q, $J = 31$ Hz, C(O)CF_3), 158.08 (Py), 148.56 (Py), 145.13 (Ar), 136.48 (Py), 130.40 ($\text{C}_2\text{N}_4\text{-C(Ar)}$), 128.23 (Ar), 127.59 (Ar), 117.18 (Py), 113.01 (q, $J = 297$ Hz, C(O)CF_3), 104.36 (Py), 42.36 (CH_2), 20.97 (CH_3). IES-EM, esperado m/z : 433.13 (M+H^+), hallado m/z : 433.12 (M+H^+). $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_2$: C, 50.0; H, 3.5; N, 25.9. Hallado: C, 49.9; H, 3.2; N, 25.6.

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

Todos los procedimientos de este apartado y los apartados siguientes que implicaron trabajo con material radioactivo fueron realizados bajo normas y medidas de protección radiológicas.

Para las marcaciones con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se utilizó como agente reductor SnCl_2 . Todos los disolventes empleados fueron previamente purgados con N_2 gas. Las purezas radioquímicas se determinaron por HPLC método 1 y en CCF. Los estudios de HPLC fueron realizados en un equipo Agilent Serie Infinity 1200 equipado con detector GABI Star y una columna de fase reversa C18 (300 mm x 4.6 x 10 μm) Thermo Scientific Hypersil ODS, el detector UV se estableció en 280 nm. **Método 1:** gradiente lineal Agua/TFA 0.05% (A) y MeOH (B), 0-20 min 0-100% B, 2-22 min 100-0% B. La CCF se realizó utilizando ITLC-SG con citrato de sodio 0.1M como fase móvil para determinar $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -coloide ($R_f = 0$), **1d**- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -coligando y $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$). Las medidas de actividad fueron realizadas en un calibrador de dosis Capintec CRC7, contador de

centelleo sólido de pozo: detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC.

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan 100 µL de una disolución acuosa de tricina (100 mg/mL en H₂O, 55.8 µmol), 20 µg de **1** (1 µg/µL, 0.46 nmol), 20 µL de una disolución de SnCl₂ recién preparada (2 mg/mL en etanol, 17.7 µmol) y 111-150 MBq de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 µL) eluido de un generador Mo-Tc. Se controla pH a 5 y se incuba durante 15 min a 37 °C en un baño seco. Una vez finalizada la reacción se aísla el producto radioactivo de la misma por HPLC (método 1).

4.5.10 Ensayo de Dot Blot

Gotas de 40 µL de G3C12-TCO y G3C12 (control negativo) (1×10^{12} viriones/mL, conjugados con NHS-TCO en una relación molar 15:1) en PBS 1X fueron adsorbidos en una membrana de PVDF, contenida en una placa de petri. La membrana se bloqueó con PBS-BSA 5 % durante 1 h y sobre los puntos de siembra se adicionó **1d**-^{99m}Tc (20 µL, 30 µCi). Se permitió reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de este período el exceso de **1d**-^{99m}Tc que no reaccionó fue removido mediante sucesivos lavados con PBS. Finalmente se realiza la adquisición de la imagen de la membrana en el sistema In-Vivo MS FX PRO-KODAK por detección de emisiones gamma.

4.5.11 Reacción bioortogonal en cultivo celular con 1d-^{99m}Tc

La reacción de cicloadición fue estudiada sobre células MDA-MB-435. Para ello, en una placa de 24 pocillos se sembraron 1×10^5 células por pocillo. Luego de 24 h, se adicionaron 200 µL de los distintos stocks de fagos conjugados con NHS-TCO (G3-C12-TCO, f88-fd-TCO (conjugados previamente con NHS-TCO en una relación molar 15:1)) y no conjugados con NHS-TCO (G3-C12 y f88-fd) en una concentración de 1×10^{12} viriones/mL. Luego de 1 h a temperatura ambiente, se elimina el exceso de reactivos y se lava gentilmente con PBS 1X. Se bloquea el pocillo con 500 µL de una disolución de PBS-BSA 5% durante 30 min. Luego de aspirar el excedente, se adiciona **1d**-^{99m}Tc (2 µCi/pocillo) y se incuba 30 min. Seguidamente, se elimina el exceso y se lava 2 veces abundantemente con 500 µL de PBS-tween 0.01 % para evitar pérdida de células.

Finalmente, las células son removidas mecánicamente, colectadas y contadas en el contador de centelleo sólido de pozo indicado anteriormente.

5 Capítulo II

5.1 Objetivos específicos

- 1- Marcar el derivado **1** con ^{99m}Tc utilizando distintos coligandos.
- 2- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de estabilidad e hidrofiliidad de los radiomarcados obtenidos, así como también sus propiedades biológicas.
- 3- Estudiar la reacción bio-ortogonal utilizando el derivado radiomarcado con ^{99m}Tc . Aplicar el enfoque pre-dirigido en la marcación *in vivo* de un anticuerpo dirigido específicamente contra TAG-72 en un modelo de cáncer de colon.

5.2 Antecedentes y Fundamentos

Uno de los objetivos principales de este trabajo doctoral es explorar el potencial de la reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazinas y TCOs en el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, a pesar de los avances alcanzados en el capítulo anterior con la obtención de un derivado de tetrazina marcado con ^{99m}Tc , no fue posible evaluar la reacción *in vivo* en el sistema biológico seleccionado.

En base a los resultados obtenidos previamente, en el presente capítulo se describirá el estudio de la reacción bio-ortogonal pero utilizando una nueva prueba de concepto.

En esta oportunidad con el objetivo de implementar la estrategia pre-dirigida, se seleccionó la detección de TAG-72 mediante la utilización del AcMo CC49, que reconoce con gran afinidad el antígeno mencionado, en un modelo de cáncer de colon.

El antígeno TAG-72 es una glicoproteína de membrana con elevada expresión en una variedad de tumores sólidos.^{187,188} Los antecedentes de Rossin y Robillard, demostraron que es una diana adecuada para el estudio de la reacción de cicloadición *in vivo*, debido a su internalización limitada.^{137,146}

5.3 Resultados

5.3.1 Química y Radioquímica

En el apartado anterior (Capítulo I de la tesis doctoral) se describió la obtención del derivado de tetrazina **1** a partir del hidrocloreuro de 4-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)metanamina y el derivado de HYNIC 6-trifluoroacetilhidracinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidinilo. El mismo se obtuvo con un rendimiento del 27 %.

Para continuar con los estudios de dicho reactivo bio-ortogonal, se exploró la estabilidad del sistema [1,2,4,5]tetrazina en PBS y en una disolución de BSA al 10 % durante 24 h a temperatura ambiente. Para ello se utilizó la absorbancia a 540 nm. El derivado **1** se mostró estable por al menos 24 h en PBS, con una disminución de la concentración de **1** al 80 % cuando se incubó en BSA al 10 %.

Las condiciones de marcación con ^{99m}Tc utilizando tricina como coligando, descritas en el apartado anterior (capítulo I), condujeron a purzas radioquímicas superiores a 90 %, siendo la condición optimizada cuando se incubó a 37 °C durante 15 minutos. El compuesto marcado mostró ser estable en PBS y en el medio de reacción a 25 °C por al menos 24 h.

Con el fin de evaluar el efecto de los coligandos sobre la lipofilia del radiocomplejo se realizó la marcación del derivado **1** utilizando el coligando ácido etilendiaminodiacético (EDDA) y una mezcla de tricina y EDDA como coligandos. La PRQ de **1d**- ^{99m}Tc cuando el compuesto **1** se marcó utilizando EDDA como coligando fue del 38 %, mientras que se observó una PRQ del 90 % cuando se utilizó una mezcla de tricina y EDDA.

Seguidamente se procedió a determinar el coeficiente de reparto n-octanol/fase acuosa, Log P, como parámetro de hidrofiliidad del compuesto marcado. Los coeficientes obtenidos para los diferentes complejos ^{99m}Tc -HYNIC-tetrazina obtenidos, se presentan en la tabla 6. Los resultados demostraron que el coligando tricina resultó en la entidad menos lipófila.

Tabla 6. Valores de Log P obtenidos para los complejos obtenidos de la marcación de **1** utilizando distintos coligandos.

| Coligando | LogP |
|--------------|--------------|
| Tricina | -0.54 ± 0.07 |
| EDDA | -0.40 ± 0.01 |
| tricina:EDDA | -0.51 ± 0.02 |

Posteriormente, se determinó la fracción unida a proteína plasmática para los complejos radiomarcados con el coligando tricina y el coligando EDDA. Luego de incubar los mismos en suero de ratón, durante 30 min a 37 °C, las proteínas se precipitaron con ACN, de forma de medir la radioactividad asociada a las proteínas precipitadas. Los resultados revelaron que la unión a proteínas plasmáticas es de un 14.0 ± 3.2 % para el complejo formado con tricina y 17.3 ± 0.6 % para el complejo formado con EDDA.

En base a estos resultados, se procedió a evaluar el comportamiento *in vitro* e *in vivo* del derivado marcado utilizando el coligando tricina (**1d**-^{99m}Tc).

5.3.2 Evaluación biológica *in vitro*

5.3.2.1 Conjugación CC49 con NHS-TCO

Para evaluar la reacción bio-ortogonal entre TCO y **1d**-^{99m}Tc se utilizó el AcMo CC49 conjugado a TCO como primer componente bio-ortogonal. La conjugación de anticuerpo se logró después de una reacción de 30 minutos con un exceso molar de NHS-TCO de 10:1 respecto al AcMo.¹³⁷ El número de grupos TCO reactivos presente por molécula de anticuerpo se determinó mediante electroforesis en SDS-PAGE (Figura 39). Para ello, se incubó el anticuerpo conjugado con diferentes relaciones molares de **1d**-^{99m}Tc, dando como resultado 8.5 ± 0.1 moléculas de TCO por anticuerpo.

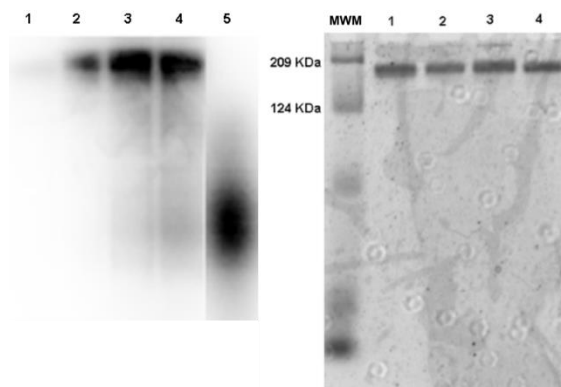


Figura 39. Cuantificación de TCO/AcMo mediante SDS-PAGE. A la izquierda detección radiactiva. En los carriles 1 a 4 $1d$ - ^{99m}Tc y CC49-TCO con relaciones molares de 1:1, 5:1, 10:1 y 15:1, respectivamente. En el carril 5 solo $1d$ - ^{99m}Tc . A la derecha tinción con Coomassie. MWM: marcadores de peso molecular. Las pistas 1-4 contienen 25 μg de AcMo CC49.

5.3.2.2 Bioactividad de CC49-TCO y cicloadición *in vitro*

Después de la conjugación con TCO, se evaluó la inmunoreactividad del anticuerpo modificado mediante un ensayo de tipo ELISA. Para dicho fin se inmovilizó una mucina de glándulas submaxilares bovinas (BSM) como antígeno diana y BSA como control negativo. Luego del reconocimiento del anticuerpo por su blanco molecular, la detección se realizó a través de un anticuerpo secundario conjugado a HRP, adición de sustrato y determinación de absorbancia a 405 nm. No se observaron diferencias significativas en el reconocimiento de antígeno entre el CC49 no modificado y CC49-TCO (Figura 40 A).

Después de confirmar que el reconocimiento de CC49-TCO no se vio afectado por la conjugación, se evaluó la reacción de cicloadición entre $1d$ - ^{99m}Tc y CC49-TCO mediante enfoque pre-dirigido utilizando BSM inmovilizada en placas de ELISA. El ensayo consistió en permitir, en una primera etapa, que el conjugado CC49-TCO se uniera a BSM inmovilizada; seguido de la adición de $1d$ - ^{99m}Tc en una segunda etapa. La reacción bio-ortogonal se evaluó después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos confirmaron que el conjugado de CC49-TCO se marcó con ^{99m}Tc mediante la reacción entre tetrazina y TCO presente a nivel del anticuerpo y no debido a la unión no específica de CC49-TCO o de $1d$ - ^{99m}Tc (Figura 40 B).

El siguiente paso consistió en estudiar la reacción bio-ortogonal en un cultivo celular, para lo cual se realizó un abordaje pre-dirigido, con previa detección del biomarcador TAG-72 presente en la superficie de células LS174T por parte de CC49-TCO y posterior reacción con $1d$ - ^{99m}Tc . En dicho experimento fue posible evidenciar la

radioinmuno-detección de TAG-72 en células LS174T mediante la reacción bio-ortogonal entre CC49-TCO unido a su blanco molecular y tri-^{99m}Tc-HYNIC-TZ (Figura 38 C).

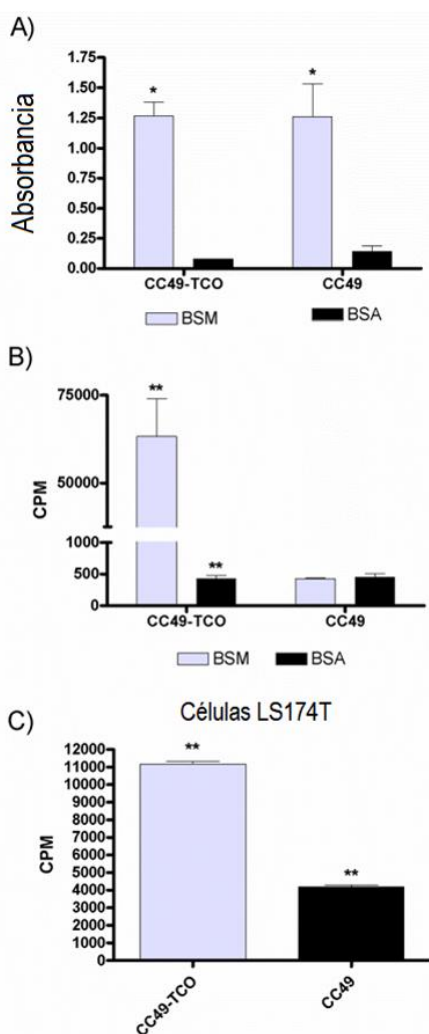


Figura 40. A) Ensayo de bioactividad de CC49-TCO y CC49 no modificado en BSM inmovilizada, detectado con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a HRP y utilizando ABTS como sustrato (detectado a 405 nm). Los datos representan la media \pm DS. (*) Sin diferencia significativa ($p > 0.05$, prueba t de Student). B) Cicloadición $1d$ -^{99m}Tc con CC49-TCO en BSM inmovilizada. Los datos representan la media \pm DS. (**) Diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba t de Student). C) La reacción de $1d$ -^{99m}Tc con CC49-TCO pre-dirigido y unido a células LS174T. Los datos representan la media \pm DS. (**) Diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba t de Student).

5.3.3 Evaluación biológica *in vivo*

5.3.3.1 Biodistribución en ratones normales

Con la finalidad de evaluar el comportamiento biológico de la segunda etiqueta bio-ortogonal $1d$ -^{99m}Tc se realizaron estudios de biodistribución de la misma en ratones normales CD-1 a 1, 4 y 24 h después de su administración intravenosa (Tabla 7). Los

resultados obtenidos muestran una rápida eliminación de la sonda radioactiva de la sangre y de la mayoría de los órganos a excepción de hígado, intestinos y riñón. Por ejemplo, 1 h posterior a la administración de **1d**-^{99m}Tc se observó un 1.70 ± 0.11 % DI/g en sangre, siendo un 43.76 ± 1.80 % de la dosis total eliminada a través de la vejiga y la orina. Sin embargo, se observó elevada acumulación no específica en hígado e intestinos 1 hora después de la inyección con valores de 14.15 ± 0.43 % DI/g y 5.62 ± 0.59 % DI/g, respectivamente. Seguidamente, un descenso significativo de la actividad en el intestino delgado después de 4 h con un aumento concurrente de 21.82 ± 2.73 % DI/g en el intestino grueso sugirió que una porción significativa del compuesto presenta una vía de excreción a través del tracto gastrointestinal, lo que probablemente ocurra debido a la naturaleza hidrofóbica del compuesto **1** marcado con ^{99m}Tc.

Tabla 7. Biodistribución de **1d**-^{99m}Tc a 1, 4 y 24 h en ratones normales CD-1 (n = 3). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un test ANOVA de dos vías con Bonferroni ((†) p <0.05).

| % Dosis inyectada / gramo de órgano (%DI/g) | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Órganos | 1 h | 4 h | 24 h |
| Sangre | 1.70 ± 0.11 | 1.01 ± 0.35 | 0.50 ± 0.02 |
| Corazón | 0.68 ± 0.06 | 0.39 ± 0.02 | 0.33 ± 0.04 |
| Pulmones | 1.33 ± 0.13 | 0.77 ± 0.07 | 0.64 ± 0.10 |
| Hígado | $14.15 \pm 0.43^\dagger$ | $10.61 \pm 0.89^\dagger$ | 8.95 ± 0.58 |
| Bazo | 0.46 ± 0.04 | 0.27 ± 0.03 | 0.25 ± 0.03 |
| Estómago | 0.32 ± 0.11 | 1.49 ± 1.69 | 0.48 ± 0.16 |
| Intestino grueso | 0.42 ± 0.18 | 21.82 ± 2.73 | 1.28 ± 0.28 |
| Intestino delgado | 8.07 ± 0.61 | 3.45 ± 0.24 | 0.45 ± 0.01 |
| Intestinos | $5.62 \pm 0.59^\dagger$ | $10.01 \pm 0.67^\dagger$ | $0.71 \pm 0.11^\dagger$ |
| Riñones | $7.84 \pm 1.63^\dagger$ | $3.79 \pm 0.51^\dagger$ | 3.12 ± 0.25 |
| Cerebro | 0.05 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | 0.02 ± 0.01 |
| Músculo | 0.43 ± 0.04 | 0.24 ± 0.025 | 0.19 ± 0.03 |
| Hueso | 0.61 ± 0.09 | 0.31 ± 0.09 | 0.49 ± 0.07 |
| Piel | 1.41 ± 0.10 | 0.88 ± 0.08 | 0.82 ± 0.16 |
| % Dosis Inyectada | | | |
| Orina y Vejiga | 43.76 ± 1.80 | 46.01 ± 2.28 | 74.73 ± 2.68 |

Finalmente, se analizaron por HPLC los metabolitos presentes en la orina 1 hora después de la inyección. El perfil de HPLC mostró la presencia de un pico en la orina con un tiempo de retención similar al observado para **1d**-^{99m}Tc (Figura 41).

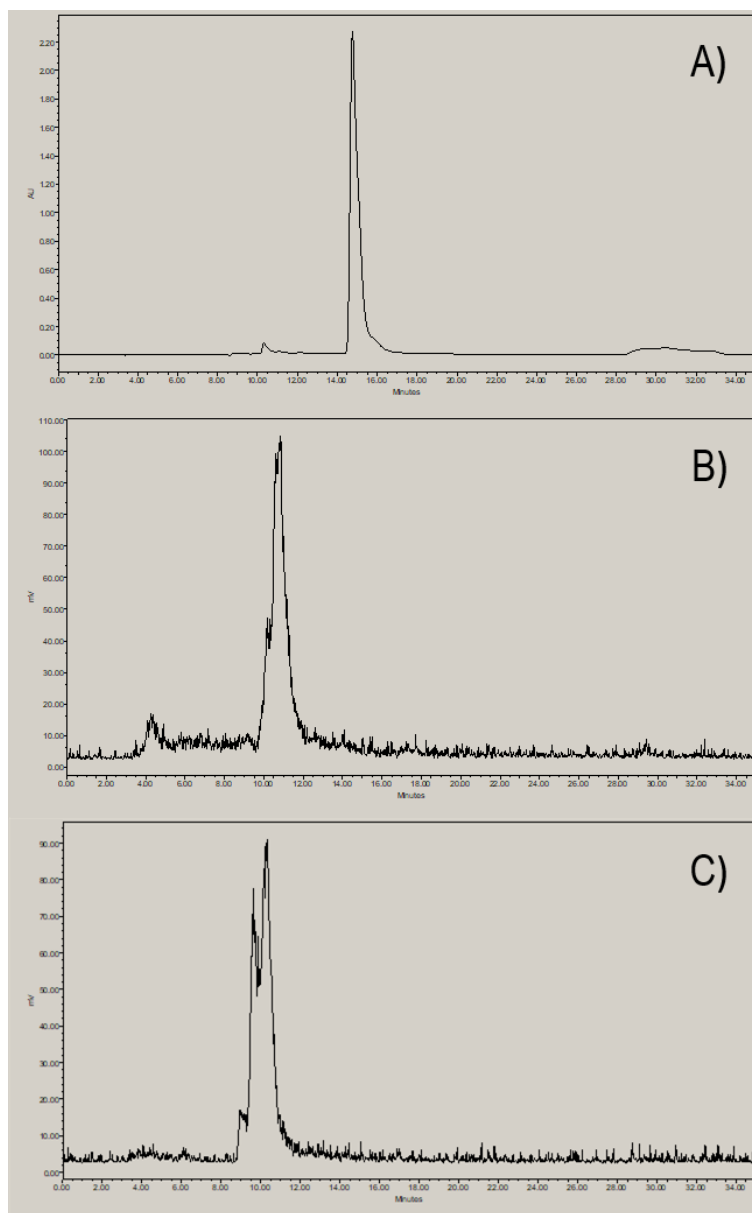


Figura 41. Análisis de HPLC de fase reversa de A) derivado **1** (detector UV 280 nm), B) **1d**- ^{99m}Tc (detector gamma), C) control de orina 1 hora después de la inyección de **1d**- ^{99m}Tc (detector gamma).

5.3.3.2 Estudio de la reacción bio-ortogonal en modelo tumoral murino

Finalmente se estudió la reacción bio-ortogonal *in vivo* y su aplicación como estrategia de marcación de agentes de imagen SPECT de forma pre-dirigida. La reacción de cicloadición se evaluó en ratones portadores de tumores de cáncer de colon inducido con células LS174T. La estrategia de marcación utilizada en dos pasos se esquematiza en la figura 42 A. Con dicho propósito, se inyectaron 100 μg de CC49-TCO a través de la vena

de la cola y se dejó acumular durante 48 h (Figura 42 B). El anticuerpo circulante en sangre, no retenido a nivel tumoral, se redujo utilizando una dosis de agente secuestrante (Tagworks), seguido 2 h después por la administración de **1d**-^{99m}Tc. Finalmente, las imágenes SPECT/CT se adquirieron 2 h posteriores a la inyección de la etiqueta radioactiva (Figura 43).

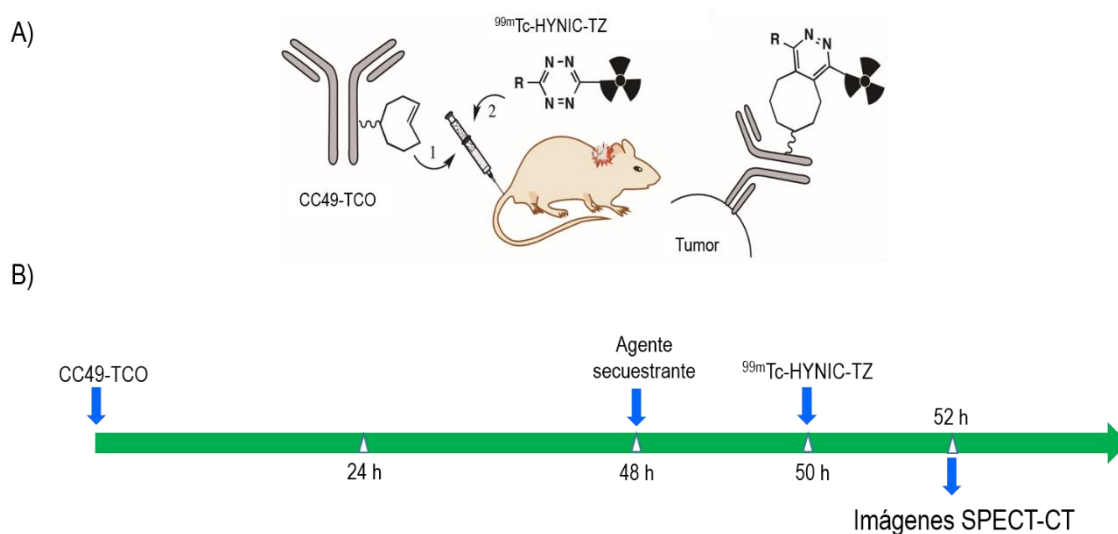


Figura 42. A) Estrategia de marcación pre-dirigida. B) Protocolo de marcación *in vivo* utilizado.

Los resultados obtenidos de las imágenes SPECT/CT mostraron una clara visualización del tumor, lo que confirmó el éxito de la reacción de cicloadición *in vivo* entre el CC49-TCO pre-dirigido y **1d**-^{99m}Tc. No se observó acumulación inespecífica del derivado tetrazina radiomarcado en el tumor. Sin embargo, se observó una importante acumulación inespecífica en la imagen corporal completa principalmente en el hígado, la vesícula biliar, los intestinos y los riñones. Estas observaciones son concordantes con los resultados obtenidos en la biodistribución en ratones normales y en la imagen del ratón control.

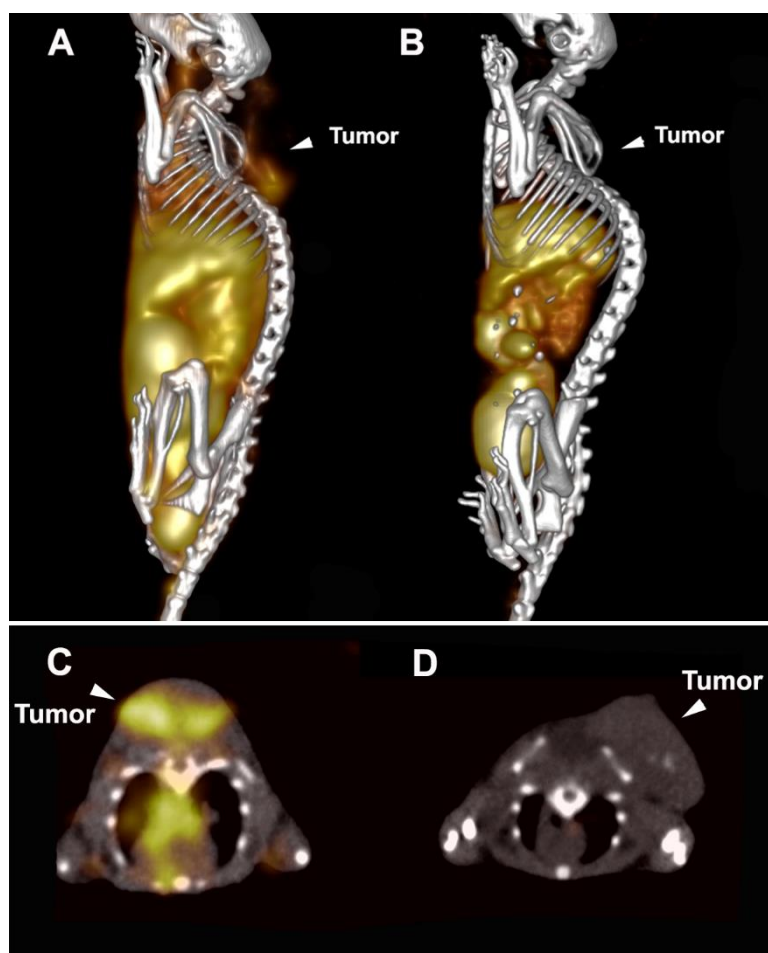


Figura 43. Imagen SPECT-CT en ratones con tumor de colon LS174T. Corte coronal (A) y corte transversal (C) de CC49-TCO pre-dirigido y su marcación *in vivo* con ^{99m}Tc -1d, 2 horas después de la inyección. Corte coronal (B) y corte transversal (D) imagen control de ^{99m}Tc -1d.

Con el objetivo de cuantificar la captación tumoral mediante el abordaje en estudio, se realizó un estudio de biodistribución en ratones portadores de tumores LS174T con ^{99m}Tc -1d siguiendo el mismo protocolo de administraciones utilizado en la imagen SPECT-CT. Los resultados mostraron una modesta captación tumoral ($1.39 \pm 0.43\%$ DI/g), probablemente debido a que la mayor parte de la tetrazina radioactiva se acumuló en el hígado, el tracto gastrointestinal y los riñones. Los resultados del estudio de biodistribución siguiendo un protocolo pre-dirigido fueron consistentes con el estudio de imagen SPECT-CT. Se realizó un experimento de bloqueo en el que se co-inyectó un exceso de 10 veces del AcMo CC49 con el AcMo CC49-TCO. Se observó una reducción del 17 % en la captación tumoral (datos no se muestran). Por otro lado, la marcación de

CC49-TCO con ^{125}I permitió comprobar que la baja captación tumoral observada en la estrategia pre-dirigida, no se debe a una baja captación tumoral de CC49-TCO. La acumulación de CC49-TCO yodado en el tumor fue alta con un 43.53 % DI/g (Tabla 8).

Tabla 8. Biodistribución de ^{125}I -CC49-TCO mediante estrategia pre-dirigida con CC49-TCO y ^{125}I -CC49-TCO en ratones portadores de tumores LS174T.

| Órganos | % Dosis inyectada/gramo de órgano (% DI/g) | |
|-------------------|--|--------------------------|
| | ^{125}I -CC49-TCO | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ |
| | CC49 | 2 h |
| Tumor | 43.53 ± 0.42 | 1.39 ± 0.42 |
| Sangre | 11.08 ± 4.26 | 1.91 ± 0.06 |
| Corazón | 2.74 ± 1.14 | 0.89 ± 0.09 |
| Pulmones | 4.99 ± 1.96 | 1.69 ± 0.01 |
| Hígado | 9.48 ± 1.57 | 8.96 ± 0.55 |
| Bazo | 2.42 ± 0.42 | 0.65 ± 0.03 |
| Estómago | 1.51 ± 0.47 | 0.89 ± 0.09 |
| Intestino grueso | 1.45 ± 0.25 | 0.42 ± 0.18 |
| Intestino Delgado | 1.82 ± 0.23 | 8.07 ± 0.21 |
| Intestinos | 1.67 ± 0.22 | 7.14 ± 0.19 |
| Riñones | 2.78 ± 0.42 | 6.44 ± 1.11 |
| Cerebro | 0.23 ± 0.08 | 0.05 ± 0.02 |
| Músculo | 0.79 ± 0.22 | 0.43 ± 0.05 |
| Hueso | 0.81 ± 0.42 | 0.54 ± 0.02 |
| Piel | 3.04 ± 0.97 | 1.91 ± 0.15 |
| | % Dosis Inyectada (%DI) | |
| Vejiga y orina | 36.47 ± 9.23 | 52.30 ± 2.71 |

5.4 Discusión y conclusiones

El uso de radionmunoconjugados como agentes de imagen o terapia se ha visto limitado por la farmacocinética intrínseca de dichas biomoléculas. Las estrategias pre-dirigidas surgen con el fin de evadir dichos inconvenientes y se basan en separar la administración del AcMo y el radionucleido. La administración independiente de ambos componentes implica que los mismos se deben combinar *in vivo* en el propio tumor. En los últimos años, varios trabajos se han enfocado en la búsqueda de reacciones químicas que sea posible llevarlas a cabo en entornos biológicos. Sin embargo, la aplicación de las mismas *in vivo* requiere que la reacción sea excepcionalmente rápida.¹⁸⁹ En reacciones de segundo orden, la velocidad de la reacción depende de la concentración de ambos reactivos y de la constante cinética. Cuanto mayor es el tamaño del organismo, mayor es el volumen de sangre, por lo tanto, si la constante cinética no es lo suficientemente alta se requieren de mayores concentraciones de reactivo. En consecuencia, concentraciones de reactivos elevadas pueden resultar en problemas de toxicidad. En este sentido, entre los abordajes bio-ortogonales descritos hasta el momento, la reacción entre [1,2,4,5]tetrazina y TCO es la que mejor satisface dichos requerimientos.

Los trabajos realizados durante esta etapa del presente trabajo estuvieron enfocados en evaluar el potencial de la estrategia pre-dirigida, en base a la reacción de cicloadición entre [1,2,4,5]tetrazinas y TCO, como estrategia de marcación de biomoléculas para el diagnóstico de cáncer. Debido a que en el abordaje planteado en el capítulo I no fue posible evaluar el potencial de las reacciones bioortogonales *in vivo*, es que se seleccionó un nuevo sistema biológico como prueba de concepto. Así, se decidió evaluar la estrategia en estudio mediante la detección de TAG-72 a través del reconocimiento del AcMo CC49 en un modelo murino de cáncer de colon.

Para que la estrategia de marcación pre-dirigida signifique un avance respecto de la estrategia de marcación clásica, además de los requisitos antes mencionados, la segunda etiqueta bio-ortogonal debe ser eliminada del organismo de forma rápida. En nuestro sistema de estudio se seleccionó como etiqueta bio-ortogonal un derivado de tetrazina marcado con ^{99m}Tc a través del agrupamiento coordinante que aporta HYNIC.

En este sentido, se ha visto que es posible modificar el perfil farmacocinético de las biomoléculas marcadas con ^{99m}Tc via HYNIC, a partir del uso de diferentes coligandos.¹⁹⁰ Con esto en mente, es que se estudió la marcación del derivado **1** utilizando tricina, EDDA

y una mezcla de tricina/EDDA como coligandos. La elección del coligando utilizado en la marcación vía HYNIC es un aspecto relevante en la evaluación biológica. Se realizaron estudios *in vitro* orientados a explorar la estabilidad, lipofilidad y unión a proteínas de los distintos complejos, con el fin de predecir patrones de biodistribución. Por ejemplo, en el caso de péptidos radiomarcados, se ha observado que aquellos que se eliminan del torrente sanguíneo con mayor rapidez son aquellos con Log P cercanos a -3.³¹ Los valores de Log P calculados en el caso de este trabajo de tesis doctoral, revelaron que los coligandos estudiados no generaron grandes modificaciones en los valores obtenidos. Sin embargo, el derivado más hidrofílico es aquel que se marcó utilizando exclusivamente tricina como coligando, con un Log P de -0.54 ± 0.07 . Las elevadas PRQ obtenidas en tiempos cortos de reacción, sumado al hecho de presentar el menor porcentaje de unión a proteínas y buena estabilidad en las condiciones evaluadas, motivó el uso de **1d**-^{99m}Tc para estudiar la reacción bio-ortogonal *in vitro* e *in vivo*.

Para la evaluación de la reacción de cicloadición entre el derivado obtenido y TCO, se conjugó el AcMo CC49 con TCO, utilizando una relación 10:1. El ensayo de titulación, permitió comprobar la presencia de unos 8.5 ± 0.1 TCO reactivos por molécula de anticuerpo, similar a lo observado en otros trabajos.^{137,167} Luego de comprobar que la inmunoreactividad del anticuerpo no se vio afectada luego del proceso de conjugación, se procedió a estudiar la reacción de cicloadición. Con dicho fin, se estudió la reacción entre **1d**-^{99m}Tc y CC49-TCO mediante enfoque pre-dirigido utilizando BSM inmovilizada en placas de ELISA y en un cultivo de células LS174T. En ambos casos fue posible demostrar que la estrategia fue exitosa en entornos biológicos de complejidad creciente.

Finalmente, se procedió a realizar la evaluación biológica. En primer lugar, se estudió la biodistribución del derivado **1d**-^{99m}Tc en ratones normales. Los resultados obtenidos revelaron una rápida eliminación de la sonda radioactiva de la sangre y de la mayoría de los órganos a excepción de hígado, intestinos y riñón, que mostraron % DI/g elevados principalmente a 1 y 4 h, persistiendo pero en menor grado a 24 h. En su trabajo, casi en simultáneo, Valliant et al, describieron la marcación de un derivado tetrazina via HYNIC (Figura 44), con las diferencias que el heterociclo tetrazina está desmetilado. Sin embargo, a pesar de la diferencia estructural, en dicho trabajo se observó la misma tendencia en la biodistribución, con acumulación inespecífica en los órganos del tracto gastrointestinal y riñones.¹⁶³

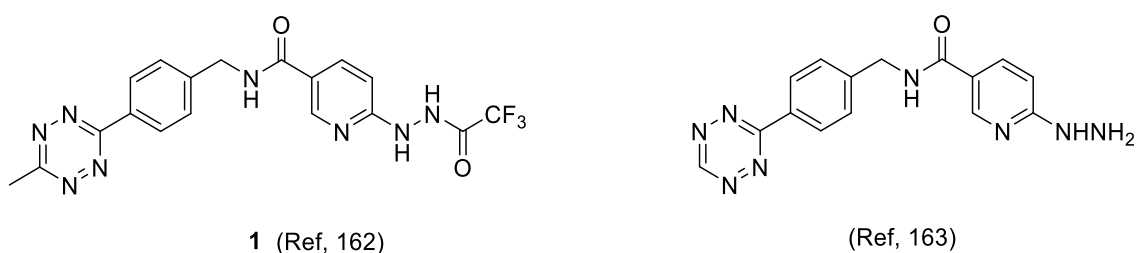


Figura 44. Derivados de [1,2,4,5]tetrazina portadores de ligando HYNIC.

Seguidamente, se evaluó la reacción *in vivo*, mediante una estrategia pre-dirigida en dos pasos, en un modelo murino de cáncer de colon. Con el objetivo de reducir la señal de fondo proveniente de la reacción del derivado radiomarcado con el CC49-TCO circulante en sangre luego de 48 h, se administró un agente secuestrante o “clearing agent”. Trabajos previos, demostraron que el uso de un agente secuestrante (albúmina conjugada con galactosa y grupos tetrazina) es capaz de reducir el nivel de CC49-TCO circulante, reduciendo los %DI/g en sangre y en consecuencia reduciendo la señal de fondo. Así, en los experimentos realizados en esta tesis doctoral, luego de 2 h de la administración del “clearing agent” se inyectó el derivado **1d**-^{99m}Tc. Las imágenes adquiridas 2 h después, permitieron evidenciar la reacción de cicloadición *in vivo*. Además, se comprobó que la señal a nivel tumoral se debió a la reacción bio-ortogonal por acumulación de CC49-TCO a nivel tumoral y no debido a una acumulación inespecífica del radiomarcado en el tumor. Sin embargo, y como lo había sugerido el perfil de biodistribución, se observó importante acumulación inespecífica del radiotrazador a nivel abdominal.

Un estudio de biodistribución, utilizando el mismo protocolo de administración de las imágenes, reveló una modesta acumulación a nivel tumoral con un valor de 1.39 ± 0.42 %DI/g y resultando en una relación tumor/músculo de 3.2. El estudio con ¹²⁵I-CC49-TCO sugiere que la baja captación tumoral observada en la estrategia pre-dirigida, no se debe a una baja captación tumoral de CC49-TCO sino probablemente a la captación inespecífica de **1d**-^{99m}Tc en los órganos del tracto gastrointestinal y riñones. Cabe destacar que otros derivados tetrazina que han sido marcados con distintos radionucleidos y que presentan una biodistribución más favorable, tienen coeficientes de reparto *n*-octanol/fase acuosa menores a -2.¹⁹¹ Estos antecedentes sugieren que incrementar la

hidrofilidad del derivado tetrazina-HYNIC resultará en un perfil de biodistribución más favorable.

En suma,

- Se desarrolló un derivado HYNIC-tetrazina con el grupo hidrazino protegido por un resto trifluoroacetilo.
- El mismo se marcó con ^{99m}Tc de manera eficiente en condiciones de reacción suaves. El compuesto radiomarcado se mostró estable *in vitro* e *in vivo*.
- Se evaluó la reacción entre **1d**- ^{99m}Tc y TCO *in vitro* mostrando resultados alentadores.
- La evaluación de la reacción *in vivo*, con la prueba de concepto seleccionada, a través de la imagen SPECT del tumor basada en una estrategia pre-dirigida con ^{99m}Tc fue positiva. Sin embargo, el perfil de biodistribución y los estudios de imágenes indicaron la necesidad de un derivado de ^{99m}Tc -HYNIC-tetrazina más hidrofílico.

5.5 Materiales y Métodos

5.5.1 Estabilidad de **1**

La estabilidad del derivado **1** se evaluó en PBS y BSA al 10 % a lo largo del tiempo y a temperatura ambiente. Para tal fin se disolvieron 10 µg de **1** (1 µg / µL en DMSO) en un volumen final de 100 µL de PBS (0.01 M, pH 7.4) o en BSA (10 %, PBS 0.01 M, pH 7.4). Las mezclas se incubaron durante 1, 2, 4 y 24 h. Cada experimento se realizó por triplicado y es seguido por absorción a 540 nm (BioTek 100 Tigan St Winooski, VTUSA).

5.5.2 Marcación con ^{99m}Tc

Coligando Tricina

Las marcaciones de **1** con tricina se realizaron de acuerdo a la reacción optimizada en la sección 4.5.9

Coligando EDDA

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan 125 µL de una disolución de EDDA (120 mg/mL en NaOH (1M), 7.1 µmol) y 20 µg de **1** (1 µg/µL, 0.46 nmol). Seguidamente se adicionan 20 µL de una disolución de SnCl₂ recién preparada (2 mg/mL en etanol, 17.7 µmol) y 37-111 MBq de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 µL). La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C en un baño agua. La PRQ del marcado se determinó según los sistemas descritos en sección 4.5.9.

Coligando tricina/EDDA

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan 100 µL de una disolución de tricina en agua (100 mg/mL, 55.8 µmol), 125 µL de una disolución de EDDA (120 mg/mL en NaOH (1M), 7.1 µmol) y 20 µg de **1** (1 µg/µL, 0.46 nmol). Seguidamente se adicionan 20 µL de una disolución de SnCl₂ recién preparada (2 mg/mL en etanol, 17.7 µmol) y 37-111 MBq de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 µL). La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C en un baño agua. La PRQ del marcado se determinó según los sistemas descritos en sección 4.5.9.

5.5.3 Estabilidad de tetrazina radiomarcada

La estabilidad *in vitro* de los radiomarcados se evaluó en PBS y en la mezcla de reacción a 25 °C, luego de 2, 4 y 24 h de incubación (triplicado) se controló por HPLC (en las condiciones indicadas en la sección 4.5.9).

5.5.4 Coeficiente de reparto *n*-octanol/fase acuosa

Los valores del Log P se determinaron por triplicado de la siguiente manera. Los diferentes complejos radiomarcados se purificaron mediante HPLC (fase reversa con columna C18 con el método 2), seguido de purificación de cartucho C18 SEP-PAK con etanol al 50 % en PBS y purgado con N₂. **Método 2:** Agua/TFA 0.1% (A) y acetonitrilo/TFA 0.1% (B), 0% a 3% B en 3 min, 3% a 25% B en 0.1 min. , 25% a 30% en 20 min, 30% a 90% en 2 min, 90% 3 min, 90% a 3% en 2 min, 3% 5 min. Una cantidad apropiada del complejo radiomarcado (6475 MBq / mg) se diluyó en PBS para obtener una concentración final de 200,000 cpm/mL. Una mezcla de 500 µL de *n*-octanol y 500 µL de las disoluciones respectivas de ^{99m}Tc-HYNIC-tetrazina se mezclaron vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recogieron tres fracciones de 100 µL de ambas fases de cada tubo y se contó la radiactividad en un contador de pozos NaI. El coeficiente de partición se obtuvo como log₁₀ (cpm de *n*-octanol /cpm de fase acuosa).

5.5.5 Ensayo de unión a proteínas

La fracción unida a proteínas plasmática se determinó para los complejos con coligando tricina y coligando EDDA. Los complejos radiomarcados se purificaron en un cartucho C18 SEP-PAK eluído con etanol al 50 % en PBS y se purgaron con N₂. Posteriormente, una mezcla de 100 µL del complejo correspondiente(1,11 MBq) en PBS con 200 µL de suero de ratón se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después del período de incubación, las proteínas se precipitaron con 200 µL de ACN y se centrifugaron durante 4 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se recogió y el precipitado se resuspendió en PBS y se centrifugó de nuevo. Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en contador de pozo de NaI. Se calculó el porcentaje de actividad asociado a proteínas.

5.5.6 Producción de CC49

El AcMo CC49 se purificó a partir del medio de un cultivo de hibridoma CC49 (ATCC) usando cromatografía de afinidad de proteína A (MABTRAP, GE Health Sciences). El anticuerpo purificado se concentró a 5 mg/mL en disolución salina tamponada con PBS, pH 7.4, se alicuotó y se almacenó a -80°C antes de su uso.

5.5.7 Conjugación CC49 con NHS-TCO

Para la conjugación del anticuerpo monoclonal CC49 se procedió de acuerdo a Robillard et al. Se conjugaron 2.4 mg (16 nmol) de una disolución de CC49 (11 mg/mL) con NHS-TCO en una relación molar (10:1). A 240 μ L de disolución de anticuerpo se le adicionan 15 μ L de buffer carbonato (1 M, pH 9.6). Seguidamente se adicionaron lentamente 9 μ L de NHS-TCO disuelto en DMSO anhidro (Click Chemistry Tools, 5 mg/mL, 1.6×10^{-7} mol) y PBS (0.01 M, pH 7.4) en una cantidad suficiente para un volumen final de 500 μ L. Se incubó 30 min en agitación y oscuridad. Finalmente se purificó por PD-10 con PBS (0.01 M, pH 7.4) y se determinó concentración a través de medida de absorbancia a 280 nm. La disolución se conservó a 4 °C.

5.5.8 Número de TCO reactivos por molécula de anticuerpo

El número de TCO reactivos por molécula de anticuerpo se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE (gel GeneScript ExpressPlus 8 %). Para ello se estudió la cicloadición utilizando distintas relaciones molares de **1d**-^{99m}Tc con respecto a CC49-TCO. Se incubaron alícuotas de 25 μ g de la preparación CC49-TCO con 1, 5, 10, 15 eq de **1d**-^{99m}Tc. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min. Seguidamente, alícuotas de cada reacción fueron sembradas (LDS no reductor 4X) en un gel de poliacrilamida homogéneo al 8 % (GeneScript ExpressPlus PAGE) y separadas mediante electroforesis utilizando un buffer de corrida MOPS SDS NuPAGE®. Imágenes del gel se adquirieron en un sistema de imágenes (PMI™, Bio-Rad). Luego de su análisis el porcentaje de tetrazina unida se determinó mediante el porcentaje de radioactividad asociada con las bandas de AcMo. Número de TCOs / AcMo = (n° eq tetrazina) \times (% de tetrazina unida). Se realizó tinción de proteínas con Coomassie para confirmar la ubicación de CC49-TCO y el marcador de peso molecular.

5.5.9 Ensayo de bioactividad de CC49-TCO

Se evaluó el reconocimiento del anticuerpo modificado con TCO mediante un ensayo de ELISA. Para ello, se incubaron 120 μ L de una disolución de mucina submaxilar bovina (5 μ g/mL de BSM) y seroalbúmina bovina (5 μ g/mL de BSA) en una placa de ELISA (96 pocillos, High Binding Nunclon) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se eliminó la disolución, se incubó con 300 μ L buffer de bloqueo Rockland durante 1 h y se lavó tres

veces con 300 μL de 0.1 % de PBS-Tween 20. Seguidamente se incubó cada pocillo con 100 μL de CC49-TCO o CC49 (10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) durante 1 h a 37 °C (por triplicado). Luego de eliminar la disolución de anticuerpo se lavó con 300 μL de 0.1 % de PBS-Tween 20, se adicionó 100 μL de una disolución 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa (HRP: Horseradish peroxidase) en BSA 0.1 %, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados con 0.1 % PBS-tween 1X. Finalmente se adicionó 100 μL de substrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y se midió la absorbancia a 404 nm.

5.5.10 Estudio de la reacción bio-ortogonal *in vitro*

En una placa de ELISA (96 pocillos, High Binding Nunclon) se incubaron 120 μL de una disolución de mucina submaxilar bovina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSM) y seroalbúmina bovina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA) por pocillo, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se eliminó la disolución, se incubó con 300 μL buffer de bloqueo Rockland durante 1 h y se lavó tres veces con 300 μL de 0.1 % de PBS-Tween 20. Seguidamente se incubó cada pocillo con 100 μL de CC49-TCO o CC49 (10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) durante 1 h a 37 °C (por triplicado). Luego de eliminar la disolución de anticuerpo se lavó con 300 μL de 0.1 % de PBS-Tween 20, se adicionó 100 μL de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Tetrazina (1 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$) en 1 % BSA y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se aspira y se lava 3 veces con 0.1 % de PBS-Tween 20. Finalmente, se adicionó 100 μL NaOH (2 M) y luego de 5 min, se colecta en un tubo, se vuelve a adicionar 100 μL NaOH (2 M) y nuevamente se colecta en el mismo tubo y se mide en contador gamma (Perkin Elmer-Wallac Wizard 1480 3 inch Gamma Counter).

5.5.11 Estudio de la reacción bio-ortogonal en cultivo celular

El ensayo en células se llevó a cabo en una placa de 24 pocillos con células de adenocarcinoma de colón humano LS 147T en un 60 % de confluencia. Luego de aspirado el medio, se lavó con buffer PBS (0.01 M) y BSA (1 %). Se adicionaron 200 μL de CC49-TCO o CC49 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se incubó 30 min en 37 °C. Se eliminó el exceso de reactivo, se lavó con buffer PBS (0.01 M) y se agregó una disolución de **1d**- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1 $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{L}$, 200 μL). Se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente y se lavó 2 veces con 600 μL de buffer PBS (0.01 M). Finalmente, se adicionó 300 μL de NaOH (2 M), se

incubó durante 10 min y se colectó en un tubo para su cuantificación en un contador gamma.

5.5.12 Estudios biológicos *in vivo*

5.5.12.1 Modelo tumoral

Los estudios de imagen fueron realizados en un modelo murino de cáncer de colon. Para dicho propósito se utilizó un modelo tumoral en ratones BALB/c atímicos (Nu/Nu) inoculando 2 millones de células LS 174T (PBS:Matrigel, 2:1) en forma subcutánea en la zona dorsal del animal. Luego de aproximadamente un mes los tumores alcanzan una masa de 1 g. Los experimentos fueron realizados en la Universidad de Missouri (USA) y los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Missouri.

5.5.12.2 Biodistribución de $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$

El comportamiento biológico de $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TZ se evaluó mediante un ensayo de biodistribución en ratones CD-1 normales. Para ello, los animales fueron inyectados por vía intravenosa a través de la vena de la cola con $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$ (0.17-0.74 MBq, 5.55 GBq/mg) y sacrificados después de 1, 4 y 24 h (n = 3). Los órganos y tejidos de interés se diseccionaron, pesaron y la radioactividad de las muestras se midió en un contador gamma. La radioactividad en la orina y las heces también se determinó. La radioactividad se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) o porcentaje de dosis inyectada (% DI). La cantidad total de sangre se consideró como el 6.5 % del peso corporal total.

5.5.12.3 Imágenes SPECT-CT. Estudio de la reacción bio-ortogonal en modelo tumoral murino

La reacción bio-ortogonal se evaluó mediante una estrategia pre-dirigida en ratones portadores de tumor (n=2). Con dicho fin, en una primera etapa los ratones fueron administrados con 100 μg de CC49-TCO de forma intravenosa. Cuarenta y ocho horas posterior a la administración del anticuerpo, se les administró 160 μg de agente secuestrante (albúmina conjugada con galactosa y grupos tetrazina, Tagworks Pharmaceuticals, Holanda). Dos horas después, en un tercer paso se administró de forma intravenosa $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$ (relación molar 1:1 de grupos TCO: $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$, 7.4 MBq/ μg ~ 21 MBq en 100 μL). El grupo control de ratones recibió únicamente $1d\text{-}^{99m}\text{Tc}$. Después de

2 h los ratones se anestesiaron con isoflurano al 1-2 % y las imágenes SPECT-CT se adquirieron con una unidad Siemens Inveon SPECT/CT (Siemens Medical Solution Incorporated, TN, EE. UU.) equipadas con detectores duales de NaI pixelados, multi-colimadores diminutos de 1.0 mm, un detector de rayos X CCD y una fuente de rayos X de microfocus de 80 kVp. Los datos volumétricos de SPECT se generaron mediante el método de maximización de expectativas mediante subconjuntos ordenados u OSEM (del inglés, *ordered subset of expectation maximisation method*), con correcciones geométricas de desalineación. Se realizaron imágenes simultáneas de micro-CT en todo el cuerpo para permitir la fusión de datos anatómicos y moleculares.

5.5.12.4 Biodistribución. Estudio de la reacción bio-ortogonal en modelo tumoral murino

El estudio de biodistribución pre-dirigido siguió el protocolo descrito para los animales destinados a los estudios de imágenes (5.5.12.3), excepto que los mismos fueron sacrificados a las 2 h para el estudio de biodistribución (n=3) y se procesó de acuerdo al procedimiento (5.5.12).

5.5.12.5 Biodistribución de ^{125}I -CC49-TCO

El AcMo ^{125}I -CC49-TCO se preparó de acuerdo con Rossin y Robillard.¹⁶⁷ Se utilizó el modelo tumoral inducido con células LS 174T. Cincuenta y una horas después de la administración intravenosa, los animales (n=3) se sacrificaron y se realizó el estudio de biodistribución. El tiempo de distribución de 51 h para el ^{125}I -CC49-TCO se seleccionó en base al protocolo pre-dirigido.

6 Capítulo III

6.1 Objetivos específicos

- 1- Diseñar y sintetizar derivados de [1,2,4,5]tetrazina hidrofílicos sustituidos adecuadamente para su marcación con ^{99m}Tc . Estudiar la incorporación de espaciadores y/o quelantes hidrofílicos como estrategia para modificar el perfil de biodistribución de las tetrazinas marcadas con ^{99m}Tc .
- 2- Marcación con ^{99m}Tc de los derivados obtenidos.
- 3- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de estabilidad e hidrofiliidad, así como también sus propiedades biológicas.
- 4- Estudiar la reacción bio-ortogonal utilizando el mejor derivado tetrazina- ^{99m}Tc . Aplicar el enfoque pre-dirigido en la marcación *in vivo* de un anticuerpo dirigido específicamente contra el factor de crecimiento del endotelio vascular en un modelo de melanoma murino.

6.2 Antecedentes y fundamentos

En la búsqueda de una estrategia de marcación pre-dirigida basada en la reacción bio-ortogonal entre TZ y TCO en el capítulo II se describió la marcación de un anticuerpo monoclonal *in vivo*, mediante la obtención de un derivado tetrazina marcado con ^{99m}Tc .

Sin embargo, a pesar de haber logrado una prueba de concepto positiva, el perfil de biodistribución y los estudios de imágenes revelaron la necesidad de un derivado de ^{99m}Tc -HYNIC-TZ más hidrofílico.^{162,163}

Para superar esto, la nueva hipótesis de trabajo se basó en que la incorporación de modificaciones en la estructura del derivado de TZ, orientadas a aumentar la hidrofilia del compuesto. Esto resultaría en un cambio en la farmacocinética del mismo aumentando la vía de eliminación renal. Para ello se consideraron cambios estructurales en base a la incorporación de un espaciador que aportase polaridad a la molécula o la incorporación de otros quelantes bifuncionales que cambiase la hidrofilia del radioagente final.

Como prueba de concepto se seleccionó la detección de VEGF a través del anticuerpo monoclonal bevacizumab en un modelo de melanoma murino.

Bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado, aprobado en el 2004 para el tratamiento de primera línea de cáncer de colon y recto metastásicos en combinación con quimioterápicos. Fue el primer agente terapéutico diseñado para tratar la angiogénesis tumoral y está indicado actualmente para el tratamiento de una variedad de tipos de cáncer.¹⁹² En la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar pacientes que respondan a las terapias anti-VEGF, varios grupos han explorado el potencial de bevacizumab como agente de imagen.¹⁹³ Antecedentes de nuestro grupo de trabajo demostraron el potencial del mismo como agente de imagen SPECT a nivel preclínico.^{158,194} Sin embargo, a pesar de los resultados promisorios, es necesario explorar estrategias con el fin de reducir los inconvenientes que surgen de la farmacocinética del radioinmunoconjugado.

En relación con el requisito de utilizar blancos de membrana en estrategias pre-dirigidas, VEGF representa un blanco molecular adecuado como prueba de concepto. Está demostrado que una porción del VEGF es secretado mientras que parte del mismo se asocia a la membrana celular y matriz extracelular a través de su unión a proteoglicanos de heparán sulfato o HSPGs (del inglés, heparin and heparan sulphate proteoglycans).¹⁹⁵

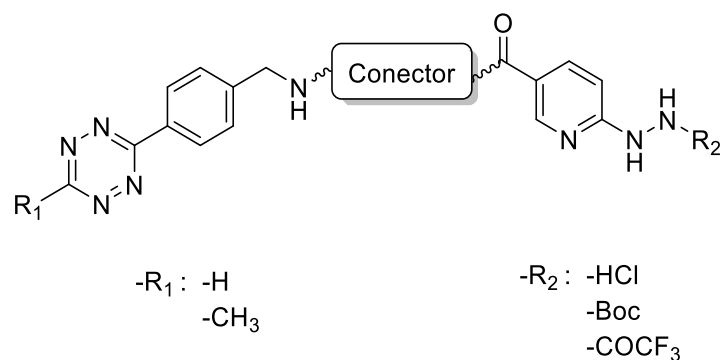
Así, es de suponer que su disponibilidad a nivel extracelular resulte en una promisorio herramienta para que se lleve a cabo la reacción bio-ortogonal entre TZ y TCO.

La elección del modelo tumoral se basó en antecedentes de nuestro grupo de trabajo evaluando bevacizumab como agente de imagen molecular, donde fue posible demostrar que además de reconocer el VEGF humano también es capaz de reconocer formas procesadas de VEGF murino presentes en tumores de melanoma inducido con células B16-F10.¹⁵⁸

6.3 Resultados

6.3.1 Síntesis orgánica

Con el objetivo de sintetizar derivados TZ portadores de ligando HYNIC, que posean mayor polaridad se planteó explorar la incorporación de estructuras espaciadoras de acuerdo con el Esquema 15.

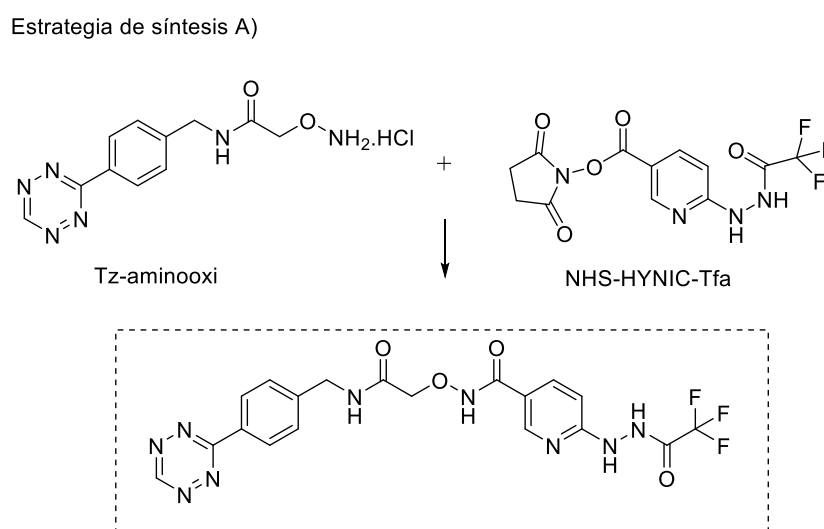


Esquema 15. Diseño de derivados de TZ planteados con el objetivo de incorporar espaciadores hidrofílicos.

El derivado planteado inicialmente (Esquema 16) se diseñó suponiendo que la introducción de un enlace ácido hidroxámico y la ausencia de grupo metilo en el heterociclo tetrazina podrían aportar polaridad a la molécula y por ende afectar la hidrofilia del compuesto anteriormente desarrollado. Está descrito que el grupo aminooxi reacciona selectivamente con grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) en una variedad de disolventes y sin necesidad de catálisis. La reactividad del grupo aminooxi se explica por el efecto- α , debido a la presencia del átomo de oxígeno (electronegativo y con electrones libre) en posición α al grupo amino, lo que resulta en un aumento de la nucleofilia de dicho centro. Además, las aminas primarias cuando se presentan bajo su forma protonada presentan un pKa de 9-10, mientras que la forma protonada del grupo aminooxi presenta un pKa entre 5-6.

Si bien el grupo aminooxi reacciona de forma quimioselectiva con al aldehídos y cetonas, existen antecedentes de reactividad con otros electrófilos como cloruro de acilos,¹⁹⁶ ácidos carboxílicos activados,^{197,198} anhídridos,¹⁹⁹ imidas,¹⁹⁹ ésteres,²⁰⁰ epóxidos²⁰¹ y haluro de alquilo.²⁰² En base a esto, inicialmente se partió de un derivado tetrazina comercial, portador del grupo funcional hidroxilamina, y un derivado de HYNIC activado y con la función hidracina protegida con un grupo trifluoroacetilo (Estrategia A, esquema

16). Distintas condiciones de reacción fueron estudiadas (Tabla 9), sin embargo sólo en la condición 4 fue posible aislar un producto con un rendimiento extremadamente bajo (2 %), que sólo permitió su caracterización mediante espectrometría de masas. En la Figura 45 se presenta el espectro de masas y se esquematiza el patrón de fragmentación para el producto obtenido, el cual sugiere la obtención del producto deseado (Esquema 17). Los malos resultados, en todas las condiciones estudiadas, podrían deberse a la baja reactividad, pobre solubilidad de los reactivos en las condiciones estudiadas, aparición de múltiples productos secundarios (observados cromatográficamente), dificultad en remover los productos de las fases estacionaria en la cromatografía, además de descomposición notoria con el tiempo de los crudos de reacción obtenidos.



Esquema 16. Estrategia de síntesis planteada (A).

| | Reactivos ^a | Condiciones | Purificación | Rendimiento (%) ^b |
|----------|---|----------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | TZ-aminooxi (30 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.6 eq), DIPEA (1.2 eq) | THF (seco), 30 h T amb | Cromatografía en capa fina en sílica y CH ₂ Cl ₂ /MeOH (8:2) | x |
| 2 | TZ-aminooxi (30 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.2 eq), DIPEA (1.2 eq) | THF (seco), 2 h reflujo | Cromatografía en capa fina en sílica y CH ₂ Cl ₂ /MeOH (8:2) | x |

| | | | | |
|----------|---|--------------------------|---|----------|
| 3 | TZ-aminoxí (15 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.2 eq), DIPEA (1.2 eq) | DMF, 11 h T amb | Cromatografía, sílica AcOEt:MeOH (98:2) | x |
| 4 | TZ-aminoxí (15 mg, 1 eq), NHS-HYNIC-Tfa (1.6 eq), DIPEA (2 eq), <i>tert</i> -butóxido de potasio | THF (seco)/72 h T amb | Cromatografía en capa fina en sílica y AcOEt:éter de petróleo (9:1) | 2 |

Tabla 9. Condiciones estudiadas para la estrategia de síntesis A) (Esquema 16). ^a hidrocloreto de 2-aminoxi-N-[4-([1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetil]acetamida: TZ-aminoxí. ^b **x**: no fue posible aislar el producto deseado.

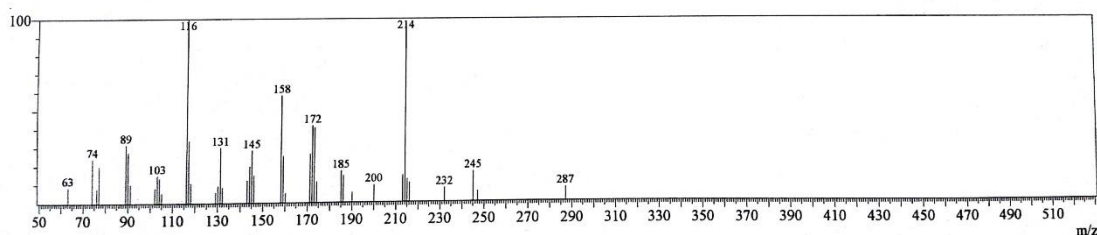
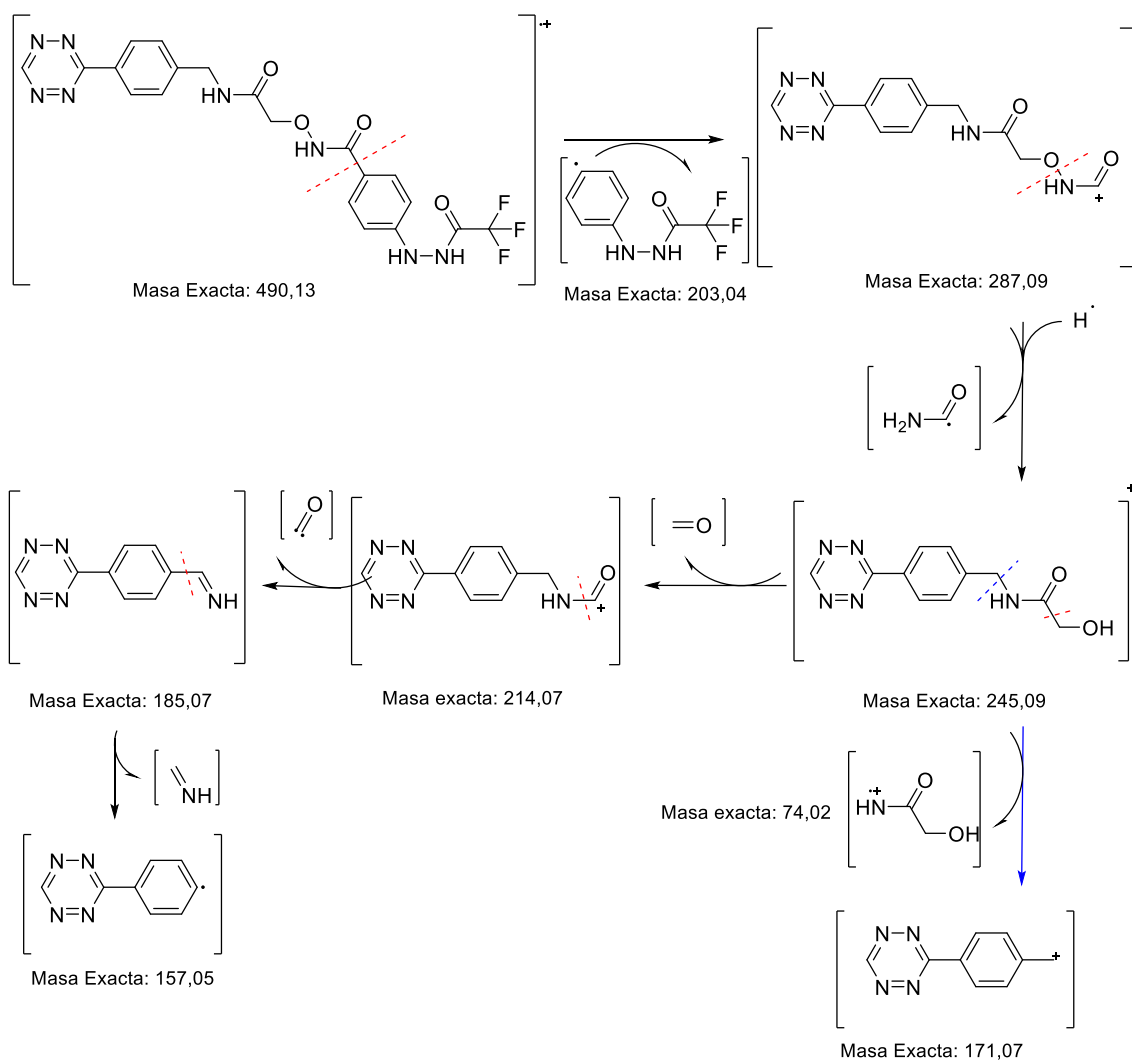


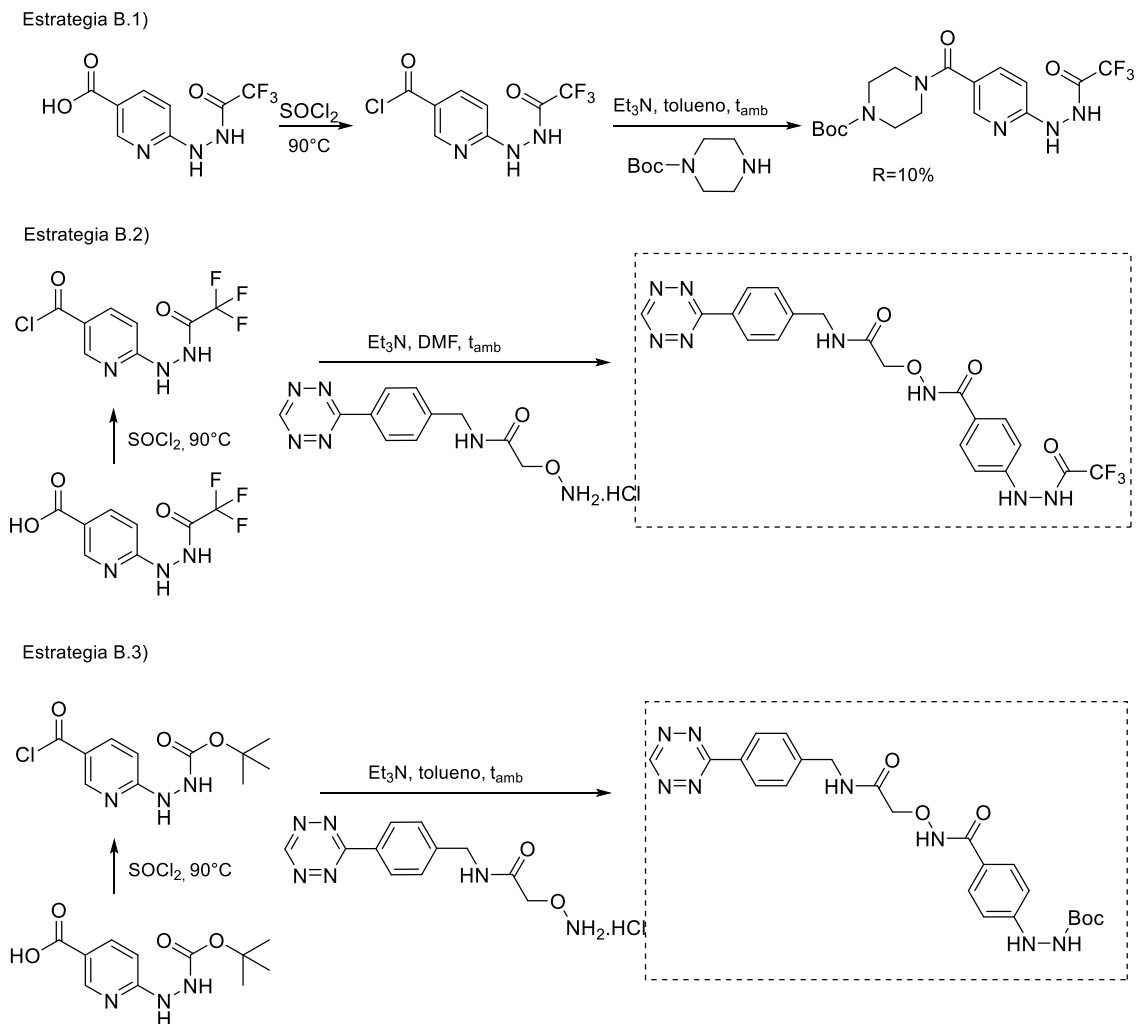
Figura 45. Espectro de masas (IE) del compuesto obtenido en la estrategia A (Esquema 16), condición 4 (Tabla 9).



Esquema 17. Patrón de fragmentación posible que explica los iones observados en el espectro de masas que se presenta en la figura 43.

Seguidamente se exploró la formación del compuesto deseado (Esquema 16) a partir de la generación del cloruro de ácido de un derivado de HYNIC y subsecuente reacción con el derivado TZ-aminooxi. En una primera instancia y como aproximación a las condiciones de reacción se estudió la reacción de activación del ácido HYNIC-Tfa con SOCl_2 y posterior reacción del haluro de acilo obtenido con piperazina mono-prottegida (Esquema 18, estrategia B.1). Luego de una reacción en dos pasos, y un proceso de purificación, el producto se obtuvo con un rendimiento del 10 %. Seguidamente, se pasó a la reacción con el sistema de interés (Esquema 18, Estrategia B.2). Sin embargo, a pesar de haber utilizado las mismas condiciones de la estrategia B.1, no se logró aislar el

producto deseado. Un resultado similar se obtuvo cuando se estudió la reacción con el derivado HYNIC con el grupo protector Boc (Esquema 18, Estrategia B.3).



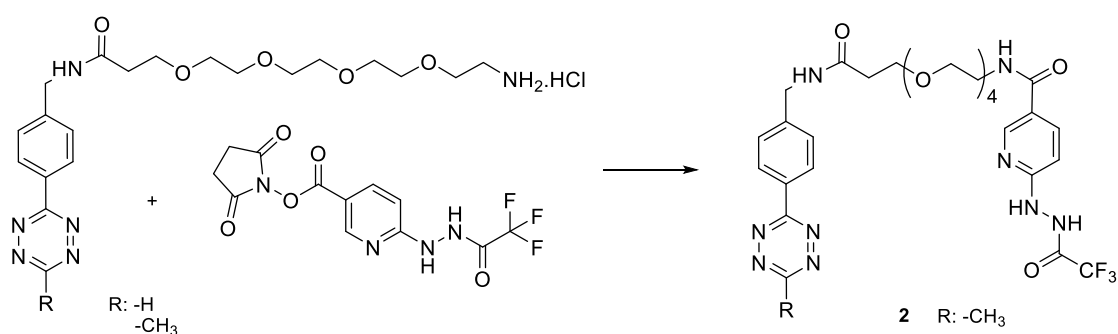
Esquema 18. Estrategia de síntesis planteada (B).

Ante los infructuosos resultados descritos previamente se decidió desarrollar un derivado hidrofílico que contenga un espaciador de tipo polietilenoxi ya que las [1,2,4,5]tetrazinas de partida se encuentran disponible comercialmente. Se propuso una ruta sintética sencilla (Esquema 19, Estrategia C), en un único paso, de acople del ligando bifuncional con dos derivados tetrazina-PEG4-amina. La elección de las tetrazinas, metil o de-metil sustituida, se basó en las diferencias en reactividad de las mismas en la IEDDA con

TCO.¹³⁵ El derivado **2** se obtuvo a partir de la reacción de acoplamiento entre una tetrazina-PEG4-amina sustituida con metilo comercialmente disponible y 6-trifluoroacetilhidracinonicotinato de succinimidinilo en una mezcla de DMF/THF a temperatura ambiente durante 24 h. El rendimiento final del compuesto purificado fue del 22 %. El perfil de HPLC (UV) obtenido para **2** se observa en la Figura 46. Si bien se ensayaron iguales condiciones cuando se utilizó la tetrazina de-metilada no fue posible aislar el producto deseado, observándose descomposición del crudo en las condiciones estudiadas, evidenciado por la pérdida del color característico del sistema [1,2,4,5]tetrazina (absorción a 540 nm).

Con la tetrazina **2** se realizaron estudios químicos, fisicoquímicos y biológicos que se describirán más adelante.

Estrategia C)



Esquema 19. Estrategia de síntesis planteada para otra TZ hidrofílica (C).

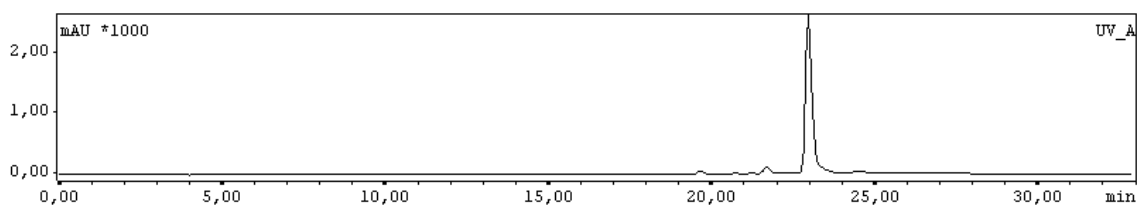
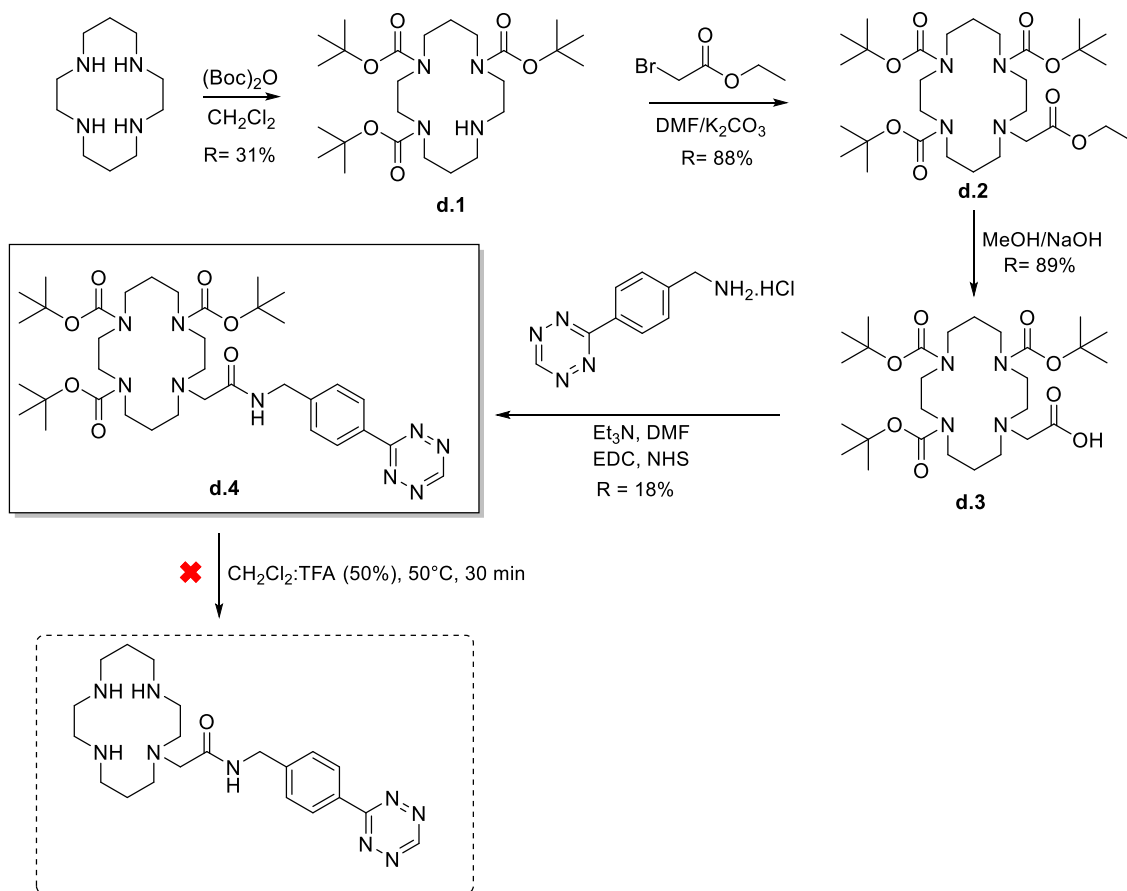


Figura 46. Perfil de HPLC (UV 280 nm) observado para el compuesto **2**.

Seguidamente se planteó explorar modificaciones estructurales a nivel del quelante bifuncional que mejoren la hidrofilia del complejo final. Para ello, en base a los antecedentes del trabajo Doctoral de Vania Texeira,²⁰³ se estudió la utilización del derivado macrocíclico conocido como cyclam, que presenta una estructura de tipo tetraamino. Está descrito que cyclam forma complejos di oxo de Tc(V) con carga neta +1 que, presentando eliminación renal.²⁰⁴ La síntesis fue realizada según una metodología sintética descrita recientemente que incluye la incorporación de una funcionalidad ácido carboxílico que permite el acople al derivado tetrazina.^{203,205} Además, posee tres grupos protectores *t*-butiloxicarbonilo (Boc) que deben ser removidos en la etapa final del proceso de síntesis. En el esquema 20 (estrategia D) se puede apreciar la síntesis empleada. El primer paso consistió en la protección de tres grupos amino con Boc mediante una sustitución nucleofílica (S_N). Seguidamente se incorporó un grupo éster por S_N , que mediante un paso de hidrólisis dio lugar a la formación del ácido carboxílico necesario para la unión a un grupo amino del derivado TZ, a través de una reacción de activación y posterior acople. Finalmente, no fue posible aislar el producto deseado en las condiciones de desprotección estudiadas ya que se evidenció en dichas condiciones descomposición del heterociclo tetrazina.

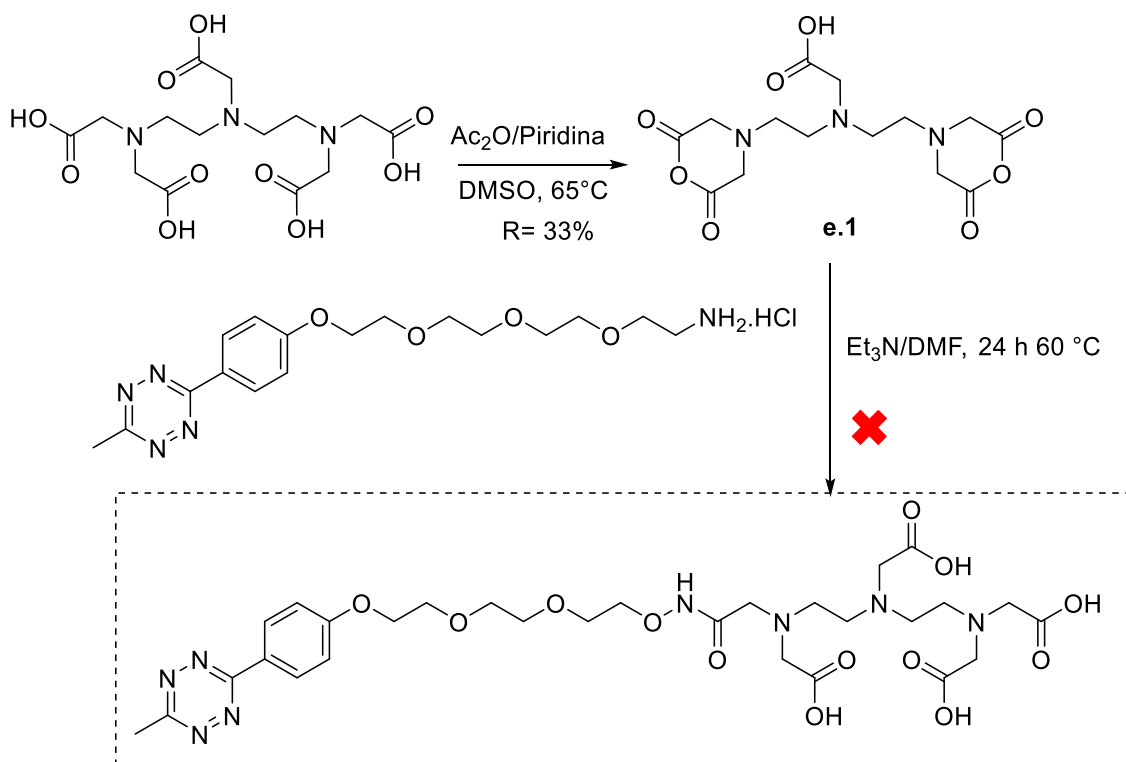
Estrategia D)



Esquema 20. Estrategia de síntesis planteada (D).

En otro abordaje se planteó la incorporación de un fragmento proveniente de un quelante ampliamente utilizado en medicina nuclear, el DTPA. Para ello, se planteó la síntesis del bis anhídrido del ácido dietilentriaminopentacético (**e.1**, Esquema 21) a partir del ácido dietilentriaminopentacético,²⁰⁶ y posterior acople con un derivado tetrazina-PEG4-amina (Esquema 21, Estrategia E). Sin embargo, no se obtuvo el producto deseado, probablemente debido a problemas de solubilidad del anhídrido de DTPA.

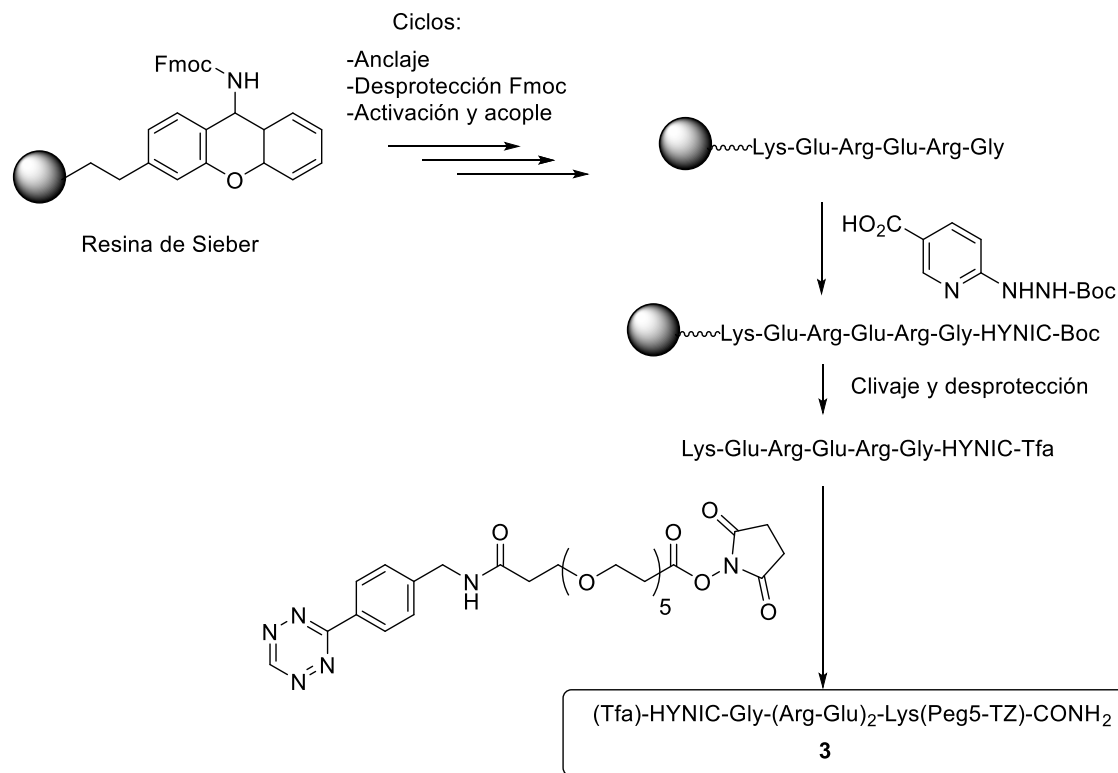
Estrategia E)



Esquema 21. Estrategia de síntesis planteada (E).

Finalmente, con el propósito de aumentar la polaridad de la tetrazina portadora del coordinante HYNIC se propuso la estrategia de síntesis F (Esquema 22). El derivado **3** ((Tfa)-HYNIC-Gly-(Arg-Glu)₂-Lys(Peg5-TZ)-CONH₂) fue preparado por el Prof. Fabio Gallazzi de la Universidad de Missouri. Este derivado incorpora una secuencia peptídica cargada, además de una cadena de polietilenoxi y del agente quelante HYNIC. La síntesis del péptido acoplado al quelante **3a** se llevó a cabo en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático múltiple. Posteriormente, **3a** fue acoplado al derivado comercial TZ-PEG5-NHS a través del grupo amino épsilon de la Lys C-terminal. Finalmente, luego de su purificación mediante HPLC y posterior liofilización, se obtuvo el compuesto **3** como un sólido rosa.

Estrategia F)



Esquema 22. Estrategia de síntesis planteada (F).

A modo de resumen, las estrategias de síntesis planteadas dieron lugar a dos derivados TZ portadores del agrupamiento quelante proveniente de HYNIC. Las estructuras de los compuestos **2** y **3** se presentan en la Figura 47.

La elucidación del producto **2** se realizó mediante experimentos de ¹H RMN, COSY, HSQC, HMBC, ¹³C RMN y espectrometría de masas (IES-EM). A modo de ejemplo, en la Figura 48 se muestra el espectro de masa donde es posible identificar 5 picos mayoritarios, que corresponden a iones monoisotópicos cargados, siendo el pico de 595.18 el correspondiente al ión molecular y el resto a iones producto de la fragmentación. El pico de mayor abundancia, a 539.26, podría corresponder a la fragmentación del grupo tetrazina con pérdida de CH₃N₂. En un estudio del patrón de fragmentación de la 3,6-dimetil-tetrazina, Weiler et al. sugieren una pérdida inicial de -N₂, típico de la fragmentación de tetrazinas, seguido de un paso de descomposición con pérdida de -CH₃.²⁰⁷

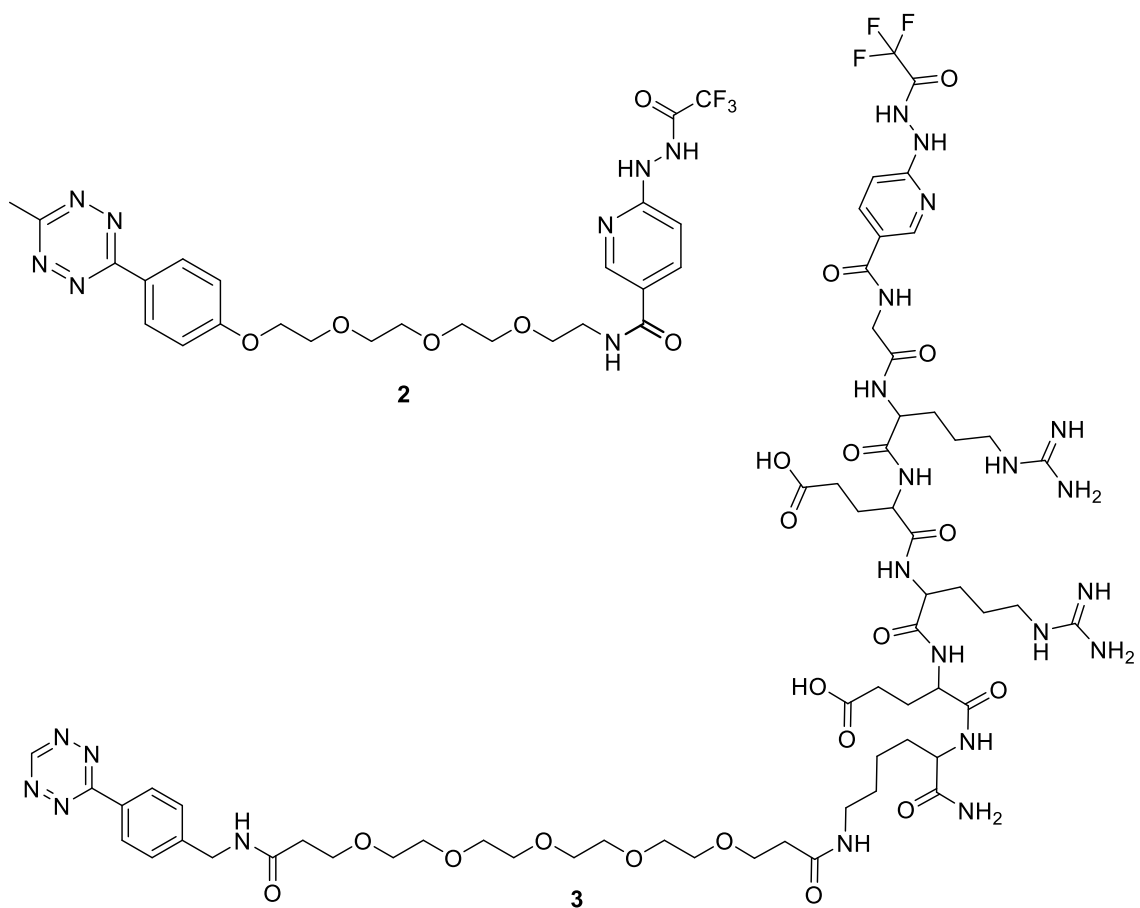


Figura 47. Derivados hidrofílicos de TZ obtenidos.

fernanda-QO_280916 #6104-6533 RT: 13.91-14.85 AV: 430 NL: 3.76E8
T: ITMS + p NSI Full ms [150.00-1000.00]

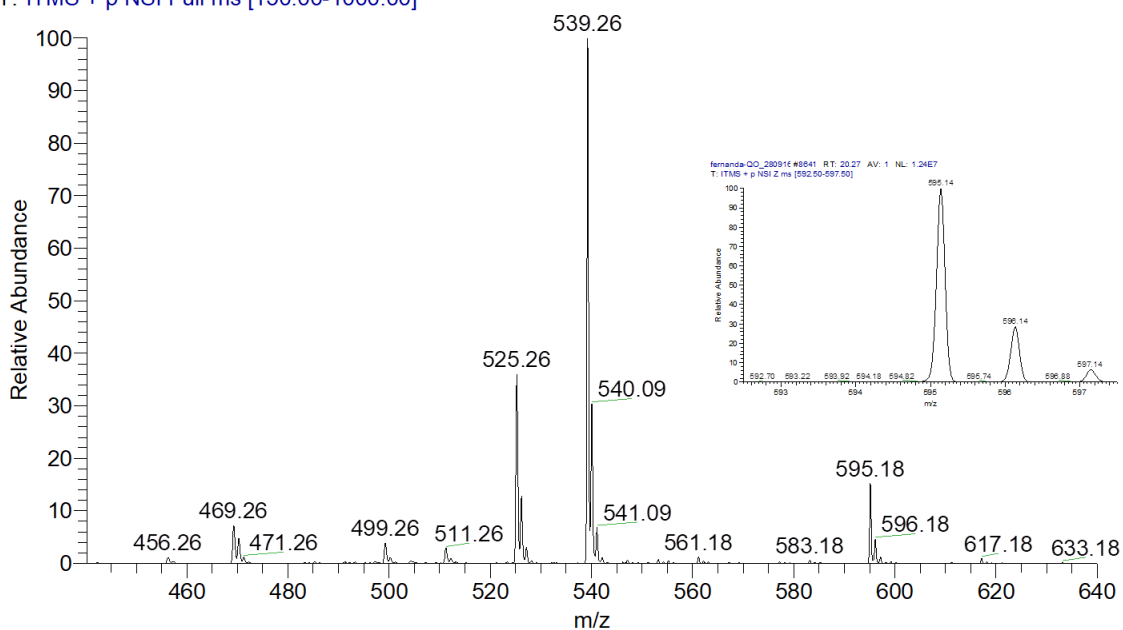


Figura 48. Espectro de masas (IES) del compuesto **2**.

La elucidación del producto **3** se realizó mediante EM (Figura 49). Claramente se pudo observar el monoión de **3**, en su forma protonada (masa esperada de 1493.68 u), y el diión de **3**, en su forma diprotonada (masa esperada de 747.34 u).

T10-2r-bfc #1415-1462 RT: 19.56-20.21 AV: 48 NL: 7.35E2
T: ITMS + c ESI Full ms [200.00-2000.00]

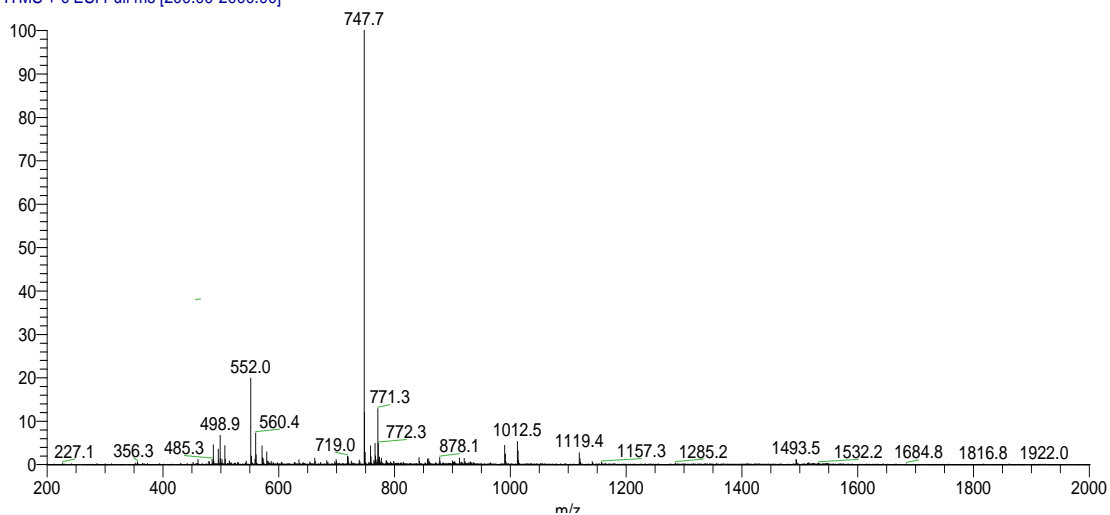


Figura 49. Espectro de masas (ESI) del compuesto **3**.

6.3.2 Marcación con ^{99m}Tc y estabilidad

Se realizó la marcación con ^{99m}Tc de ambos derivados siguiendo un protocolo similar al utilizado en 4.5.9. Brevemente, el procedimiento de marcación de ambos compuestos incluyó la reacción de cada derivado, **2** ó **3**, con $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ a 37 °C durante 30 min en presencia de cloruro estannoso y tricina como coligando. Se seleccionó nuevamente tricina por los resultados de lipofilia mostrados en el capítulo anterior. Los complejos radiomarcados se obtuvieron con rendimientos superiores al 90 % en todos los casos. En las figuras 50 y 51, se presentan los cromatogramas de HPLC de los derivados radiomarcados a partir de **2** y **3**. Como en el caso del derivado **1**, capítulos anteriores, la desprotección del grupo hidracino ocurre en las condiciones de marcación, por tal motivo los complejos son denominados $^{99m}\text{Tc-2d}$ y $^{99m}\text{Tc-3d}$.

Además se comprobó que $^{99m}\text{Tc-2d}$ y $^{99m}\text{Tc-3d}$ son estables en la mezcla de reacción por al menos 24 h (Tabla 10). La incubación de los complejos radiomarcados en PBS a 37 °C reveló una estabilidad moderada, especialmente después de 24 h. Por otro lado, se mantuvieron estables cuando se incubaron con cisteína 1 mM a 25 °C

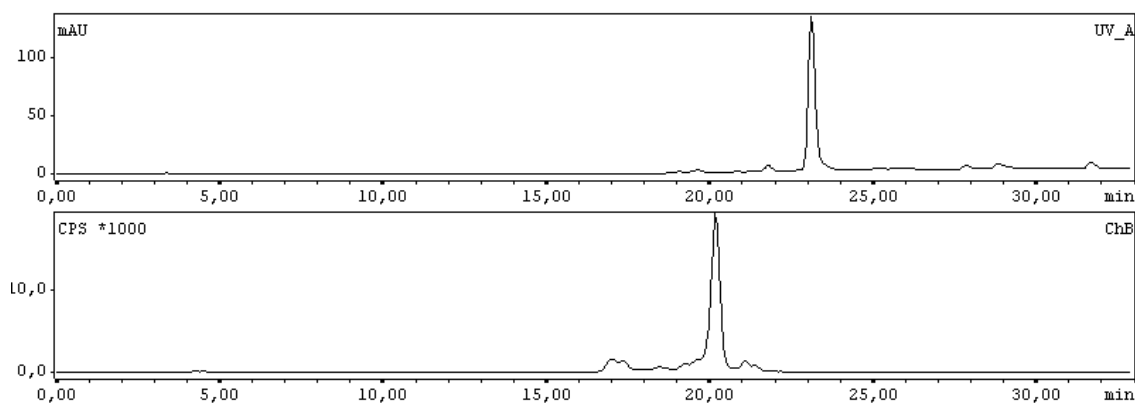


Figura 50. Análisis de HPLC de fase reversa de la reacción de marcación del derivado **2** con ^{99m}Tc . Se muestra el perfil UV del reactivo **2** (arriba, tiempo de retención 23.2 min, Abs 280 nm), y el complejo radiomarcado utilizando tricina como coligando (abajo, tiempo de retención 20.1 min, detección gamma).

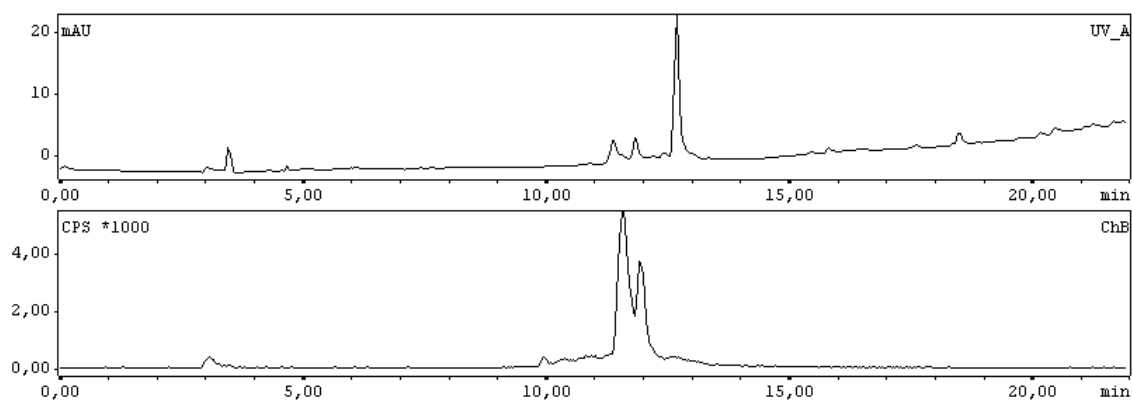


Figura 51. Análisis de HPLC de fase reversa de la reacción de marcación del derivado **3** con ^{99m}Tc . Se muestra el perfil UV del derivado **3** (arriba, tiempo de retención 12.8 min, Abs 280 nm), y el complejo radiomarcado utilizando tricina como coligando (abajo, tiempo de retención 11.5 min, detección gamma).

Tabla 10. Ensayos de estabilidad de derivados radiomarcados a partir de **2** y **3**. La integridad y estabilidad de los compuestos radiomarcados se estudiaron en la mezcla de reacción (25 °C), PBS (37 °C), y cuando se expusieron a cisteína 1 mM (25 °C).

| Tiempo (h) | % Compuesto radiomarcado | | | | | |
|---------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Mezcla de reacción | | PBS | | Cisteína 1mM | |
| | $^{99m}\text{Tc-2d}$ | $^{99m}\text{Tc-3d}$ | $^{99m}\text{Tc-2d}$ | $^{99m}\text{Tc-3d}$ | $^{99m}\text{Tc-2d}$ | $^{99m}\text{Tc-3d}$ |
| 1 | 98.2 | 98.0 | 95.3 | 98.1 | 98.9 | 99.1 |
| 4 | 98.6 | 98.2 | 86.3 | 96.0 | 98.1 | 97.5 |
| 24 | 98.0 | 98.0 | 72.5 | 73.8 | 92.7 | 99 |

6.3.3 Coeficiente de partición, unión a proteínas séricas y caracterización biológica.

El coeficiente de partición en *n*-octanol/PBS de ambos compuestos radiomarcados se muestra en la Tabla 11. Como se esperaba, el compuesto $^{99m}\text{Tc-3d}$ presentó la mayor hidrofilia con un Log P de -1.05 ± 0.02 , mientras que se observó un valor de -0.62 ± 0.03 para $^{99m}\text{Tc-2d}$. Ambos, como también era de esperar, resultaron más hidrofílicos que **1d**- ^{99m}Tc . Por otro lado, los ensayos de unión a proteína revelaron que los porcentaje de unión a proteínas son similares para ambos complejos, $^{99m}\text{Tc-2d}$ exhibió una fracción del $14 \pm 3\%$ unido a proteína, mientras que $^{99m}\text{Tc-3d}$ un $16 \pm 4\%$.

Tabla 11. Valores de coeficientes de partición n-octanol/PBS para los radio-derivados obtenidos

| Derivado TZ | Log P |
|----------------------|--------------|
| ^{99m} Tc-1d | -0.54 ± 0.07 |
| ^{99m} Tc-2d | -0.62 ± 0.03 |
| ^{99m} Tc-3d | -1.05 ± 0.02 |

Con el objetivo de confirmar la hipótesis que los cambios en la estructura orientados a aumentar la polaridad podrían tener efecto en el perfil observado en la biodistribución, se realizó la evaluación biológica de ^{99m}Tc-2d y ^{99m}Tc-3d en ratones normales C57 BL/6J. Los estudios de biodistribución se realizaron luego de 1, 4 y 24 h post administración de cada compuesto. Como se puede observar en la Tabla 12, ambos compuestos se eliminaron rápidamente de sangre, presentando el derivado ^{99m}Tc-2d un 0.95 ± 0.40 % DI/g y el derivado ^{99m}Tc-3 un 2.23 ± 0.45 % DI/g 1 hora después de la inyección. Sin embargo, se observó un notable cambio en la vía de eliminación entre ^{99m}Tc-2d y ^{99m}Tc-3d. Así, el complejo ^{99m}Tc-2d se eliminó principalmente a través de la vía hepática con un % DI/g de 9.91 ± 0.97 y 23.35 ± 3.84 en hígado e intestinos, respectivamente, 1 h después de la administración. Pero, por otro lado, el complejo ^{99m}Tc-3d mostró una acumulación a nivel gastrointestinal reducida, observándose en hígado e intestinos un % DI/g menor a 1, luego de 1 y 4 h de la inyección. En concordancia, se observó para ^{99m}Tc-3d un notorio incremento en la eliminación renal evidenciado con un 81.92 ± 5.06 % DI eliminada por la orina luego de 1 h y un %DI/g de 3.37 ± 2.22 y 3.02 ± 0.81 en riñones luego de 1 y 4 h.

Debido al perfil farmacocinético favorable observado para ^{99m}Tc-3d en la biodistribución de ratones normales, dicho derivado fue seleccionado para continuar con la evaluación de la IEDDA y prueba de concepto *in vivo*.

Tabla 12. Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-2d}$ y $^{99m}\text{Tc-3d}$ a 1, 4 y 24 h en ratones normales C 57 BL/6J (n = 3). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un test ANOVA de dos vías con Bonferroni ((†) p <0.05).

| % Dosis inyectada / gramo de órgano (%DI/g) | | | | | | |
|--|--|---------------|---------------|--|--------------|--------------|
| Órganos | $^{99m}\text{Tc-2d}$ | | | $^{99m}\text{Tc-3d}$ | | |
| | 1 h | 4 h | 24 h | 1 h | 4 h | 24 h |
| Sangre | 0.95 ± 0.40 | 1.10 ± 0.90 | 0.47 ± 0.41 | 2.23 ± 0.45 | 1.19 ± 0.47 | 0.86 ± 0.72 |
| Hígado | 9.91 ± 0.97† | 8.58 ± 1.07† | 6.74 ± 1.49† | 0.79 ± 0.17† | 0.63 ± 0.21† | 0.72 ± 0.27† |
| Corazón | 0.45 ± 0.42 | 0.17 ± 0.05 | 0.57 ± 0.59 | 0.76 ± 0.20 | 0.41 ± 0.30 | 0.61 ± 0.55 |
| Pulmones | 0.78 ± 0.37 | 1.33 ± 1.89 | 0.30 ± 0.29 | 1.13 ± 0.36 | 0.97 ± 0.68 | 0.71 ± 0.47 |
| Bazo | 3.54 ± 1.11 | 3.59 ± 0.57 | 4.61 ± 1.81 | 1.04 ± 0.87 | 0.34 ± 0.21 | 2.20 ± 1.10 |
| Riñones | 1.20 ± 0.38 | 0.91 ± 0.10 | 0.61 ± 0.39 | 3.37 ± 2.22 | 3.02 ± 0.81 | 2.26 ± 0.13 |
| Tiroides | 0.80 ± 0.69 | 0.13 ± 0.07 | 0.35 ± 0.24 | 1.09 ± 0.19 | 0.63 ± 0.43 | 1.27 ± 0.73 |
| Músculo | 0.38 ± 0.45 | 0.08 ± 0.06 | 0.79 ± 0.68 | 0.24 ± 0.09 | 0.20 ± 0.20 | 0.36 ± 0.56 |
| Hueso | 0.24 ± 0.13 | 0.24 ± 0.12 | 0.67 ± 0.21 | 0.53 ± 0.12 | 0.34 ± 0.23 | 0.57 ± 0.64 |
| Estómago | 5.31 ± 3.64 | 1.60 ± 0.88 | 15.06 ± 8.62† | 2.42 ± 0.52 | 2.94 ± 1.20 | 2.67 ± 0.71† |
| Intestinos | 23.35 ± 3.84† | 29.89 ± 1.24† | 16.13 ± 6.87† | 0.51 ± 0.10† | 0.83 ± 0.36† | 2.16 ± 0.75† |
| % Dosis inyectada (%DI) | | | | | | |
| Orina y vejiga | 30.09 ± 11.14 | 28.80 ± 7.25 | 59.30 ± 14.61 | 81.92 ± 5.06 | 88.14 ± 4.34 | 90.93 ± 2.20 |

6.3.4 Cinética de la reacción entre el sistema TCO y $^{99m}\text{Tc-3d}$

Debido a que el derivado **3** contiene una tetrazina más reactiva y que el complejo correspondiente se utilizaría en los estudios *in vivo*, se decidió evaluar la reactividad de esta [1,2,4,5]tetrazina luego del proceso de marcación. Para ello se evaluó la cinética de la reacción entre el derivado TCO y $^{99m}\text{Tc-3d}$ en PBS a 25 °C. Así, se determinó una constante de velocidad de segundo orden de $3720 \pm 323 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (reacción completa al minuto a 5 μM de TCO, véase la Figura 52). Esta constante es del orden de las descriptas en la literatura para otros sistemas TZ y TCO.^{136,145}

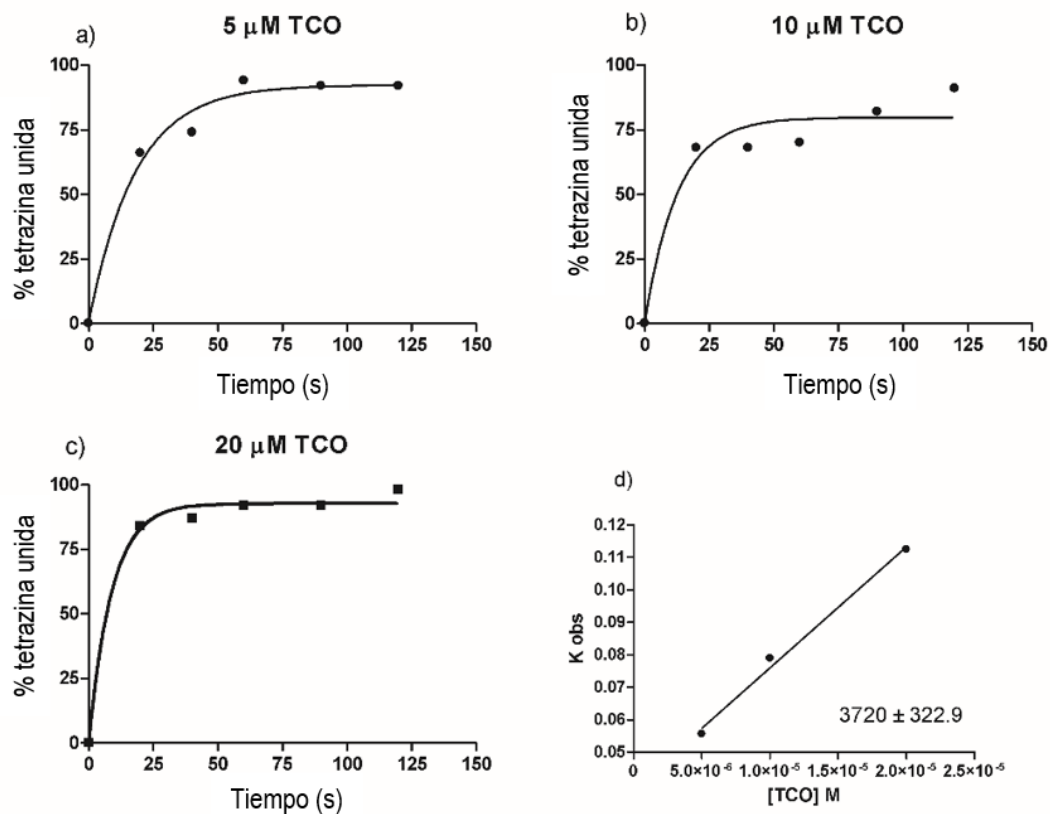


Figura 52. Cinética de la reacción entre $^{99m}\text{Tc-3d}$ y TCO.

6.3.5 Número de TCO reactivos por anticuerpo e IEDDA in vitro

Con el fin de evaluar la reacción bio-ortogonal entre TCO y $^{99m}\text{Tc-3d}$, en esta oportunidad se utilizó el AcMo bevacizumab como prueba de concepto. Para ello, el mismo se conjugó con un exceso molar de NHS-TCO de 10:1 (TCO:AcMo). El número de grupos TCO reactivos presente por molécula de anticuerpo se determinó mediante electroforesis en SDS-PAGE (Figura 53). La detección se realizó a través de una sonda fluorescente, para lo cual se incubó el anticuerpo conjugado con diferentes relaciones molares de TZ-CY7 (1, 3, 6, 9 y 12). El análisis de bandas del gel dio como resultado un promedio de 3.2 ± 0.3 molécula de TCO por molécula de anticuerpo. Además, se demostró que la reacción de IEDDA se llevó a cabo con éxito en la superficie del anticuerpo y es estrictamente dependiente de la presencia de grupos de TCO conjugados al AcMo.

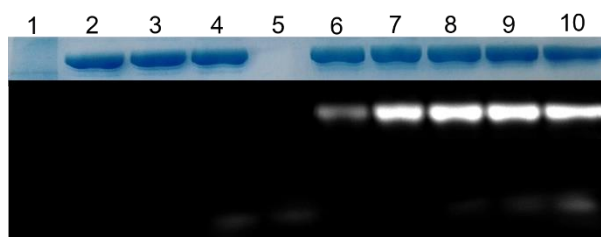


Figura 53. Cuantificación de SDS-PAGE TCO/AcMo. Gel de SDS-poliacrilamida teñido con Coomassie (arriba) y detección fluorescente (abajo). En los carriles 1 a 5, marcador de peso molecular, bevacizumab, bevacizumab-TCO, bevacizumab + TZ-Cy7 y TZ-Cy7 respectivamente. En los carriles 6 a 10 TZ-Cy7 + bevacizumab-TCO con relaciones molares de 1:1, 3:1, 6:1, 9:1 y 12: 1, respectivamente.

6.3.6 Actividad *in vitro* de bevacizumab-TCO

El reconocimiento *in vitro* de bevacizumab-TCO por su diana molecular se verificó mediante resonancia plasmónica superficial (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance). Para dicho fin se llevó a cabo la inmovilización covalente de VEGF₁₆₅ en un chip sensor y se comparó cualitativamente la unión de bevacizumab-TCO respecto de bevacizumab a diferentes concentraciones durante un minuto, seguido de tiempos variables de disociación. Las señales de asociación obtenidas para ambos anticuerpos por el VEGF₁₆₅ son relativamente similares, especialmente a 10 nM, notándose una ligera disminución en la respuesta obtenida a 50 nM. Durante la fase de disociación, ambos anticuerpos muestran una señal relativamente constante y sin pendiente, sugiriendo que la constante cinética de disociación es muy lenta para ambos anticuerpos a todas las concentraciones estudiadas luego de 3 minutos de disociación (Figura 54) y 10 minutos de disociación (datos no se muestran). Estos resultados confirman la inmunoreactividad de bevacizumab-TCO luego del proceso de conjugación y afinidades cualitativamente comparables con bevacizumab.

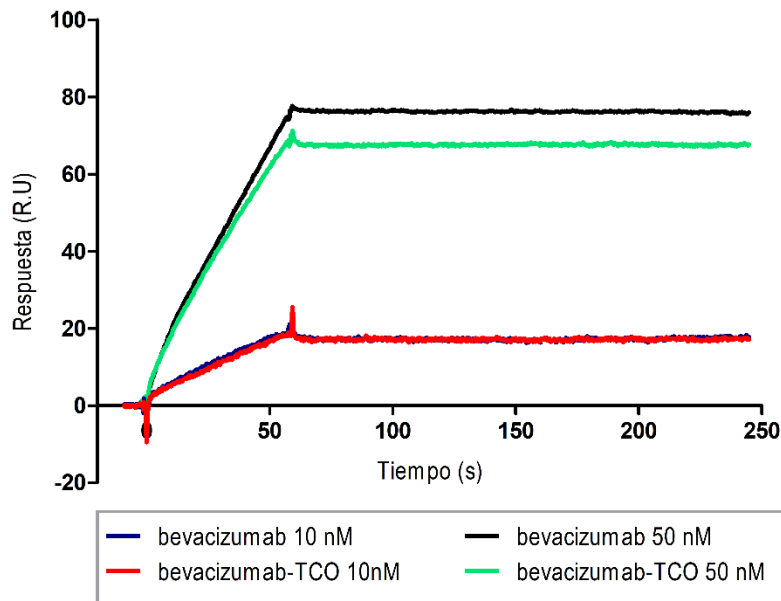


Figura 54. Estudio de unión de bevacizumab y bevacizumab-TCO por VEGF₁₆₅ mediante ensayo de SPR. El homodímero VEGF₁₆₅ se inmovilizó en la celda de flujo, y se inyectaron los anticuerpos a distintas concentraciones (10 μ L/min). Curvas en rojo y azul bevacizumab y bevacizumab-TCO a 10 nM respectivamente. Curvas en verde y amarillo bevacizumab y bevacizumab-TCO a 50 nM respectivamente.

6.3.7 Evaluación biológica

Seguidamente se estudió la reacción bio-ortogonal *in vivo* mediante un abordaje pre-dirigido. La reacción bio-ortogonal se evaluó mediante experimentos de biodistribución e imágenes SPECT-CT en ratones C57 BL/6J portadores de tumores de melanoma inducido con células B16-F10.

6.3.7.1 Ensayos de biodistribución

El protocolo de marcación pre-dirigido utilizado se esquematiza en la Figura 55. Brevemente, se administró de forma intravenosa de bevacizumab-TCO (100 μ g) y se le permitió circular durante 24h, momento en el cual se administró la segunda etiqueta bio-ortogonal ^{99m}Tc-**3d**. Luego de 1, 4 y 24 h posterior a la segunda inyección, los animales se sacrificaron y se procedió a realizar la biodistribución.

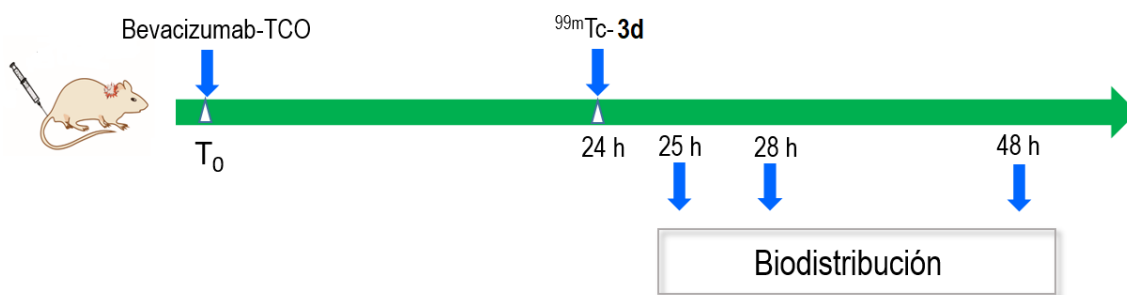


Figura 55. Protocolo de administraciones utilizados para la prueba de concepto de IEDDA in vivo mediante ensayos de biodistribución.

Los resultados obtenidos (Tabla 13) muestran una captación tumoral de 3.93 ± 0.72 % DI/g y 5.54 ± 2.00 % DI/g a 1 y 4 h post-inyección, con una disminución a 1.01 ± 0.49 % DI/g a las 24 h. La baja captación tumoral en el grupo control negativo (sin inyección de AcMo-TCO) de 4 h, sugiere que la acumulación en el tumor se asoció con la acumulación de bevacizumab-TCO a nivel tumoral y no con la acumulación inespecífica de la TZ radiomarcada. Utilizando la estrategia pre-dirigida se obtuvieron relaciones tumor/músculo de 5.6 ± 1.8 , 9.4 ± 1.8 , 9.0 ± 3.7 a 1, 4 y 24 h respectivamente.

Tabla 13. Biodistribución de $3d\text{-}^{99m}\text{Tc}$ mediante estrategia pre-dirigida con bevacizumab-TCO en ratones C 57 BL/6J portadores de tumores inducidos con células B16-F10, a 1, 4 y 24 h (n=4). Grupo control recibió bevacizumab en lugar de bevacizumab-TCO, (n=4).

| Órganos | % Dosis inyectada / gramo de órgano (%DI/g) | | | |
|-------------------|---|-------------------|-----------------|---------------------|
| | 1 h | 4 h | 24 h | 4 h (grupo control) |
| Sangre | 12.09 ± 2.10 | 9.27 ± 3.11 | 1.06 ± 0.50 | 0.28 ± 0.03 |
| Hígado | 3.09 ± 0.70 | 2.28 ± 1.03 | 0.34 ± 0.15 | 0.40 ± 0.19 |
| Corazón | 3.13 ± 0.53 | 2.42 ± 1.22 | 0.29 ± 0.12 | 0.15 ± 0.03 |
| Pulmones | 5.77 ± 1.46 | 4.16 ± 2.04 | 0.60 ± 0.25 | 0.81 ± 0.40 |
| Bazo | 3.07 ± 0.57 | 2.84 ± 1.23 | 0.40 ± 0.20 | 0.37 ± 0.12 |
| Riñones | 18.03 ± 3.04 | 14.00 ± 3.30 | 1.71 ± 0.42 | 5.80 ± 1.41 |
| Tiroides | 1.90 ± 0.86 | 1.99 ± 1.20 | 0.28 ± 0.15 | 0.19 ± 0.04 |
| Músculo | 0.73 ± 0.11 | 0.62 ± 0.28 | 0.11 ± 0.04 | 0.07 ± 0.01 |
| Hueso | 1.89 ± 0.38 | 1.17 ± 0.44 | 0.20 ± 0.09 | 0.13 ± 0.03 |
| Estómago | 2.00 ± 0.54 | 1.56 ± 0.60 | 0.22 ± 0.08 | 0.23 ± 0.04 |
| Intestino delgado | 1.77 ± 0.30 | 1.61 ± 0.65 | 0.16 ± 0.07 | 0.17 ± 0.03 |
| Intestino grueso | 2.20 ± 0.82 | 1.75 ± 0.79 | 0.18 ± 0.11 | 0.18 ± 0.03 |
| Cerebro | 0.25 ± 0.09 | 0.20 ± 0.08 | 0.03 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| Tumor | 3.93 ± 0.72 | 5.54 ± 2.00 | 1.01 ± 0.49 | 1.11 ± 0.25 |
| | % Dosis Inyectada | | | |
| Orina y Vejiga | 55.65 ± 7.90 | 50.37 ± 28.79 | 0.04 ± 0.03 | 8.77 ± 10.87 |

Por otro lado, en comparación con la biodistribución en animales sanos (Tabla 12), algunos órganos mostraron niveles de radioactividad aumentados (sangre (5 veces), riñones (5 veces), hígado (4 veces), corazón (4 veces), pulmones (5 veces) e intestino (4 veces)) luego de 1 y 4 horas de la inyección del radiomarcado, lo que posiblemente es debido a la presencia de bevacizumab-TCO en dichos órganos. La acumulación de bevacizumab-TCO en los mencionados órganos puede explicarse por la presencia de VEGF-A en tejidos normales. El VEGF participa en varias funciones fisiológicas aumentando la permeabilidad vascular y estimulando la proliferación y migración de células endoteliales, entre otras cosas. Adicionalmente, se ha confirmado la expresión de su ARNm en varios tejidos normales, por ejemplo, en el epitelio del glomérulo en el riñón, pulmón, glándula suprarrenal, corazón, hígado y mucosa gastrointestinal.^{208,209}

6.3.7.2 Imágenes PET y SPECT-CT

Con el objetivo de evaluar la reacción de cicloadición *in vivo* mediante imágenes SPECT-CT previamente al comienzo del protocolo de imágenes SPECT-CT, se realizaron imágenes PET con [¹⁸F]FDG de acuerdo con el protocolo que se esquematiza en la figura 56. La adquisición previa de imágenes PET, permitió en primer lugar, confirmar la presencia de tumores de melanoma en los ratones C57 BL/6J y, en segundo lugar, debido a que la [¹⁸F]FDG es el agente de diagnóstico estándar, permitirá realizar una comparación cualitativa de la estrategia planteada en esta tesis doctoral. Así, las imágenes PET adquiridas luego de 45 min de la administración del radiofármaco se presentan en la figura 57, 4 de estos animales fueron seleccionados para la prueba de concepto posterior y 2 de estos animales se seleccionaron como control (C1 y C2). Así, luego del procesamiento de las imágenes, es posible identificar la presencia tumoral como zonas de hipercaptación en las regiones de inyección, siendo más fácilmente visualizarlo en aquellos ratones que presentaban tumores palpables.

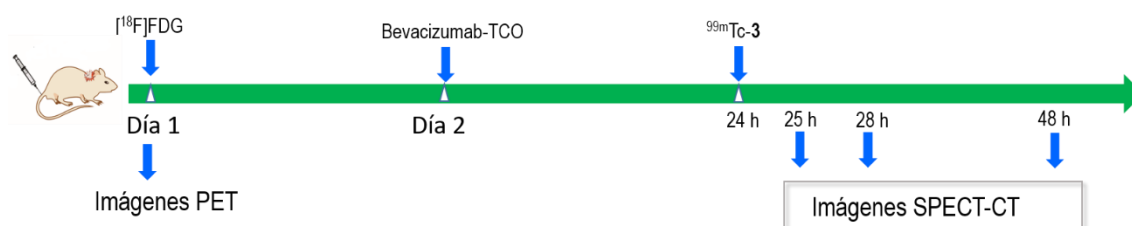


Figura 56. Protocolo de administraciones utilizados para la prueba de concepto de IEDDA *in vivo* mediante ensayos de biodistribución.

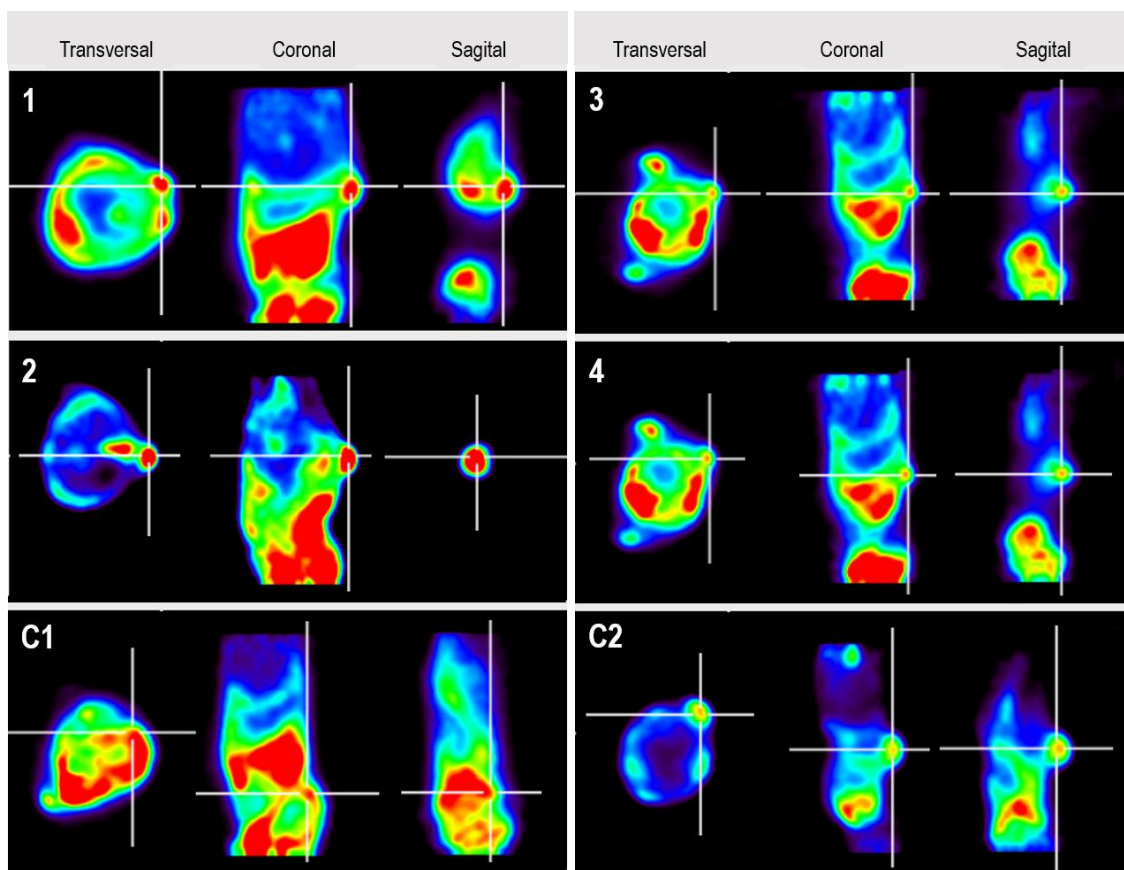


Figura 57. Imágenes micro-PET [^{18}F]FDG, de izquierda a derecha se muestran los cortes transversal, coronal y sagital, en la intersección de líneas blancas se señala la captación tumoral. Animales 1, 2, 3 y 4 se utilizaron posteriormente en la prueba de concepto, animales C1 y C2 se utilizaron posteriormente como control.

Una vez transcurridas 24 h, se realizó el protocolo de inyección de la estrategia pre-dirigida (día 2, Figura 56). Las imágenes SPECT/CT obtenidas para bevacizumab utilizando una estrategia pre-dirigida confirmaron los resultados observados en la biodistribución. Se observó una alta captación tumoral y baja radiactividad en tejidos no diana, excepto en los riñones, principalmente en aquellas imágenes realizadas a 1 y 4 h (Figura 58 A y 58 B, respectivamente). Las imágenes realizadas a 24 h, presentaron muy baja actividad, sin embargo fue posible visualizar que la actividad remanente se localizó en la región del tumoral (Figura 59). Otra observación interesante fue la acumulación heterogénea del radiotrazador dentro del tumor, lo que sugiere la expresión heterogénea de VEGF en el microambiente tumoral. En concordancia con los datos de la biodistribución pre-dirigida (Tabla 13), los riñones fueron los órganos no blanco con la mayor captación, siendo claramente identificados a 1 y 4 h, y disminuyendo a las 24 h.

El animal control que recibió bevacizumab no conjugado (C2), no presentó acumulación tumoral inespecífica de ^{99m}Tc -**3d** y demostrando que la acumulación en la región tumoral está asociada con la reacción bioortogonal entre bevacizumab-TCO y la TZ radiomarcada (Figura 58 C y 58 D). El animal control, bloqueado previamente con bevacizumab intraperitoneal, presentó una imagen tumoral reducida como se puede apreciar en la imagen de 1 h (Figura 60).

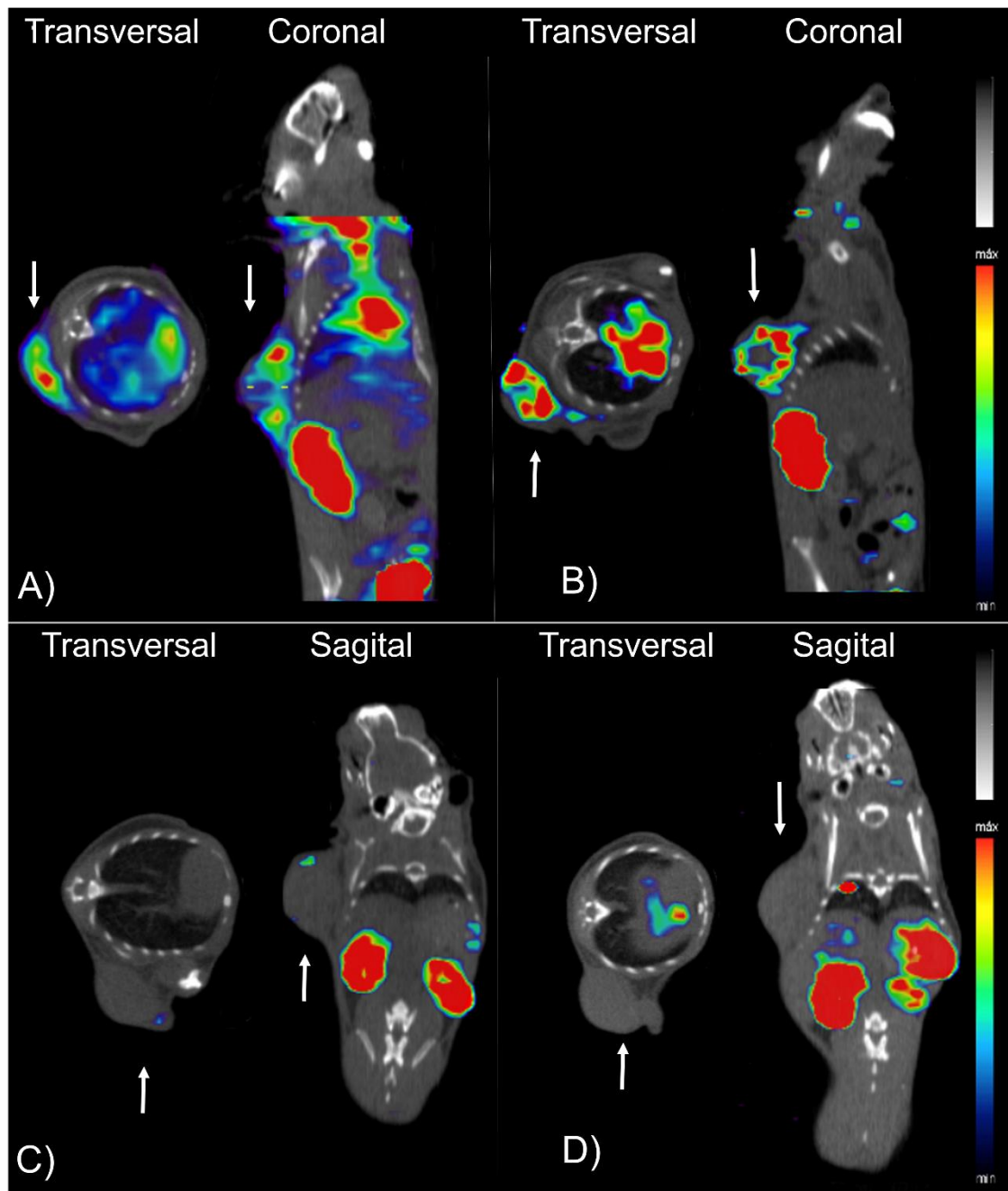


Figura 58. Imágenes SPECT-CT del animal 1, en A) 1 h y B) 4 h después de la administración de ^{99m}Tc -3d en ratón previamente administrado con bevacizumab-TCO. Imágenes SPECT-CT del control C2 (administrado con bevacizumab no conjugado) en C) 1 h y D) 4 h después de la administración de ^{99m}Tc -3d. La flecha blanca indica la ubicación del tumor

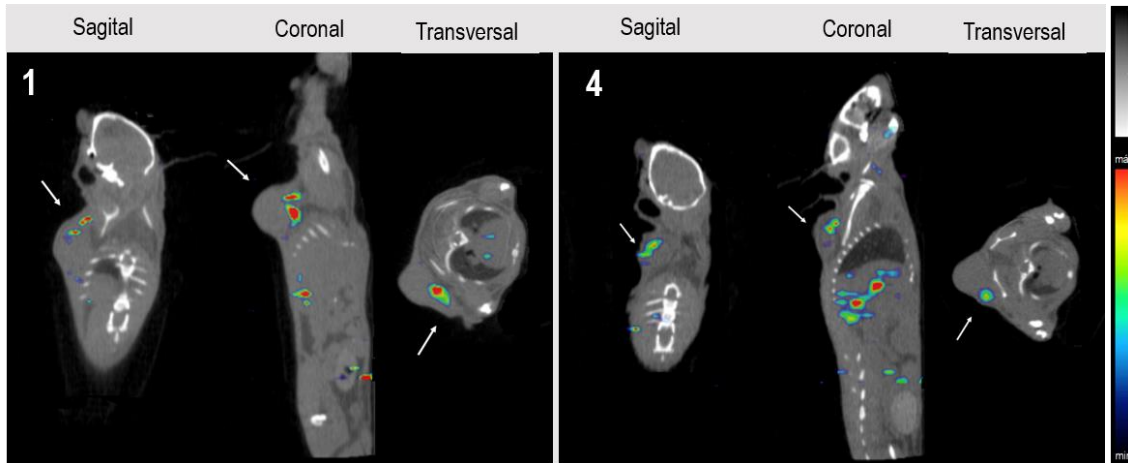


Figura 59. Imágenes SPECT-CT pre-dirigidas a 24 h de los animal 1(izquierda) y 4 (derecha). En cada imagen de izquierda a derecha se muestran los cortes transversal, coronal, y sagital,

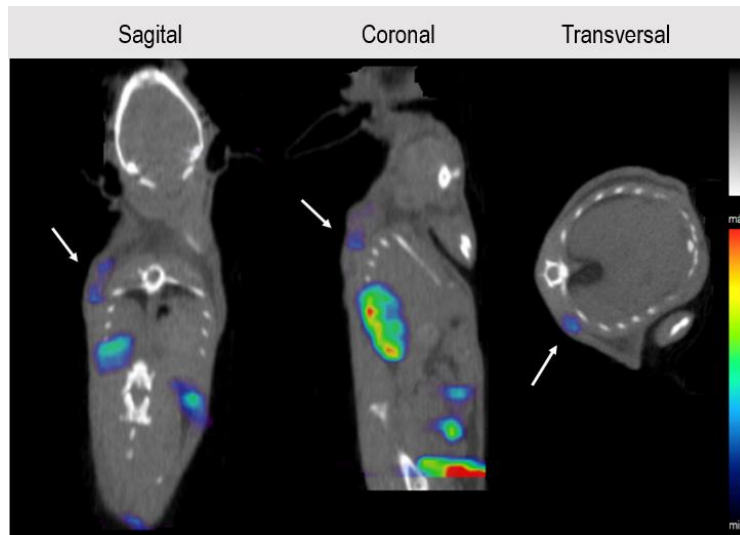


Figura 60. Imágenes SPECT-CT del control C1 (bloqueado con 5 mg de bevacizumab, previa administración de bevacizumab-TCO), 1 h post-inyección de ^{99m}Tc -3d. La flecha blanca indica la ubicación del tumor.

6.4 Discusión y conclusiones

En el capítulo II se describió el uso de la IEDDA como herramienta de marcación de biomoléculas *in vivo* utilizando el radionucleido ^{99m}Tc . El uso de agrupamientos derivados de HYNIC como ligando bifuncional resultó en elevadas PRQ en condiciones de marcación suaves.¹⁶² Recientemente, otros trabajos describieron la marcación de moléculas con ^{99m}Tc basadas también en IEDDA, pero utilizando otros sistemas quelantes. En este sentido, se ha descrito la marcación de tetrazina a través de un ligando tridentado basado en imidazol y la formación de un complejo de Tc(I) [2+1] a partir de bipyridina e imidazol.^{136,164,165} Sin embargo, el comportamiento *in vivo* de las tetrazinas radiomarcadas con ^{99m}Tc se ha caracterizado por acumulación inespecífica significativa en el tracto gastrointestinal, probablemente debido a las propiedades hidrofóbicas de los mismos.^{136,162,164,165} De forma que la estrategia pre-dirigida signifique un avance en el diseño de agentes de imagen, es conveniente que la segunda etiqueta bio-ortogonal se elimine rápido del organismo y además presente baja acumulación inespecífica en órganos no blanco. En este sentido, se planteó la hipótesis que la incorporación de grupos polares en el derivado HYNIC-tetrazina, resultarían en un aumento en la vía de eliminación renal dando como resultado una farmacocinética mejorada y una menor señal de fondo en las imágenes.

Distintas estrategias sintéticas fueron abordadas con el objetivo de incorporar o bien espaciadores que aporten polaridad a la molécula u otros agrupamientos quelantes. En este sentido, se obtuvieron dos nuevos derivados de TZ, ambos con el agrupamiento quelante HYNIC. Se exploró la incorporación de una cadena de polietilenoxi en el derivado estudiado en el capítulo anterior, resultando el derivado **2** (Figura 47). Mientras que el derivado **3** (Figura 47), incluyó la extensión de la cadena de polietilenoxi y la adición de una cadena polipeptídica que contiene aminoácidos polares, a saber Arg, Glu y Lys. El derivado **3** involucró una de-metil-TZ que, además de darle más polaridad, favorece una mayor reactividad en la IEDDA con TCO.^{136,145}

Los derivados **2** y **3** se marcaron con ^{99m}Tc utilizando tricina como coligando. Condiciones de marcación similares a las utilizadas previamente, condujeron a PRQ superiores al 90 % en todos los casos, lo que permitió trabajar sin procesos de purificación posteriores. Los cromatogramas de radio-HPLC de las mezclas de reacción, mostraron la presencia de isómeros radiomarcados, fenómeno que a menudo se observa para moléculas marcadas con ^{99m}Tc a través del complejante HYNIC.

Una comparación de los coeficientes de partición *n*-octanol/PBS de las tetrazinas radiomarcadas, fue el primer indicio del efecto de los conectores sobre las hidrofobicidad de los compuestos. La inclusión de la cadena de polietilenoxi en ^{99m}Tc-**2d** resultó en una modesta reducción del valor del coeficiente de partición con respecto al análogo padre **1d**-^{99m}Tc. Como era de esperar, la adición de una cadena peptídica con aminoácidos polares en ^{99m}Tc-**3d**, resultó en el compuesto menos hidrofóbico.

Con el fin de explorar el comportamiento biológico de los derivados ^{99m}Tc-**2d** y ^{99m}Tc-**3d** se realizaron ensayos de biodistribución en ratones normales a 1, 4 y 24 h. Curiosamente, a pesar de los antecedentes que describen el uso de cadenas de tipo polietilenoxi para aumentar la eliminación renal,^{137,210,211} esta modificación en ^{99m}Tc-**2d** no produjo un marcado cambio en el perfil farmacocinético en comparación con los datos de biodistribución observados para el derivado padre sin espaciador hidrofílico (sección 5.5.12.2). En este sentido, un trabajo de 2017 sobre derivados de tetrazina marcados con ¹⁷⁷Lu, describe una vía de eliminación hepática cuando se utiliza un conector de pentakis(etilenoxi) y una eliminación renal cuando se utiliza un conector de heptakis(etilenoxi) o mayor, un aspecto a considerar en el desarrollo de futuros derivados.²¹²

Por otro lado, un cambio notable se observó en la vía de eliminación entre ^{99m}Tc-**2d** y ^{99m}Tc-**3d**. Si bien ambos compuestos mostraron bajos % DI/g en sangre, mientras el compuesto ^{99m}Tc-**2d** presentó elevada acumulación en el tracto gastrointestinal, ^{99m}Tc-**3d** mostró una acumulación reducida en el hígado y los intestinos y un aumento de la eliminación por vía urinaria. Las diferencias observadas podrían ser atribuibles a la carga del compuesto radiomarcado, producto de la carga neta que aporta el polipéptido incorporado. En relación a los resultados observados, un trabajo reciente describe aspectos relevantes que permiten correlacionar la estructura con el comportamiento *in vivo* de TZ radiomarcadas.²¹⁰ Por ejemplo, en dicho trabajo, se observó que a mayor carga neta del radioligando, resultado de la presencia de péptidos ionizables en su estructura, menor es la hidrofobicidad del mismo. Adicionalmente, la introducción de residuos aminoacídicos tiene influencia en la vía de eliminación, siendo las moléculas que presentan carga neta eliminadas preferentemente a través de filtración glomerular a nivel renal, mientras que moléculas con carga neta neutra tienden a una eliminación hepática. Además, la incorporación de Lys en el conector resulta en una retención del radioligando en el riñón, una característica observada también en los radiopéptidos que presentan Lys

en su secuencia.^{213,214} Así, los resultados observados en este trabajo para los complejos con ^{99m}Tc están en concordancia con la tendencia observada previamente por Lewis et al.

Con el objetivo de estudiar la reacción bioortogonal para el diagnóstico de cáncer, en este capítulo se optó por explorar la aplicación de la estrategia pre-dirigida en la detección de VEGF-A un factor de crecimiento pro-angiogénico y presente en niveles elevados en el microambiente tumoral. El gen VEGF-A puede dar lugar, por “splicing” alternativo, a seis isoformas de 121, 145, 165, 183, 189, y 206 aminoácidos; siendo VEGF-165 la isoforma predominante.^{215,216} Si bien VEGF-165 es un factor secretado, una porción del mismo permanece asociado a la membrana celular y matriz extracelular a través de su unión a proteoglicanos de heparán sulfato o HSPGs.¹⁹⁵

El AcMo humanizado bevacizumab está dirigido contra el epítopo codificado por el exón 4 del gen VEGF-A, presente en todas las isoformas. Estudios previos han explorado el potencial de bevacizumab como agente de imagen molecular,^{161,194,217} siendo la acumulación tumoral de bevacizumab radiomarcado asociada a la expresión de las isoformas VEGF-165 y -189 a nivel de la membrana celular y matriz extracelular.²¹⁷ Si bien se han observado elevados %DI/g a nivel tumoral en distintos modelos tumorales, la farmacocinética intrínseca de los AcMo ha limitado sus aplicaciones, siendo necesarios entre 3 y 7 días para reducir la señal de fondo en las imágenes.²¹⁷ En este sentido, el abordaje a través de una estrategia pre-dirigida podría significar un avance.

Debido al perfil de biodistribución de ^{99m}Tc-**3d** en ratones normales, los estudios de la reacción *in vivo* se llevaron a cabo con dicho compuesto. Los resultados de estudios de biodistribución con la estrategia pre-dirigida en ratones portadores de tumor mostraron % DI/g de 3.93 ± 0.72 % DI/g y 5.52 ± 2.00 % DI/g a 1 y 4 h en tumor. En comparación los resultados obtenidos en un trabajo previo, en un modelo de melanoma murino similar mediante estrategias de marcación clásicas, presenta una captación tumoral similar.¹⁹⁴ Sin embargo, la estrategia pre-dirigida permitió reducir la actividad presente a nivel sanguíneo entre tres y dos veces, luego de 1 y 4 h respectivamente. Una reducción similar se observó a nivel hepático con valores de % DI/g que se redujeron tres veces (8.40 ± 1.41 vs 3.08 ± 0.69 a 1h).¹⁹⁴ Estos resultados demuestran que el protocolo utilizado en la estrategia pre-dirigida logró una mejora en el perfil de biodistribución.

Cuando se compara los resultados obtenidos en la biodistribución entre la estrategia pre-dirigida y la biodistribución intrínseca de ^{99m}Tc-**3d** en ratones sanos, los niveles de

radioactividad presentes en la sangre y los riñones fueron marcadamente superiores en la estrategia pre-dirigida (5 veces superior en ambos órganos a 1 h). Estas diferencias observadas podrían explicarse por la presencia de bevacizumab-TCO circulante en el organismo, aún luego de transcurridas 24 h. De forma similar, otros órganos como los riñones, hígado, corazón, pulmones e intestinos también mostraron aumentos moderados de % DI/g que no se observaron ni en las biodistribuciones en ratones normales ni tampoco en el grupo control de 4 h que recibió bevacizumab sin TCO. La presencia de captación en dichos órganos, podría explicarse debido a la presencia de bevacizumab-TCO asociada a la expresión de VEGF en dichos órganos en condiciones normales.^{208,209} Una tendencia que también se observa en trabajos previos donde se administró directamente bevacizumab radiomarcado.^{161,194,217}

Las imágenes SPECT-CT utilizando una estrategia pre-dirigida confirmaron los resultados observados en la biodistribución. Las imágenes micro SPECT-CT adquiridas no sólo permitieron visualizar claramente el tumor en todos los casos, especialmente a 1 y 4 h post administración de la sonda radioactiva. Los controles incluidos permitieron demostrar nuevamente que la acumulación de ^{99m}Tc-**3d** no se debe a una acumulación inespecífica en el tumor, sino asociada a la reacción bio-ortogonal y presencia de bevacizumab-TCO a nivel tumoral. Además, la acumulación específica de bevacizumab se evidenció por una reducción parcial en la captación a nivel tumoral en el animal que recibió previamente una dosis de bevacizumab. Por otro lado, la disminución en la captación gastrointestinal observada en comparación con el derivado descrito en el capítulo II, resultó en imágenes de menor señal de fondo. El órgano no blanco con mayor captación y claramente visible en las imágenes fue el riñón, posiblemente debido a la presencia de Lys en la secuencia peptídica del mismo. Un resultado poco deseable, aunque modificable en el diseño racional del conector en futuros derivados.

Las imágenes PET de [¹⁸F]FDG, además de confirmar la presencia de tumor previo al inicio del protocolo de administraciones, permitió comparar la estrategia planteada con una herramienta diagnóstica utilizada de rutina en el diagnóstico de distintos tipos de cáncer. En este sentido, ambos agentes de imagen permitieron identificar los tumores aunque con diferencias. Por un lado, con [¹⁸F]FDG las zonas tumorales se identifican por regiones de captación intensa. Sin embargo, en algunos casos, la región tumoral no quedó completamente delimitada. En este sentido, cabe destacar que la [¹⁸F]FDG es un marcador que da cuenta de la actividad metabólica de las células por lo que otros tejidos normales

pueden presentar captación de la misma en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el tejido adiposo pardo, en determinadas condiciones de temperatura puede presentar una captación de la sonda.²¹⁸ Por otro lado, la baja señal de fondo observada en la estrategia pre-dirigida permitió una clara definición de la zona tumoral, incluso en tumores pequeños. Además, fue posible observar zonas de hipercaptación e hipocaptación dentro del mismo tumor, revelando la heterogeneidad en la expresión del blanco a nivel tumoral. Desde un punto de vista de la información funcional provista por ambos agentes de imagen, ambas sondas brindan información complementaria de procesos de la fisiología tumoral. Por un lado, la [¹⁸F]FDG aporta información de la actividad del metabolismo de la glucosa del tumor mientras que bevacizumab permite aproximarse a los procesos angiogénicos del mismo. Adicionalmente, cabe destacar que la estrategia pre-dirigida, permite visualizar aquellos anticuerpos presentes asociados a la membrana o matriz extracelular.

En suma,

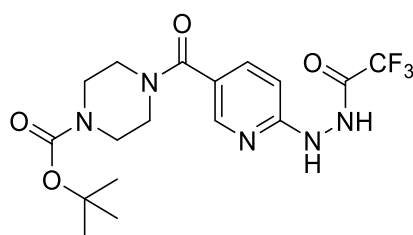
- Se desarrollaron dos derivados tetrazina portadores del ligando bifuncional HYNIC.
- Ambos derivados se marcaron con ^{99m}Tc de manera eficiente en condiciones de reacción suaves y mostraron ser estables en las condiciones estudiadas.
- Las modificaciones estructurales incorporadas en los mismos, resultaron en derivados más hidrofílicos.
- La incorporación de una cadena de tetrakis(etilenoxi) resultó en un derivado con vía de eliminación predominantemente gastrointestinal, mientras que la adición de una cadena peptídica con aminoácidos cargados, dieron lugar a una eliminación principalmente renal.
- La evaluación de la reacción *in vivo* en base a una estrategia pre-dirigida, en la prueba de concepto seleccionada, a través de estudios de biodistribución e imágenes SPECT-CT fue positiva. Se alcanzaron % DI/g en tumor similares a los observados con estrategias de marcación clásica en modelos tumorales similares.
- La estrategia pre-dirigida mostró ser una estrategia de marcación efectiva de anticuerpos monoclonales, dando lugar a imágenes con menor señal de fondo.

6.5 Materiales y Métodos

6.5.1 Síntesis orgánica

6.5.1.1 Producto estrategia B.1

En un balón con atmósfera de N₂ se disolvió el ácido 6-(2-trifluoroacetil)hidrazinonicotínico (0.1 g, 0.63 mmol) en 1 mL de tolueno seco. Seguidamente se adicionaron con jeringa piridina (20 µL, 0.26 mmol) y SOCl₂ previamente destilado (35 µL, 4.8 mmol). La mezcla se calentó durante 2 h a reflujo. El exceso de SOCl₂ se eliminó a presión reducida y el crudo nuevamente se disolvió en una mezcla de tolueno seco (1 mL) y trietilamina (8.5 µL, 0.118 g). Luego de 10 min se adicionó 1-(*tert*-butiloxicarbonil)piperazina (0.118 g, 0.635 mmol) disuelta en tolueno seco (1.5 mL). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, se eliminó el tolueno a presión reducida, co-destilándolo con hexano, y se realizaron sucesivos repartos con CH₂Cl₂:H₂O. El crudo es purificado por columna de sílica (AcOEt:éter de petróleo, gradiente 1:1 a 9:1). El producto final se obtuvo como un sólido de color blanco (5.5 mg, 10 %).

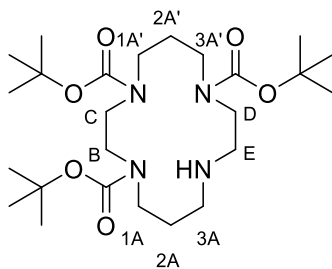


¹H-RMN (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 8.23 (d, *J*_{H-H} = 1.6 Hz, 1H, Py-**H**), 7.73 (dd, *J*_{H-H} = 8.7, 2.2 Hz, 1H, Py-**H**), 6.79 (d, *J*_{H-H} = 8.3 Hz, 1H, Py-**H**), 3.63 (sa, 4H, CH₂), 3.51 (sa, 4H, CH₂), 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃). ¹³C-RMN (101 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 169.10, 168.49, 158.32, 154.84, 146.47, 137.56, 122.47, 106.79, 80.76, 42.30, 27.18.

6.5.1.2 Cyclam-(Boc)₃ (d.1)

A una solución conteniendo Cyclam (0.2 g, 1 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2mL), se adicionó una solución de di-*ter*-butildicarbonato (Boc₂O) (0.5 g, 2.3 mmol, pureza) en 6 mL CH₂Cl₂ seco. La reacción de deja durante 2h en agitación a temperatura ambiente. Luego el exceso de disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica por CCF

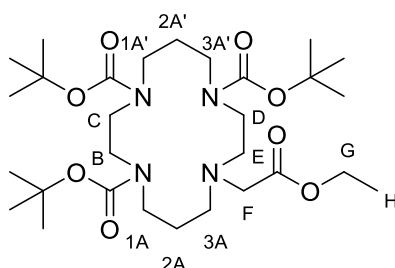
utilizando sílica flash y una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5) como fase móvil. El intermedio **d.1** se obtuvo como un sólido incoloro (0.154 g, 31 %).



$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.30 - 3.41 (m, 12 H, H_{1A} , H_B , H_C , $\text{H}_{1A'}$, $\text{H}_{3A'}$, H_D), 2.82-2.74 (m, 2H, H_E), 2.62 (sa, 2H, H_{3A}), 1.94 (m, 2H, $\text{H}_{2A'}$), 1.72 (m, 2H, H_{2A}), 1.47 (m, 27H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.47 (CO), 79.48 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 50.52 (C_E), 49.97-46.77 ($\text{C}_{1A,B,C,1A',3A',D}$), 45.86 (C_{3A}), 29.71 ($\text{C}_{2A'}$), 28.78 (C_{2A}), 28.49 (CH_3).

6.5.1.3 Cyclam-(Boc)3-EA (d.2)

En un balón de dos bocas con atmósfera de N_2 se disolvió el compuesto **d.1** (0.154 g, 0.3 moles) en DMF (1.5 mL). Seguidamente se adicionaron 2-bromoacetato de etilo (0.9 eq) y K_2CO_3 (1.5 eq). La mezcla se agitó a 80 °C durante 16 h. El disolvente se eliminó a presión reducida co-destilando con tolueno/hexano. El crudo obtenido es purificado por CCF utilizando sílica y una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5) como fase móvil. El compuesto **d.2** se obtuvo como un sólido blanco (0.159 g, 88 %).

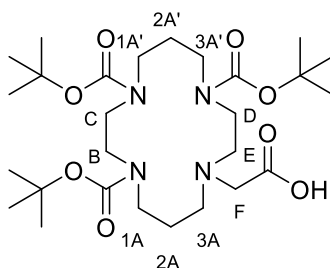


$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.15 (q, $J_{H-G} = 7.0$ Hz, 2H, H_G), 3.35-3.27 (m, 14 H, H_{1A} , H_B , H_C , $\text{H}_{1A'}$, $\text{H}_{3A'}$, H_D , H_F), 2.83 (s, 2H, H_E), 2.65 (s, 2H, H_{3A}), 1.90 (m, 2H, $\text{H}_{2A'}$), 1.68 (m, 2H, H_{2A}), 1.46 (m, 27H, CH_3), 1.27 (t, $J_{H-G} = 7.1$ Hz, 3H, H_H). $^{13}\text{C-RMN}$

(101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.06 (CCO), 155.75 (NCO), 79.38 (C(CH₃)), 60.26 (C_G), 55.44 (C_F), 51.83 (C_E), 51.77 (C_{3A}), 49.50-45.26 (C_{1A,B,C,1A',3A',D}), 26.94 (C_{2A'}), 28.20 (C_{2A}), 28.49 (CH₃), 14.30 (C_H).

6.5.1.4 Cyclam-(Boc)₃-OH (d.3)

A una disolución conteniendo **d.2** (0.139 g, 0.23 moles) en MeOH (1 mL) se adicionó disolución acuosa de NaOH (1 M). Luego de 2 h de agitación a temperatura ambiente, se evapora el MeOH a presión reducida. Seguidamente, la fase acuosa se acidificó a pH 6.0 con disolución acuosa de HCl (1 M) y se extrajo con acetato de etilo (4 × 10 mL). Finalmente, se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ y eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el compuesto **d.3** (0.117 g, R = 89 %) sin purificación adicional.

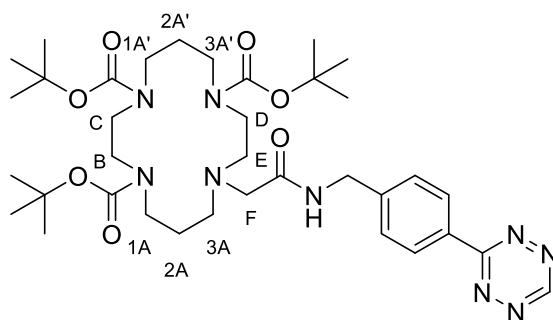


¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.36-3.27 (m, 14 H, H_{1A}, H_B, H_C, H_{1A'}, H_{3A'}, H_D, H_F), 2.78 (s, 2H, H_E), 2.64 (s, 2H, H_{3A}), 1.86 (m, 2H, H_{2A'}), 1.73 (m, 2H, H_{2A}), 1.46 (m, 27H, CH₃). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.06 (CCO), 155.58 (NCO), 79.98 (C(CH₃)), 55.44 (C_F), 53.91 (C_E), 52.50 (C_{3A}), 46.20 (C_{1A,B,C,1A',3A',D}), 28.97 (C_{2A'}), 26.94 (C_{2A}), 28.40 (CH₃).

6.5.1.5 Cyclam-(Boc)3-TZ (d.4)

En un balón de dos bocas en atmósfera de N₂ se disolvió hidrocloreto de 4-([1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetanamina (30 mg, 1 eq) en una mezcla tolueno/DMF (2ml + 0.2 mL) y se adicionó trietilamina (2 eq). Luego de 1 h en agitación se adicionó el compuesto **d.3** (1.5 eq) disuelto en DMF (0.3 mL). Seguidamente, EDC (3 eq) y *N*-hidroxisuccinimida (3 eq) fueron adicionados a la mezcla de reacción. La reacción se agitó en oscuridad durante 2 h. El disolvente se destiló a presión reducida codestilando

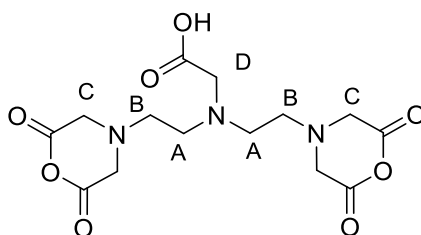
con hexano y se realizó un reparto entre CH_2Cl_2 y una disolución acuosa de Na_2CO_3 (0.5 M), seguido de un reparto entre CH_2Cl_2 y una disolución acuosa de HCl (0.1 M) y finalmente se reparte entre CH_2Cl_2 y una disolución acuosa de NaCl saturado. El disolvente orgánico se secó y destiló a presión reducida y el crudo obtenido se purificó en CCF preparativa en alúmina AcOEt:éter de petróleo (7:3). El compuesto **d.4** se obtuvo como un sólido fucsia (18 mg, 18 %).



$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.22 (s, 1H, **CH**), 8.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, **Ar-H**), 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, **Ar-H**), 4.60 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, **CH₂-Ar**), 3.34 (sa, 12 H, **H_{1A}**, **H_B**, **H_C**, **H_{1A'}**, **H_{3A'}**, **H_D**), 3.20 (s, 2H, **H_F**), 2.67 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, **H_E**), 2.54 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, **H_{3A}**), 1.72 (m, 2H, **H_{2A'}**), 1.44 (s, 27H, **CH₃**). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.06 (**CCO**), 166.30 (**CH**), 157.7 (**NCO**), 155.49 (**CN₂**), 144.10 (**Ar**), 129.80 (**Ar**), 128.53 (**Ar**), 80.13 (**C(CH₃)**), 59.44 (**C_F**), 55.02 (**C_E**), 53.26 (**C_{3A}**), 46.58 (**C_{1A,B,C,1A',3A',D}**), 42.82 (**CH₂-Ar**), 28.42 (**C_{2A'}**), 26.91 (**C_{2A}**), 28.46 (**CH₃**).

6.5.1.6 Bis anhídrido del ácido dietilentriaminopentacético, **cDTPA (e.1)**

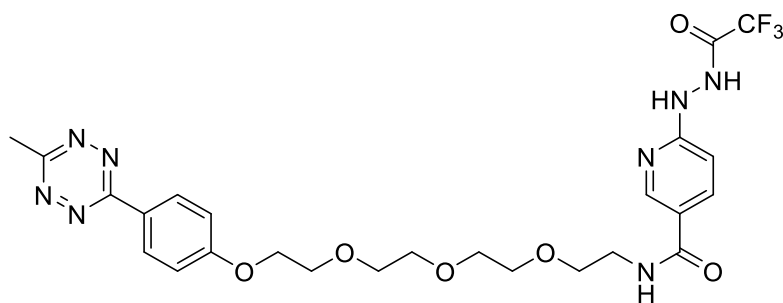
Una mezcla conteniendo ácido dietilentriaminopentacético (3g, 7.6 mmol), piridina (3.0 mL, 3.7 mmol) y anhídrido acético (20 mL, 30 eq) en atmósfera de N_2 , se dejó reaccionar durante 24 h a 60 °C. El enfriamiento de la mezcla dio lugar a un sólido de aspecto blanco, el cual se filtró a vacío y lavó con acetonitrilo seguido de éter. Luego de 24 en desecador, el producto **e.1** se obtuvo como un sólido blanco (0.895 g, 32.8 %).



^1H RMN (400 MHz, DMSO-d) δ (ppm): 3.66 (s, 2H, H_D), 3.46 (s, 8H, H_C), 3.07 (t, J = 5.6 Hz, 4H, H_A), 2.94 (t, J = 5.5 Hz, 4H, H_B). ^{13}C -RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173.03 ((CO)₂O)169.72 (COOH), 55.36, (C_C), 55.20 (C_D), 52.12 (C_A), 50.34(C_B).

6.5.1.7N²-{5-[14-[4-(6-metil-[1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetil]carbamoil-3,6,9,12-tetraoxatetradecilaminocarbonil]piridin-2-il}-2,2,2-trifluoroacetohidrazida (2)

A una disolución de hidrocloreuro de 14-[4-(6-metil-[1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetil]-3,6,9,12-tetraoxatetradecilamina (30 mg, 75.16 μmol) en DMF (1 mL) se adicionó trietilamina (3 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente se adicionó una disolución de 6-trifluoroacetilhidracinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidinilo (1 eq) disuelto en THF. La reacción fue agitada y protegida de la luz, durante 24 h a temperatura ambiente. El disolvente fue reducido a vacío codestilando con una mezcla de tolueno/hexano y el producto final se obtuvo luego de una purificación mediante cromatografía en capa fina preparativa, en sílica utilizando acetato de etilo:hexano (9:1) como fase móvil. Eluido de la sílica con acetona y luego de la evaporación del disolvente a vacío, el producto final se obtuvo como un sólido de color rosado intenso (10 mg, 22 %). La pureza de **2** se verificó mediante HPLC.



^1H -RMN (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 8.51 (s, 1H, Py-**H**), 8.46 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar-**H**), 7.99 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.3 Hz, 1H, Py-**H**), 7.13 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar-**H**), 6.78 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Py-**H**), 4.23-4.20 (m, 2H, Ar-O-CH₂-), 3.87-3.84 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂-O), 3.69-3.62 (m, 10H, -(CH₂O)-), 3.52 (t, J = 4.9 Hz, 2H, -CH₂-NHCO-), 2.99 (s, 3H, -CH₃). ^{13}C -RMN (101 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 170.30, 169.10, 166.05, 164.97, 163.60,

149.05, 139.44, 131.59, 126.79, 117.32, 72.74, 72.59, 72.30, 71.69, 71.54, 69.87, 41.85, 21.94. IES-EM calculado m/z : 595.22 (M+H)⁺, hallado m/z : 595.18 (M+H)⁺.

6.5.1.8 Amida de N-(6-trifluoroacetylhydrazino-3-piridinilcarbonil)gliclarginilglutamilarginilglutamil-N^ε-{18-[4-([1,2,4,5]tetrazin-3-il)fenilmetilaminocarbonyl]-4,7,10,13,16-pentaoxaoctadecanoil}lisina (3)

El derivado **3** fue sintetizado por el Prof. Fabio Gallazzi de la Universidad de Missouri. Para ello el intermedio peptídico (**3a**) (Tfa)-HYNIC-Gly-Arg-Glu-Arg-Glu-Lys-CONH₂ se sintetizó en la resina Sieber usando síntesis de péptidos en fase sólida mediante ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos protegidos en su cadena lateral (SPPS) en un sintetizador de péptidos múltiple Tetras de Advanced ChemTech (Louisville, KY). Los grupos protectores de las cadenas laterales de aminoácidos fueron: *t*Bu (Glu) y Pbf (Arg). Boc-HYNIC se añadió utilizando el protocolo estándar Fmoc. La peptidil-resina se escindió de la resina y se desprotegió en una única reacción con TFA, TA, fenol, agua, EDT y TIS (87.5: 2.5: 2.5: 2.5: 2.5) durante 4 h a 25 °C. El producto intermedio **3a** fue precipitado y lavado con éter. Una pequeña alícuota de **3a** se caracterizó por LC-MS. Posteriormente, **3a** (3 eq) se puso a reaccionar con Tetrazina-peg5-*N*-hidroxisuccinimidil éster (TZ-PEG5-NHS, 4 eq) en presencia de DIEA (9 eq) para permitir el acoplamiento de TZ-PEG5 en el grupo epsilon de la Lys C-terminal. Después de 3 h, la mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa asistida por MS y las fracciones con la mayor pureza del producto se recogieron y se liofilizaron. IES-MS: calculado m/z : 1493.69 (M+H)⁺, hallado m/z : 1493.5 (M+H)⁺.

6.5.2 Marcación con ^{99m}Tc

Los derivados **2** y **3** fueron disueltos en DMSO (2 mg/mL), alicuotados y almacenados a -20 °C para su posterior marcación.

Coligando Tricina

En un tubo de 1.5 mL, se adicionan 100 µL de una disolución acuosa de tricina (100 mg/mL en H₂O, 55.8 µmol), 20 µg de **2** o **3** (1 µg/µL), seguidamente se adicionan 20 µL

de una disolución etanólica de SnCl₂ recién preparada (2 mg/mL en etanol, 17.7 μmol) y 111-150 MBq de Na^{99m}TcO₄ (hasta 200 μL). Se controla el pH a 5 y se incuba durante 15 min a 37 °C en un baño seco. Las purzas radioquímicas se determinaron por HPLC (**método 3**) y en CCF. El detector UV se estableció en 280 nm. **Método 3:** gradiente lineal agua/TFA 0.05% (A) y MeOH (B), 0-30 min 0-100% B, 30-33 min 100-0% B. La CCF se realizó utilizando ITLC-SG con citrato de sodio (0.1 M) como fase móvil para determinar ^{99m}Tc-coloide (R_f = 0).

6.5.3 Estabilidad de los derivados radiomarcados

La estabilidad de las tetrazinas radiomarcadas se controló en la mezcla de reacción a temperatura ambiente y en PBS a 37 °C, durante 1, 4 y 24 h. El ensayo de transquelación se realizó mediante la incubación de una alícuota en una disolución acuosa de cisteína (1 mM). Todas las muestras se analizaron mediante HPLC de fase reversa utilizando el método 3.

6.5.4 Coeficiente de reparto n-octanol/fase acuosa

Los compuestos radiomarcados se purificaron mediante RP-HPLC y se purgaron con N₂ para eliminar los disolventes. La fracción radiomarcada de ^{99m}Tc-**2d** y ^{99m}Tc-**3d** se diluyó en PBS (pH 7.4) hasta obtener una concentración de 200,000 cpm/mL. Los valores del Log P se determinaron por triplicado de acuerdo con la sección 5.5.4.

6.5.5 Ensayo de unión a proteínas

Una alícuota de ^{99m}Tc-**2d** y ^{99m}Tc-**3d** (10 μL, 7.4 MBq) se adicionó a 500 μL de SFB (50 % en PBS) en triplicado. Después del período de incubación (25 °C, durante 60 min), las proteínas se precipitaron con 500 μL de ACN y se centrifugaron durante 4 min a 14000 rpm. El sobrenadante se recogió y el precipitado se resuspendió en PBS y se centrifugó de nuevo. Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en contador de pozo de NaI. Se calculó el porcentaje de actividad asociado a proteínas.

6.5.6 Cinética de la reacción bio-ortogonal

Diferentes concentraciones de TCO-NHS (5, 10 y 20 μM) se mezclaron con ^{99m}Tc-**3d** en 1 mL de PBS a 25 °C (exceso de TCO, 10 equivalentes). Después de 20, 40, 60, 90, 120 segundos se hicieron reaccionar alícuotas de 100 μL con un exceso de tetrazina-NH₂ (Click Chemistry tools) para detener la reacción. Todas las reacciones se controlaron mediante RP-HPLC y se determinó el porcentaje de ^{99m}Tc-**3d** que reaccionó con TCO.

Las constantes cinéticas de pseudo-primer orden (K_{obs}) se obtuvieron a partir del gráfico de porcentaje de ^{99m}Tc -**3d** reaccionante a lo largo del tiempo. Finalmente, la constante de segundo orden se obtuvo por regresión lineal de K_{obs} vs concentraciones de TCO.¹³⁶

6.5.7 Conjugación de bevacizumab con NHS-TCO

Previo a la conjugación con TCO, se removieron los excipientes de bevacizumab (25 mg/mL) a través de una columna de exclusión molecular PD-10 equilibrada con PBS (pH 7.4). La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia a 280 nm. A 5 mg de disolución de anticuerpo en PBS, se añadieron 40 μ L de tampón de carbonato de sodio (1 M) para ajustar el pH de la mezcla a 9.5, seguido de la adición de TCO-NHS (Conjuprobe, 5 mg/mL en DMSO seco, 10 eq), con un volumen de reacción final ajustado a 1 mL con PBS. La mezcla de reacción se protegió de la luz y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min con agitación lenta. El AcMo conjugado se purificó por PD-10 en PBS. La concentración del AcMo-TCO purificado se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y se almacenó a 4 °C.

6.5.8 Número de TCO reactivos

La cantidad de TCO reactivos por anticuerpo se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE después de la reacción de diferentes concentraciones de Cy7-metiltetrazina (Click Chemistry Tools) con bevacizumab-TCO. Brevemente, se incubaron alícuotas de 100 μ g de disolución de bevacizumab-TCO (4 mg/mL) con 1, 3, 6, 9 y 12 equivalentes de Cy7-metiltetrazina en un volumen final de 100 μ L durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, alícuotas de cada reacción fueron sembradas (buffer de carga reductor) en un gel de poliacrilamida homogéneo al 10 % y separadas mediante electroforesis utilizando un buffer de electroforesis (10 % SDS). Finalmente, el gel fue fotografiado y analizado en un In-Vivo MS FX PRO (Bruker) mediante la intensidad de pixeles de las bandas. El número de TCO reactivos se calculó por la relación entre la intensidad de fluorescencia unida al anticuerpo con respecto a la señal obtenida cuando se incubó 1 equivalente de la sonda fluorescente.

6.5.9 Actividad *in vitro* de bevacizumab-TCO

La capacidad de unión de bevacizumab-TCO por su diana molecular *in vitro* se comparó con bevacizumab mediante SPR utilizando un Biacore 3000 (GE Healthcare) utilizando HBS-EP (GE Healthcare) como buffer de corrida. Para tal motivo, la proteína recombinante humana VEGF165 (Abcam (ab9571), 38 KDa) se inmovilizó en un chip

sensor CM5 (GE Healthcare) mediante unión covalente de grupos amino según recomendaciones del fabricante. Para ello se activó la superficie con una mezcla 1:1 de 0.2M N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) y 0.05M N-hydroxysuccinimide (NHS) a un flujo de 5 μ l/min. Una solución de VEGF 5 μ g/mL diluido en buffer acetato pH 4.5 se inyectó sobre la superficie activada obteniéndose una densidad final de 300 RU y finalmente los grupos reactivos se inactivaron con una inyección de 1.0 M etanolamina-HCl, pH 8.5. Disoluciones de bevacizumab y bevacizumab-TCO a dos concentraciones diferentes (10 nM y 50 nM) se prepararon en buffer de corrida y se inyectaron sobre la superficie con VEGF y una superficie control sin derivatizar. Los sensogramas fueron obtenidos a 25°C con un flujo de 20 μ L/min y doble referenciados mediante sustracción de la señal de la superficie control y la señal obtenida de inyecciones de buffer de corrida sobre ambas superficies. Los datos obtenidos fueron procesados mediante la utilización del software BIAevaluation (GE Healthcare, versión 4.1) y re-graficados mediante la utilización de GraphPad®.

6.5.10 Evaluación biológica

Los experimentos en ratones normales fueron realizados según el protocolo aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Universidad de la República, Uruguay) (Referencia 240011-001109-16). Los protocolos de trabajo en ratones inducidos con tumor se realizaron con la aprobación del Colegio Brasileño de Experimentación Animal y fueron aprobados por el Comité de Ética (Número de registro 101-17).

6.5.10.1 Biodistribución en ratones normales

El comportamiento biológico de los derivados de **2d** y **3d** radiomarcados se evaluó mediante un ensayo de biodistribución en ratones normales C57 BL/6J. Para ello, fueron inyectados por vía intravenosa con ^{99m}Tc -**2d** o ^{99m}Tc -**3d** (1.4-5.55 MBq, 5.55 GBq/mg) y sacrificados luego de 1, 4 y 24 h (n = 4). Los órganos y tejidos de interés se diseccionaron, pesaron y la radioactividad de las muestras se midió en un contador gamma. La radioactividad en la orina y las heces también se determinó. La radioactividad se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) o porcentaje de dosis inyectada (% DI). La cantidad total de sangre se consideró como el 6.5 % del peso corporal total.

6.5.10.2 Modelo tumoral

Los estudios de imagen fueron realizados en un modelo murino de melanoma. La línea celular murina B16-F10 se obtuvo de ATCC y se cultivó con RPMI (suero bovino fetal al 10 %). Para la inducción tumoral, se inyectaron ratones C57 BL/6J por vía subcutánea en el flanco dorsal con 3×10^5 células de melanoma B16-F10 en PBS. El crecimiento tumoral se controló y midió diariamente y después de 8 días los tumores alcanzaron un peso de 0.3-0.5 g. Los estudios de biodistribución e imagen se realizaron entre los días 8 y 11 después de la inducción del tumor.

6.5.10.3 Biodistribución, estudio de la reacción bio-ortogonal en modelo tumoral murino

La reacción bio-ortogonal se evaluó mediante una estrategia pre-dirigida en ratones C57 BL/6J portadores de tumor inducido con células B16-F10. Para ello, se administró 0.1 mg de bevacizumab-TCO (1 mg/mL). El anticuerpo conjugado se dejó circular durante 24 h. Después de este período, cada ratón recibió $^{99m}\text{Tc-3d}$ (1.4-5.55 MBq, 5.55 GBq/mg) en PBS estéril. El derivado Tz radiomarcado se dejó reaccionar durante 1, 4 y 24 h después de la segunda inyección (n = 4). Todas las administraciones se realizaron a través de la vena peneana bajo anestesia con isoflurano. Después del intervalo de biodistribución, los animales fueron anestesiados y sacrificados en cámara de gas de CO₂. Un grupo de control (n = 4) se administró primero con bevacizumab no conjugado seguido de un período de biodistribución de 4 h de $^{99m}\text{Tc-3d}$. Los órganos y tejidos de interés se disecaron, se pesaron y se midió la radiactividad. La radioactividad se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) o porcentaje de dosis inyectada (% DI).

6.5.10.4 Imágenes, Estudio de la reacción bio-ortogonal en modelo tumoral murino

Previo al comienzo del protocolo de imágenes SPECT-CT, se confirmó la presencia de tumores de melanoma en los ratones C57 BL/6J mediante imágenes PET con [^{18}F]FDG. Ocho días posterior a la inoculación de células tumorales, un grupo de seis animales recibió una dosis de 74 MBq/ratones de [^{18}F]FDG por vía intraperitoneal. Luego de un periodo de 45 min, los ratones se anestesiaron (isoflurano al 3 %) para la adquisición en la cámara PET.

La obtención de imágenes SPECT se realizó siguiendo un protocolo similar al utilizado en experimentos de biodistribución utilizando una estrategia pre-dirigida. Para ello, se administró 0.1 mg de bevacizumab-TCO (1 mg/mL). El anticuerpo conjugado se dejó circular durante 24 h. Después de este período, cada ratón recibió $^{99m}\text{Tc-3d}$ (74 MBq, 18.5 GBq/mg) en PBS estéril. El derivado Tz radiomarcado se dejó reaccionar durante 1, 4 y 24 h después de la segunda inyección (n = 4). Las imágenes SPECT-CT se adquirieron después de 1, 4 y 24 horas después del segundo paso. Se realizaron dos controles de imagen en ratones portadores de tumores. Uno de los animales control recibió 5 mg de bevacizumab por vía intraperitoneal 1 h antes de la administración de 0.1 mg de bevacizumab-TCO (C1) y el segundo ratón control recibió bevacizumab en lugar de bevacizumab-TCO (C2). Todos los animales fueron sacrificados después de la imagen de 24 h.

Las imágenes de PET y SPECT-CT se realizaron en un instrumento micro PET/SPECT/CT (Triumph, Trifoil Imaging Inc.). Para la obtención de imágenes PET, los animales se colocaron anestesiados en el escáner con la región del tumor ubicada en el campo de visión y se realizó una exploración de 20 minutos, 45 minutos después de la administración del radiotrazador. Se realizaron procedimientos similares para las imágenes SPECT/CT, siendo las imágenes de CT adquiridas inmediatamente después del escaneo SPECT para identificar la anatomía. Se obtuvo gammagrafía SPECT usando un colimador de 5 orificios con 32 proyecciones 1 h, 4 h y 24 horas después de la inyección intravenosa de $^{99m}\text{Tc-3d}$ con 30, 60 y 120 segundos por proyección, respectivamente. Los sinogramas de emisión se reconstruyeron iterativamente (OSEM: 20 iteraciones y 4 subconjuntos para PET y 5 iteraciones y 8 subconjuntos para SPECT) después de normalizarse y corregirse el decaimiento radioactivo. También se obtuvieron imágenes de tomografía computarizada (TC) con 45 kVp, 360 μA en 256 proyecciones y un aumento de 1.3 para la correlación anatómica. Cada fusión y cuantificación de imagen se realizó por AMIDE.exe 1.0.4.

7 Conclusiones y Perspectivas

La detección de tumores a través de blancos moleculares mediante estrategias de marcación pre-dirigidas, se presenta actualmente como un abordaje prometedor para sortear los inconvenientes asociados con el uso de AcMo como agentes de imagen y radioterapia.

Durante el presente trabajo doctoral, se demostró la factibilidad de una estrategia de marcación con ^{99m}Tc basada en la reacción entre [1,2,4,5]tetrazinas y TCO. En este sentido se sintetizaron tres derivados de TZ que poseían una subestructura derivada del quelante HYNIC. Los mismos se marcaron de forma eficiente y reaccionaron de forma selectiva con biomoléculas portadoras de la etiqueta bio-ortogonal TCO, posterior a su marcación. La reactividad de los derivados TZ radiomarcados se evidenció mediante la marcación de las biomoléculas *in vivo* en modelos tumorales murinos, lo que permitió la detección tumoral a través de imágenes SPECT-CT.

La obtención de un derivado TZ marcado con ^{99m}Tc que presente una eliminación rápida, baja retención inespecífica, y que presente una vida media en plasma suficiente para una reacción *in vivo* eficiente, depende de la obtención y evaluación biológica de nuevos derivados diseñados con tal fin. En este sentido, los esfuerzos realizados en la obtención de nuevos derivados TZ, permitió demostrar dicha premisa. La realización de modificaciones estructurales sobre la tetrazina orientadas a incrementar la eliminación por vía renal, resultaron en un compuesto con un perfil de biodistribución mejorado.

Como perspectiva, se plantea continuar la búsqueda de nuevos derivados tetrazina marcados con ^{99m}Tc . La obtención de un derivado adecuado y la naturaleza modular de la estrategia pre-dirigida, permitiría a través de la marcación de un único derivado la marcación *in vivo* de varios AcMo. De forma similar, se pretende evaluar el uso de los derivados ya desarrollados como estrategia marcación de biomoléculas *in vitro*.

Entre las perspectivas, más a corto plazo, se propone estudiar condiciones de desprotección adecuadas para el derivado **d.4** o la incorporación de otras secuencias peptídicas a modo de espaciadores que carezcan de Lys

8 Bibliografía

- (1) Siegel, R. Cancer Statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, 67 (0), 7–30.
- (2) Torre, L. A.; Siegel, R. L.; Ward, E. M.; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2016**, 25 (1), 16–27.
- (3) Bunz, F. *Principles of Cancer Genetics*, 1st ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008.
- (4) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646–674.
- (5) Etzioni, R.; Urban, N.; Ramsey, S.; McIntosh, M.; Schwartz, S.; Reid, B.; Radich, J.; Anderson, G.; Hartwell, L. The Case for Early Detection. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3 (4), 243–252.
- (6) Aggarwal, S. Targeted Cancer Therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9 (6), 427–428.
- (7) Ferlay, J.; Soerjomataram I, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman D, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**, 136 (5), E359-386.
- (8) Mankoff, D. A Definition of Molecular Imaging. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48 (6), 18N, 21N.
- (9) Chen, Z.-Y.; Wang, Y.-X.; Lin, Y.; Zhang, J.-S.; Yang, F.; Zhou, Q.-L.; Liao, Y.-Y. Advance of Molecular Imaging Technology and Targeted Imaging Agent in Imaging and Therapy. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 1–12.
- (10) Weissleder, R. Molecular Imaging in Cancer. *Science.* **2006**, 312 (5777), 1168–1171.
- (11) King, D. M. Imaging of Metastatic Melanoma. *Cancer Imaging* **2006**, 6, 204–208.

- (12) Gambhir, S. S. Molecular Imaging of Cancer with Positron Emission Tomography. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2 (9), 683–693.
- (13) Buchbender, C.; Heusner, T.; Lauenstein, T. C.; Bockisch, A.; Antoch, G. Oncologic PET/MRI, Part 2: Bone Tumors, Soft-Tissue Tumors, Melanoma, and Lymphoma. *J. Nucl. Med.* **2012**, 53 (8), 1244–1252.
- (14) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, 92 (2), 897–965.
- (15) Sheikhabaei, S.; Ahn, S. J.; Young, B.; Taghipour, M.; Marcus, C.; Subramaniam, R. M. Comparative Effectiveness: ^{18}F -FDG-PET/CT versus CT for Post-Treatment Follow-up of Patients with Lung Cancer. *Nucl. Med. Commun.* **2017**, 38 (8), 720–725.
- (16) Williams, L. E. Anniversary Paper: Nuclear Medicine: Fifty Years and Still Counting. *Med. Phys.* **2008**, 35 (7), 3020–3029.
- (17) Elsinga, P.; Todde, S.; Penuelas, I. Guidance on Current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) for the Small-Scale Preparation of Radiopharmaceuticals. **2010**, 1049–1062.
- (18) Wadsak, W.; Mitterhauser, M. Basics and Principles of Radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur. J. Radiol.* **2010**, 73 (3), 461–469.
- (19) Eckelman, W. C. Unparalleled Contribution of Technetium-99m to Medicine Over 5 Decades. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2009**, 2 (3), 364–368.
- (20) Liu, S.; Chakraborty, S. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Centered One-Pot Synthesis for Preparation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Radiotracers. *Dalt. Trans.* **2011**, 40 (23), 6077.
- (21) International Atomic Energy Agency. *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits.*; 2008; Vol. 466.
- (22) Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-Specific Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33 (7), 445–461.
- (23) Yang, D. J.; Kim, E. E.; Inoue, T. Targeted Molecular Imaging in Oncology. *Ann. Nucl. Med.* **2006**, 20 (1), 1–11.
- (24) Bae, Y. H.; Park, K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and

- Possibility. *J. Control. Release* **2011**, *153* (3), 198–205.
- (25) Rhodes, B. A. Direct Labeling of Proteins with ^{99m}Tc . *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* **1991**, *18* (7), 667–676.
- (26) Anderson, C. J.; Welch, M. J. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2219–2234.
- (27) Brechbiel, M. Bifunctional Chelates for Metal Nuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. imaging* **2008**, *52* (2), 166–173.
- (28) Liu, S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (12), 1347–1370.
- (29) Seaman, M. E.; Contino, G.; Bardeesy, N.; Kelly, K. A. Molecular Imaging Agents: Impact on Diagnosis and Therapeutics in Oncology. *Expert Rev. Mol. Med.* **2010**, *12*, e20.
- (30) Quon, A.; Gambhir, S. S. FDG-PET and Beyond: Molecular Breast Cancer Imaging. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23* (8), 1664–1673.
- (31) Haubner, R.; Decristoforo, C. Radiotracer II: Peptide-Based Radiopharmaceuticals. In *Small Animal Imaging*; Kiessling, F., Pichler, B. J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 247–266.
- (32) Roosenburg, S.; Laverman, P.; van Delft, F. L.; Boerman, O. C. Radiolabeled CCK/gastrin Peptides for Imaging and Therapy of CCK2 Receptor-Expressing Tumors. *Amino Acids* **2011**, *41* (5), 1049–1058.
- (33) Maecke, H. R. Radiolabeled Peptides in Nuclear Oncology: Influence of Peptide Structure and Labeling Strategy on Pharmacology. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2005**, No. 49, 43–72.
- (34) Garcia, M. F.; Zhang, X.; Gallazzi, F.; Fernandez, M.; Moreno, M.; Gambini, J. P.; Porcal, W.; Cabral, P.; Quinn, T. P. Evaluation of Tricine and EDDA as Co-Ligands for ^{99m}Tc -Labeled HYNIC-MSH Analogs for Melanoma Imaging. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2014**, *15* (1), 122–130.
- (35) Keenan, M.; Harbert, J. C.; Larson, S. M. Monoclonal Antibodies in Nuclear

- Medicine. *J. Nucl. Med.* **1985**, *26* (5), 531–537.
- (36) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *125* (2), S41–S52.
- (37) Goding, J. W. Introduction. In *Monoclonal Antibodies*; Elsevier, 1996; pp 1–6.
- (38) Winter, G.; Milstein, C. Man-Made Antibodies. *Nature* **1991**, *349* (6307), 293–299.
- (39) Levene, A. P. Therapeutic Monoclonal Antibodies in Oncology. *J. R. Soc. Med.* **2005**, *98* (4), 146–152.
- (40) Wu, A. M.; Olafsen, T. Antibodies for Molecular Imaging of Cancer. *Cancer J.* **2008**, *14* (3), 191–197.
- (41) Sugiura, G.; Kühn, H.; Sauter, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. Radiolabeling Strategies for Tumor-Targeting Proteinaceous Drugs. *Molecules* **2014**, *19* (2), 2135–2165.
- (42) Wilbur, D. S. Radiohalogenation of Proteins: An Overview of Radionuclides, Labeling Methods and Reagents for Conjugate Labeling. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (6), 433–470.
- (43) Fisher, R. I.; Kaminski, M. S.; Wahl, R. L.; Knox, S. J.; Zelenetz, A. D.; Vose, J. M.; Leonard, J. P.; Kroll, S.; Goldsmith, S. J.; Coleman, M. Tositumomab and Iodine-131 Tositumomab Produces Durable Complete Remissions in a Subset of Heavily Pretreated Patients With Low-Grade and Transformed Non-Hodgkin's Lymphomas. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23* (30), 7565–7573.
- (44) Bienert, M.; Reisinger, I.; Srock, S.; Humplik, B. I.; Reim, C.; Kroessin, T.; Avril, N.; Pezzutto, A.; Munz, D. L. Radioimmunotherapy Using ¹³¹I-Rituximab in Patients with Advanced Stage B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Initial Experience. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (10), 1225–1233.
- (45) Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H. 18F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (62), 15553–15577.
- (46) Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. Labeling Proteins with Fluorine-18 Using N-

- Succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* **1992**, *19* (3), 275–281.
- (47) Cheng, Z.; De Jesus, O. P.; Namavari, M.; De, A.; Levi, J.; Webster, J. M.; Zhang, R.; Lee, B.; Syud, F. A.; Gambhir, S. S. Small-Animal PET Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2 Expression with Site-Specific ¹⁸F-Labeled Protein Scaffold Molecules. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (5), 804–813.
- (48) van de Watering, F. C. J.; Rijpkema, M.; Robillard, M.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C. Pretargeted Imaging and Radioimmunotherapy of Cancer Using Antibodies and Bioorthogonal Chemistry. *Front. Med.* **2014**, *1*, 1–11.
- (49) Liu, S. 6-Hydrazinonicotinamide Derivatives as Bifunctional Coupling Agents for ^{99m}Tc-Labeling of Small Biomolecules. In *Contrast Agents III. Topics in Current Chemistry*; W, K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2005; pp 117–153.
- (50) Abrams, M. J.; Juweid, M.; TenKate, C. I.; Schwartz, D.; Hauser, M. M.; Gaul, F. E.; Fuccello, J.; Rubin, R. H.; Strauss, H. W.; Fischman, J. Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *J. Nucl. Med.* **1990**, *31* (12), 2022–2028.
- (51) Liu, S.; Edwards, D. S.; Looby, R. J.; Harris, R.; Poirier, M. J.; Barrett, J.; Heminway, S. J.; Carroll, T. R. Labeling a Hydrazino Nicotinamide-Modified Cyclic IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc Using Aminocarboxylates as Coligands. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (1), 63–71.
- (52) Dams, E. T.; Oyen, W. J.; Boerman, O. C.; Claessens, R.; Wymenga, B.; van der Meer, J. W.; Corstens, F. H. Technetium-99m Labeled to Human Immunoglobulin G through the Nicotinyl Hydrazine Derivative: A Clinical Study. *J. Nucl. Med.* **1998**, *39* (1), 119–124.
- (53) Decristoforo, C.; Mather, S. J. ^{99m}Tc-Technetium-Labelled Peptide-HYNIC Conjugates: Effects of Lipophilicity and Stability on Biodistribution. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26* (4), 389–396.
- (54) Rennen, H. J.; Boerman, O. C.; Koenders, E. B.; Oyen, W. J.; Corstens, F. H. Labeling Proteins with Tc-99m via Hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the Conjugation Reaction. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27* (6), 599–604.

- (55) Meszaros, L. K.; Dose, A.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. Hydrazinonicotinic Acid (HYNIC) – Coordination Chemistry and Applications in Radiopharmaceutical Chemistry. *Inorganica Chim. Acta.* **2010**, *363* (6), 1059–1069.
- (56) King, R. C.; Surfraz, M. B.-U.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J.; Mather, S. J. How Do HYNIC-Conjugated Peptides Bind Technetium? Insights from LC-MS and Stability Studies. *Dalton Trans.* **2007**, No. 43, 4998–5007.
- (57) Surfraz, M. B.-U.; King, R.; Mather, S. J.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. Trifluoroacetyl-HYNIC Peptides: Synthesis and ^{99m}Tc Radiolabeling. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (6), 1418–1422.
- (58) Surfraz, M. B.-U.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. A Technetium Intermediate Specifically Promotes Deprotection of Trifluoroacetyl HYNIC during Radiolabelling under Mild Conditions. *Dalton Trans.* **2008**, No. 22, 2920–2922.
- (59) Harris, T. D.; Sworin, M.; Williams, N.; Rajopadhye, M.; Damphousse, P. R.; Glowacka, D.; Poirier, M. J.; Yu, K. Synthesis of Stable Hydrazones of a Hydrazinonicotinyl-Modified Peptide for the Preparation of ^{99m}Tc -Labeled Radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (5), 808–814.
- (60) Reilly, R. M.; Sandhu, J.; Alvarez-Diez, T. M.; Gallinger, S.; Kirsh, J.; Stern, H. Problems of Delivery of Monoclonal Antibodies. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28* (2), 126–142.
- (61) Goldenberg, D. M.; Sharkey, R. M. Novel Radiolabeled Antibody Conjugates. *Oncogene.* **2007**, *26* (25), 3734–3744.
- (62) Goldenberg, D. M.; Sharkey, R. M.; Paganelli, G.; Barbet, J.; Chatal, J. F. Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24* (5), 823–834.
- (63) Altai, M.; Membreno, R.; Cook, B.; Tolmachev, V.; Zeglis, B. M. Pretargeted Imaging and Therapy. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (10), 1553–1559.
- (64) Reardan, D. T.; Meares, C. F.; Goodwin, D. A.; McTigue, M.; David, G. S.; Stone, M. R.; Leung, J. P.; Bartholomew, R. M.; Frincke, J. M. Antibodies against Metal Chelates. *Nature* **1985**, *316* (6025), 265–268.
- (65) Goodwin, D. A.; Meares, C. F.; McCall, M. J.; McTigue, M.; Chaovapong, W.

- Pre-Targeted Immunoscintigraphy of Murine Tumors with Indium-111-Labeled Bifunctional Haptens. *J. Nucl. Med.* **1988**, 29 (2), 226–234.
- (66) Hnatowich, D. J.; Virzi, F.; Rusckowski, M. Investigations of Avidin and Biotin for Imaging Applications. *J. Nucl. Med.* **1987**, 28 (8), 1294–1302.
- (67) Stickney, D. R.; Anderson, L. D.; Slater, J. B.; Ahlem, C. N.; Kirk, G. A.; Schweighardt, S. A.; Frincke, J. M. Bifunctional Antibody: A Binary Radiopharmaceutical Delivery System for Imaging Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* **1991**, 51 (24), 6650–6655.
- (68) Karacay, H.; McBride, W. J.; Griffiths, G. L.; Sharkey, R. M.; Barbet, J.; Hansen, H. J.; Goldenberg, D. M. Experimental Pretargeting Studies of Cancer with a Humanized Anti-CEA × Murine Anti-[In-DTPA] Bispecific Antibody Construct and a 99m Tc-/188 Re-Labeled Peptide. *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11 (6), 842–854.
- (69) Sharkey, R. M.; Karacay, H.; Griffiths, G. L.; Behr, T. M.; Blumenthal, R. D.; Mattes, M. J.; Hansen, H. J.; Goldenberg, D. M. Development of a Streptavidin–Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody, Radiolabeled Biotin Pretargeting Method for Radioimmunotherapy of Colorectal Cancer. Studies in a Human Colon Cancer Xenograft Model. *Bioconjug. Chem.* **1997**, 8 (4), 595–604.
- (70) Hnatowich, D. J.; Fritz, B.; Virzi, F.; Mardirossian, G.; Rusckowski, M. Improved Tumor Localization with (Strept)avidin and Labeled Biotin as a Substitute for Antibody. *Nucl. Med. Biol.* **1993**, 20 (2), 189–195.
- (71) Virzi, F.; Fritz, B.; Rusckowski, M.; Gionet, M.; Misra, H.; Hnatowich, D. J. New Indium-111 Labeled Biotin Derivatives for Improved Immunotargeting. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* **1991**, 18 (7), 719–726.
- (72) Kalofonos, H. P.; Rusckowski, M.; Siebecker, D. A.; Sivolapenko, G. B.; Snook, D.; Lavender, J. P.; Epenetos, A. A.; Hnatowich, D. J. Imaging of Tumor in Patients with Indium-111-Labeled Biotin and Streptavidin-Conjugated Antibodies: Preliminary Communication. *J. Nucl. Med.* **1990**, 31 (11), 1791–1796.
- (73) Cremonesi, M.; Ferrari, M.; Chinol, M.; Stabin, M. G.; Grana, C.; Prisco, G.; Robertson, C.; Tosi, G.; Paganelli, G. Three-Step Radioimmunotherapy with Yttrium-90 Biotin: Dosimetry and Pharmacokinetics in Cancer Patients. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, 26 (2), 110–120.

- (74) Paganelli, G.; Pervez, S.; Siccardi, A. G.; Rowlinson, G.; Deleide, G.; Chiolerio, F.; Malcovati, M.; Scassellati, G. A.; Epenetos, A. A. Intraperitoneal Radio-Localization of Tumors Pre-Targeted by Biotinylated Monoclonal Antibodies. *Int. J. Cancer* **1990**, *45* (6), 1184–1189.
- (75) Kuijpers, W. H. A.; Bos, E. S.; Kaspersen, F. M.; Veeneman, G. H.; van Boeckel, C. A. A. Specific Recognition of Antibody-Oligonucleotide Conjugates by Radiolabeled Antisense Nucleotides: A Novel Approach for Two-Step Radioimmunotherapy of Cancer. *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4* (1), 94–102.
- (76) Liu, G.; Mang'era, K.; Liu, N.; Gupta, S.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J. Tumor Pretargeting in Mice Using (99m)Tc-Labeled Morpholino, a DNA Analog. *J. Nucl. Med.* **2002**, *43* (3), 384–391.
- (77) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (78) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998.
- (79) Hermanson, G. T. The Reactions of Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*; Elsevier, 2013; pp 229–258.
- (80) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (25), 14846–14851.
- (81) Van Swieten, P. F.; Leeuwenburgh, M. A.; Kessler, B. M.; Overkleeft, H. S. Bioorthogonal Organic Chemistry in Living Cells: Novel Strategies for Labeling Biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *3*, 20–27.
- (82) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13–21.
- (83) Rideout, D.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J.; McCarthy, M. Synergism through Direct Covalent Bonding between Agents: A Strategy for Rational Design of Chemotherapeutic Combinations. *Biopolymers* **1990**, *29* (1), 247–262.
- (84) Cornish, V. W.; Hahn, K. M.; Schultz, P. G. Site-Specific Protein Modification

- Using a Ketone Handle. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (34), 8150–8151.
- (85) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-Directed Conjugation of Nonpeptide Groups to Peptides and Proteins Via Periodate Oxidation of a 2-Amino Alcohol. Application to Modification at N-Terminal Serine. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (2), 138–146.
- (86) Rotenberg, S. A.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J. S.; Weinstein, I. B.; Rideout, D. A Self-Assembling Protein Kinase C Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (6), 2490–2494.
- (87) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* (80-.). **1997**, *276* (5315), 1125–1128.
- (88) Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. Ketone Isosteres of 2-N-Acetamidoglycans as Substrates for Metabolic Cell Surface Engineering [7]. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (6), 1242–1243.
- (89) Datta, D.; Wang, P.; Carrico, I. S.; Mayo, S. L.; Tirrell, D. A. A Designed Phenylalanyl-tRNA Synthetase Variant Allows Efficient in Vivo Incorporation of Aryl Ketone Functionality into Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (20), 5652–5653.
- (90) Zeng, Y.; Ramya, T. N. C.; Dirksen, A.; Dawson, P. E.; Paulson, J. C. High-Efficiency Labeling of Sialylated Glycoproteins on Living Cells. *Nat. Methods* **2009**, *6* (3), 207–209.
- (91) Jencks, W. P. Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (2), 475–481.
- (92) Zhang, Z.; Smith, B. A. C.; Wang, L.; Brock, A.; Cho, C.; Schultz, P. G. A New Strategy for the Site-Specific Modification of Proteins in Vivo. *Biochemistry* **2003**, *42* (22), 6735–6746.
- (93) Staudinger, H.; Hauser, E. Über Neue Organische Phosphorverbindungen IV Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1921**, *4* (1), 861–886.
- (94) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*

- (33), 5188–5240.
- (95) Van Berkel, S. S.; Van Eldijk, M. B.; Van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8806–8827.
- (96) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
- (97) Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals. *Nature* **2004**, *430* (7002), 873–878.
- (98) Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulère, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. Staudinger Ligation: A New Immobilization Strategy for the Preparation of Small-Molecule Arrays. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (47), 5830–5834.
- (99) Hang, H. C.; Yu, C.; Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. Probing Glycosyltransferase Activities with the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 6–7.
- (100) Vocadlo, D. J.; Bertozzi, C. R. A Strategy for Functional Proteomic Analysis of Glycosidase Activity from Cell Lysates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43* (40), 5338–5342.
- (101) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. Incorporation of Azides into Recombinant Proteins for Chemoselective Modification by the Staudinger Ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (1), 19–24.
- (102) Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; Van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R. Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2686–2695.
- (103) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2* (10), 565–598.
- (104) Carell, T.; Vrabel, M.; Yang, M.; Yang, Y.; Chen, P. R.; Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L.; Herner, A.; Lin, Q.; Wu, H.; Devaraj, N. K.; Kath-Schorr, S. Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 15.
- (105) Díaz, D. D.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Fokin, V.; Hawker, J. Investigación

Química Cicloadición 1,3-Dipolar de Azidas Y Alquinos . I : Principales Aspectos Sintéticos. *An. Química* **2008**, *104* (3), 173–180.

- (106) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
- (107) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *6417* (914), 2596–2599.
- (108) Meldal, M.; Tomøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide - Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.
- (109) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today.* **2003**, *8* (24), 1128–1137.
- (110) Wolbers, F.; ter Braak, P.; Le Gac, S.; Luttge, R.; Andersson, H.; Vermes, I.; van den Berg, A. Viability Study of HL60 Cells in Contact with Commonly Used Microchip Materials. *Electrophoresis* **2006**, *27* (24), 5073–5080.
- (111) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. Presentation and Detection of Azide Functionality in Bacterial Cell Surface Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (34), 10598–10602.
- (112) Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4686–4687.
- (113) Link, A. J.; Tirrell, D. A. Cell Surface Labeling of Escherichia Coli via copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11164–11165.
- (114) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (115) Wittig, G.; Pohlke, R. Zur Existenz Niedergliederiger Cycloalkine, II. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (12), 3276–3286.

- (116) Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. Die Ringspannung von Cycloalkinen Und Ihre Spektroskopischen Auswirkungen. *Chem. Ber.* **1980**, *113* (7), 2398–2409.
- (117) Turner, R. B.; Jarrett, A. D.; Goebel, P.; Mallon, B. J. Heats of Hydrogenation. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (3), 790–792.
- (118) Shea, K. J.; Kim, J. S. Influence of Strain on Chemical-Reactivity - Relative Reactivity of Torsionally Strained Double-Bonds in 1,3-Dipolar Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (12), 4846–4855.
- (119) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648.
- (120) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I.; Lo, A.; Codelli, J.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (43), 16793–16797.
- (121) Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. *ChemBioChem.* **2011**, *12* (12), 1912–1921.
- (122) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688–3690.
- (123) Poloukhine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.; Popik, V. V. Selective Labeling of Living Cells by a Photo-Triggered Click Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (43), 15769–15776.
- (124) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. Aza-Dibenzocyclooctynes for Fast and Efficient Enzyme PEGylation via Copper-Free (3+2) Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (1), 97–99.
- (125) Spicciarich, D. R.; Nolley, R.; Maund, S. L.; Purcell, S. C.; Herschel, J.; Iavarone, A. T.; Peehl, D. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Labeling of Human Prostate Cancer Tissue Slice Cultures for Glycoproteomics. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (31), 8992–8997.

- (126) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
- (127) Boger, D. L. Diels-Alder Reactions of Heterocyclic Aza Dienes. Scope and Applications. *Chem. Rev.* **1986**, *86* (5), 781–794.
- (128) Thalhammer, F.; Wallfahrer, U.; Sauer, J. Reaktivität Einfacher Offenkettiger Und Cyclischer Dienophile Bei Diels-Alder-Reaktionen Mit Inversem Elektronenbedarf. *Tetrahedron Letters* **1990**, *47*(31), 6851–6854.
- (129) Selvaraj, R.; Fox, J. M. Trans-Cyclooctene—a Stable, Voracious Dienophile for Bioorthogonal Labeling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (5), 753–760.
- (130) Knall, A. C.; Slugovc, C. Inverse Electron Demand Diels–Alder (IEDDA)-Initiated Conjugation: A (High) Potential Click Chemistry Scheme. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (12), 5131.
- (131) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Communications* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
- (132) Carell, T.; Vrabl, M. Bioorthogonal Chemistry—Introduction and Overview. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (1), 9.
- (133) Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. Clicking 1,2,4,5-Tetrazine and Cyclooctynes with Tunable Reaction Rates. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (12), 1736–1738.
- (134) Lang, K.; Davis, L.; Torres-Kolbus, J.; Chou, C.; Deiters, A.; Chin, J. W. Genetically Encoded Norbornene Directs Site-Specific Cellular Protein Labelling via a Rapid Bioorthogonal Reaction. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (4), 298–304.
- (135) Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (11), 2263–2270.
- (136) Yazdani, A.; Janzen, N.; Czorny, S.; Ungard, R. G.; Miladinovic, T.; Singh, G.; Valliant, J. F. Preparation of Tetrazine-Containing [2 + 1] Complexes of ^{99m}Tc and in Vivo Targeting Using Bioorthogonal Inverse Electron Demand Diels–Alder

- Chemistry. *Dalt. Trans.* **2017**, *46* (42), 14691–14699.
- (137) Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulderson, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chemie* **2010**, *122* (19), 3447–3450.
- (138) Rossin, R.; van den Bosch, S. M.; Ten Hoeve, W.; Carvelli, M.; Versteegen, R. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. Highly Reactive Trans-Cyclooctene Tags with Improved Stability for Diels-Alder Chemistry in Living Systems. *Bioconjug. Chem.* **2013**.
- (139) Carboni, R. A.; Lindsey, R. V. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (16), 4342–4346.
- (140) Sauer, J.; Heldmann, D. K.; Hetzenegger, J.; Krauthan, J.; Sichert, H.; Schuster, J. 1,2,4,5-Tetrazine: Synthesis and Reactivity in [4+2] Cycloadditions. *European J. Org. Chem.* **1998**, No. 12, 2885–2896.
- (141) Liu, F.; Liang, Y.; Houk, K. N. Theoretical Elucidation of the Origins of Substituent and Strain Effects on the Rates of Diels-Alder Reactions of 1,2,4,5-Tetrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (32), 11483–11493.
- (142) Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51* (21), 5222–5225.
- (143) Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (11), 2263–2270.
- (144) Royzen, M.; Yap, G. P. A.; Fox, J. M. A Photochemical Synthesis of Functionalized Trans-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (12), 3760–3761.
- (145) Devaraj, N. K.; Upadhyay, R.; Haun, J. B.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. Fast and Sensitive Pretargeted Labeling of Cancer Cells through a Tetrazine/Trans-Cyclooctene Cycloaddition. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 7013–7016.
- (146) Molinolo, A.; Miller, L. S.; Colcher, D.; Molinolo, A.; Siler, K. Therapeutic

- Advantage of High-Affinity Anticarcinoma Radioimmunoconjugates. *Cancer Res.* **1992**, *52* (5), 1067–1072.
- (147) Zeglis, B. M.; Sevak, K. K.; Reiner, T.; Mohindra, P.; Carlin, S. D.; Zanzonico, P.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. A Pretargeted PET Imaging Strategy Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (8), 1389–1396.
- (148) Devaraj, N. K.; Thurber, G. M.; Keliher, E. J.; Marinelli, B.; Weissleder, R. Reactive Polymer Enables Efficient in Vivo Bioorthogonal Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (13), 4762–4767.
- (149) Denk, C.; Svatunek, D.; Mairinger, S.; Stanek, J.; Filip, T.; Matscheko, D.; Kuntner, C.; Wanek, T.; Mikula, H. Design, Synthesis, and Evaluation of a Low-Molecular-Weight ¹¹C-Labeled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging Applying Bioorthogonal in Vivo Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (7), 1707–1712.
- (150) Keinänen, O.; Li, X. G.; Chenna, N. K.; Lumen, D.; Ott, J.; Molthoff, C. F. M.; Sarparanta, M.; Helariutta, K.; Vuorinen, T.; Windhorst, A. D.; Airaksinen, A. J. A New Highly Reactive and Low Lipophilicity Fluorine-18 Labeled Tetrazine Derivative for Pretargeted PET Imaging. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (1), 62–66.
- (151) Meyer, J. P.; Houghton, J. L.; Kozlowski, P.; Abdel-Atti, D.; Reiner, T.; Pillarsetty, N. V. K.; Scholz, W. W.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. ¹⁸F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (2), 298–301.
- (152) Rashidian, M.; Keliher, E. J.; Dougan, M.; Juras, P. K.; Cavallari, M.; Wojtkiewicz, G. R.; Jacobsen, J. T.; Edens, J. G.; Tas, J. M. J.; Vitoria, G.; Weissleder, R.; Ploegh, H. Use of ¹⁸F-2-Fluorodeoxyglucose to Label Antibody Fragments for Immuno-Positron Emission Tomography of Pancreatic Cancer. *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1* (3), 142–147.
- (153) Zhu, J.; Li, S.; Wängler, C.; Wängler, B.; Bruce Lennox, R.; Schirmacher, R. Synthesis of 3-Chloro-6-((4-(Di-Tert-Butyl[¹⁸F]fluorosilyl)-Benzyl)oxy)-1,2,4,5-Tetrazine ([¹⁸F]SiFA-OTz) for Rapid Tetrazine-Based ¹⁸F-Radiolabeling. *Chem.*

Commun. **2015**, *51* (62), 12415–12418.

- (154) Denk, C.; Svatunek, D.; Filip, T.; Wanek, T.; Lumpi, D.; Fröhlich, J.; Kuntner, C.; Mikula, H. Development of a ^{18}F -Labeled Tetrazine with Favorable Pharmacokinetics for Bioorthogonal PET Imaging. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (36), 9655–9659.
- (155) Herth, M. M.; Andersen, V. L.; Lehel, S.; Madsen, J.; Knudsen, G. M.; Kristensen, J. L. Development of a ^{11}C -Labeled Tetrazine for Rapid Tetrazine–trans-Cyclooctene Ligation. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (36), 3805.
- (156) Garcia, M. F.; Calzada, V.; Camacho, X.; Goicochea, E.; Gambini, J. P.; Quinn, T. P.; Porcal, W.; Cabral, P. Microwave-Assisted Synthesis of HYNIC Protected Analogue for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Labeled Antibody. *Curr. Radiopharm.* **2014**, *7* (2), 84–90.
- (157) Camacho, X.; Machado, C. L.; García, M. F.; Fernández, M.; Oddone, N.; Benech, J.; Gambini, J. P.; Cerecetto, H.; Chammas, R.; Cabral, P.; Riva, E. Tocilizumab Labeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ via HYNIC as a Molecular Diagnostic Agent for Multiple Myeloma. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2017**, *17* (9), 1–2.
- (158) Camacho, X.; García, M. F.; Calzada, V.; Fernández, M.; Chabalgoity, J. A.; Moreno, M.; Barbosa De Aguiar, R.; Alonso, O.; Gambini, J. P.; Chammas, R.; Cabral, P. [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$]-Radiolabeled Bevacizumab: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation in a Melanoma Model. *Oncology* **2013**, *84* (4), 200–209.
- (159) Cabral, P.; Calzada, V.; Fernández, M.; Gambini, J.; Garcia, F.; Porcal, W.; Quinn, T.; Alonso, O. Labeling and Biological Evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Trastuzumab as a Potential Radiopharmaceutical for *In Vivo* Evaluation of HER2 Expression in Breast Cancer. *World J. Nucl. Med.* **2013**, *12* (1), 27.
- (160) Garcia, M. F.; Camacho, X.; Calzada, V.; Fernandez, M.; Porcal, W.; Alonso, O.; Gambini, J. P.; Cabral, P. Synthesis of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nimotuzumab with Tricarbonyl Ion: *In Vitro* and *in Vivo* Studies. *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5* (1), 59–64.
- (161) Camacho, X.; García, M. F.; Calzada, V.; Fernández, M.; Chabalgoity, J. A.; Moreno, M.; Barbosa de Aguiar, R.; Alonso, O.; Gambini, J. P.; Chammas, R.; Cabral, P. [$\text{Tc}(\text{CO})_3$]-Radiolabeled Bevacizumab: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation in a Melanoma Model. *Oncology* **2013**, *84* (4), 200–209.

- (162) García, M. F.; Zhang, X.; Shah, M.; Newton-Northup, J.; Cabral, P.; Cerecetto, H.; Quinn, T. ^{99m}Tc-Bioorthogonal Click Chemistry Reagent for *in Vivo* Pretargeted Imaging. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (6), 1209–1215.
- (163) Vito, A.; Alarabi, H.; Czorny, S.; Beiraghi, O.; Kent, J.; Janzen, N.; Genady, A. R.; Alkarmi, S. A.; Rathmann, S.; Naperstkow, Z.; Blacker, M.; Llano, L.; Berti, P. J.; Valliant, J. F. A ^{99m}Tc-Labelled Tetrazine for Bioorthogonal Chemistry. Synthesis and Biodistribution Studies with Small Molecule Trans-Cyclooctene Derivatives. *PLoS One* **2016**, *11* (12), 1–15.
- (164) Yazdani, A.; Janzen, N.; Banevicius, L.; Czorny, S.; Valliant, J. F. Imidazole-Based [2 + 1] Re(I)/ ^{99m}Tc(I) Complexes as Isostructural Nuclear and Optical Probes. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (4), 1728–1736.
- (165) Yazdani, A.; Bilton, H.; Vito, A.; Genady, A. R.; Rathmann, S. M.; Ahmad, Z.; Janzen, N.; Czorny, S.; Zeglis, B. M.; Francesconi, L. C.; Valliant, J. F. A Bone-Seeking Trans-Cyclooctene for Pretargeting and Bioorthogonal Chemistry: A Proof of Concept Study Using ^{99m}Tc- and ¹⁷⁷Lu-Labeled Tetrazines. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9381–9389.
- (166) Rossin, R.; Van Duijnhoven, S. M. J.; Ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Kleijn, L. H. J.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Robillard, M. S. Triggered Drug Release from an Antibody-Drug Conjugate Using Fast “click-to-Release” Chemistry in Mice. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (7), 1697–1706.
- (167) Rossin, R.; Lappchen, T.; van den Bosch, S. M.; Laforest, R.; Robillard, M. S. Diels-Alder Reaction for Tumor Pretargeting: *In Vivo* Chemistry Can Boost Tumor Radiation Dose Compared with Directly Labeled Antibody. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (11), 1989–1995.
- (168) Rossin, R.; Van Duijnhoven, S. M. J.; Lappchen, T.; Van Den Bosch, S. M.; Robillard, M. S. Trans-Cyclooctene Tag with Improved Properties for Tumor Pretargeting with the Diels-Alder Reaction. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 3090–3096.
- (169) van Duijnhoven, S. M. J.; Rossin, R.; van den Bosch, S. M.; Wheatcroft, M. P.; Hudson, P. J.; Robillard, M. S. Diabody Pretargeting with Click Chemistry *In Vivo*. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (9), 1422–1428.
- (170) Houghton, J. L.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Cunanan, K. M.; Carlin, S.;

- Scholz, W. W.; Zanzonico, P. B.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Establishment of the *In Vivo* Efficacy of Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (1), 124–133.
- (171) Shah, M. A.; Zhang, X.; Rossin, R.; Robillard, M. S.; Fisher, D. R.; Bueltmann, T.; Hoeben, F. J. M.; Quinn, T. P. Metal-Free Cycloaddition Chemistry Driven Pretargeted Radioimmunotherapy Using α -Particle Radiation. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (12), 3007–3015.
- (172) Zou, J.; Glinsky, V. V.; Landon, L. a.; Matthews, L.; Deutscher, S. L. Peptides Specific to the Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain Inhibit Metastasis-Associated Cancer Cell Adhesion. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (2), 309–318.
- (173) Zeglis, B. M.; Sevak, K. K.; Reiner, T.; Mohindra, P.; Carlin, S. D.; Zanzonico, P.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. A Pretargeted PET Imaging Strategy Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (8), 1389–1396.
- (174) Liu, F. T.; Rabinovich, G. A. Galectins as Modulators of Tumour Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (1), 29–41.
- (175) Newton, J. R.; Miao, Y.; Deutscher, S. L.; Quinn, T. P. Melanoma Imaging with Pretargeted Bivalent Bacteriophage. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (3), 429–436.
- (176) Kumar, S. R.; Deutscher, S. L. ^{111}In -Labeled Galectin-3-Targeting Peptide as a SPECT Agent for Imaging Breast Tumors. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (5), 796–803.
- (177) Newton-Northup, J. R.; Dickerson, M. T.; Ma, L.; Besch-Williford, C. L.; Deutscher, S. L. Inhibition of Metastatic Tumor Formation *In Vivo* by a Bacteriophage Display-Derived Galectin-3 Targeting Peptide. *Clin. Exp. Metastasis.* **2013**, *30* (2), 119–132.
- (178) García, M. F. Síntesis de Ligandos Heterocíclicos Como Agentes Bifuncionales Para La Marcación Con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de Péptidos Para Imagen Molecular de La Expresión Del Receptor de La Alfa-MSH, Universidad de la República-Pedeciba Química, 2012.
- (179) Zeglis, B. M.; Mohindra, P.; Weissmann, G. I.; Divilov, V.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Lewis, J. S. Modular Strategy for the Construction of

- Radiometalated Antibodies for Positron Emission Tomography Based on Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22 (10), 2048–2059.
- (180) Reiner, T.; Keliher, E. J.; Earley, S.; Marinelli, B.; Weissleder, R. Synthesis and *In Vivo* Imaging of a ^{18}F -Labeled PARP1 Inhibitor Using a Chemically Orthogonal Scavenger-Assisted High-Performance Method. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, 50 (8), 1922–1925.
- (181) Newton, J. R.; Kelly, K. A.; Mahmood, U.; Weissleder, R.; Deutscher, S. L. *In Vivo* Selection of Phage for the Optical Imaging of PC-3 Human Prostate Carcinoma in Mice. *Neoplasia*. **2006**, 8 (9), 772–780.
- (182) Kelly, K. A.; Waterman, P.; Weissleder, R. *In Vivo* Imaging of Molecularly Targeted Phage. *Neoplasia*. **2006**, 8 (12), 1011–1018.
- (183) Deutscher, S. L. Phage Display in Molecular Imaging and Diagnosis of Cancer. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (5), 3196–3211.
- (184) Newton-Northup, J. R.; Figueroa, S. D.; Quinn, T. P.; Deutscher, S. L. Bifunctional Phage-Based Pretargeted Imaging of Human Prostate Carcinoma. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36 (7), 789–800.
- (185) Bashir-Uddin Surfraz, M.; King, R.; Mather, S. J.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. Trifluoroacetyl as a Protecting Group for HYNIC: Stability in the Presence of Electrophiles and Application in the Synthesis of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Radiolabelled Peptides. *Tetrahedron*. **2010**, 66 (11), 2037–2043.
- (186) Surfraz, M. B.-U.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. A Technetium Intermediate Specifically Promotes Deprotection of Trifluoroacetyl HYNIC during Radiolabelling under Mild Conditions. *Dalton Trans.* **2008**, No. 22, 2920–2922.
- (187) Świdarska, M.; Choromańska, B.; Dąbrowska, E.; Konarzewska-Duchnowska, E.; Choromańska, K.; Szczurko, G.; Myśliwiec, P.; Dadan, J.; Ładny, J. R.; Zwierz, K. The Diagnostics of Colorectal Cancer. *Wspolczesna Onkol.* **2014**, 18 (1), 1–6.
- (188) Ponnusamy, M. P.; Venkatraman, G.; Singh, A. P.; Chauhan, S. C.; Johansson, S. L.; Jain, M.; Smith, L.; Davis, J. S.; Remmenga, S. W.; Batra, S. K. Expression of TAG-72 in Ovarian Cancer and Its Correlation with Tumor Stage and Patient

- Prognosis. *Cancer Lett.* **2007**, *251* (2), 247–257.
- (189) Row, R. D.; Prescher, J. A. Tetrazine Marks the Spot. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (8), 493–494.
- (190) Decristoforo, C.; Faintuch-Linkowski, B.; Rey, A.; von Guggenberg, E.; Rupprich, M.; Hernandez-Gonzales, I.; Rodrigo, T.; Haubner, R. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for Imaging Integrin $\alpha\beta 3$ Expression. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33* (8), 945–952.
- (191) Zeglis, B. M.; Brand, C.; Abdel-Atti, D.; Carnazza, K. E.; Cook, B. E.; Carlin, S.; Reiner, T.; Lewis, J. S. Optimization of a Pretargeted Strategy for the PET Imaging of Colorectal Carcinoma via the Modulation of Radioligand Pharmacokinetics. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (10), 3575–3587.
- (192) Roviello, G.; Bachelot, T.; Hudis, C. A.; Curigliano, G.; Reynolds, A. R.; Petrioli, R.; Generali, D. The Role of Bevacizumab in Solid Tumours: A Literature Based Meta-Analysis of Randomised Trials. *Eur. J. Cancer* **2017**, *75*, 245–258.
- (193) Nagengast, W. B.; de Vries, E. G.; Hospers, G. a; Mulder, N. H.; de Jong, J. R.; Hollema, H.; Brouwers, A. H.; van Dongen, G. a; Perk, L. R.; Lub-de Hooge, M. N. *In Vivo* VEGF Imaging with Radiolabeled Bevacizumab in a Human Ovarian Tumor Xenograft. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (8), 1313–1319.
- (194) Camacho, X.; García, M. F.; Calzada, V.; Fernández, M.; Alonso, O.; Gambini, J. P.; Barbosa de Aguiar, R.; Longo Machado, C. M.; Chammas, R.; Porcal, W.; Cabral, P. ^{99m}Tc-Labeled Bevacizumab via HYNIC for Imaging of Melanoma. *J. Anal. Oncol.* **2014**, *3* (1), 53–54.
- (195) Park, J. E.; Keller, G. A.; Ferrara, N. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms: Differential Deposition into the Subepithelial Extracellular Matrix and Bioactivity of Extracellular Matrix-Bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4* (12), 1317–1326.
- (196) Flipo, M.; Florent, I.; Grellier, P.; Sergheraert, C.; Deprez-Poulain, R. Design, Synthesis and Antimalarial Activity of Novel, Quinoline-Based, Zinc Metallo-Aminopeptidase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (16), 2659–2662.
- (197) Conejo-Garcia, A.; Schofield, C. J. A Prodrug System for Hydroxylamines Based

- on Esterase Catalysis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (18), 4004–4009.
- (198) Apfel, C.; Banner, D. W.; Bur, D.; Dietz, M.; Hirata, T.; Hubschwerlen, C.; Locher, H.; Page, M. G.; Pirson, W.; Rossé, G.; Specklin, J. L. Hydroxamic Acid Derivatives as Potent Peptide Deformylase Inhibitors and Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (12), 2324–2331.
- (199) Pinto, L. F. V.; Glória, P. M. C.; Gomes, M. J. S.; Rzepa, H. S.; Prabhakar, S.; Lobo, A. M. A Dramatic Effect of Double Bond Configuration in N-Oxy-3-Aza Cope Rearrangements—a Simple Synthesis of Functionalised Allenes. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (26), 3446–3449.
- (200) Duan, J. J. W.; Lu, Z.; Xue, C. B.; He, X.; Seng, J. L.; Roderick, J. J.; Wasserman, Z. R.; Liu, R. Q.; Covington, M. B.; Magolda, R. L.; Newton, R. C.; Trzaskos, J. M.; Decicco, C. P. Discovery of N-Hydroxy-2-(2-Oxo-3-Pyrrolidinyl)acetamides as Potent and Selective Inhibitors of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (12), 2035–2040.
- (201) Wróblewski, A. E.; Hałajewska-Wosik, A. A Novel Synthesis of Diethyl (R)-3-(N-Benzyloxyamino)-2-Hydroxypropylphosphonate, a Precursor to Hydroxylamine Antibiotics FR-33289 and FR-33699. *Tetrahedron Asymmetry.* **2004**, *15* (20), 3201–3205.
- (202) Ishikawa, T.; Kawakami, M.; Fukui, M.; Yamashita, A.; Urano, J.; Saito, S. Novel [2,3]-Sigmatropic Rearrangement for Carbon–Nitrogen Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (31), 7734–7735.
- (203) Texeira, V. Desarrollo Y Evaluación de Nuevos ^{99m}Tc -Análogos de La Hormona Alfa Melanocito Estimulante Como Agentes de Imagenología Molecular En Melanoma, Universidad de la República-Pedeciba Química, 2016.
- (204) Herzog, K. M.; Deutsch, E.; Deutsch, K.; Silberstein, E. B.; Sarangarajan, R.; Cacini, W. Synthesis and Renal Excretion of Technetium 99m -Labeled Organic Cations. *J. Nucl. Med.* **1992**, *33* (12), 2190–2195.
- (205) Tsao, N.; Chanda, M.; Yu, D.-F.; Kurihara, H.; Zhang, Y.-H.; Mendez, R.; David, J. Y. ^{99m}Tc -N4amG: Synthesis Biodistribution and Imaging in Breast Tumor-Bearing Rodents. *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *72*, 105–113.

- (206) Ardestani, M. S.; Arabzadeh, A. J.; Heidari, Z.; Hosseinzadeh, A.; Ebrahimi, H.; Hashemi, E.; Mosayebnia, M.; Shafiee-Alavidjeh, M.; Alavi, A.; Babaei, M. H.; Rahmim, A.; Ebrahimi, S. E. S.; Amanlou, M. Novel and Facile Methods for the Synthesis of DTPA-Mono-Amide: A New Completely Revised Strategy in Radiopharmaceutical Chemistry. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2010**, 283 (2), 447–455.
- (207) Weininger, S. J.; Thornton, E. R. Probable Formation of Cyclobutadiene-Type Cations in the Mass-Spectral Decomposition of Pyridazines and Tetrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (9), 2050–2054.
- (208) Yamaguchi, R.; Yano, H.; Iemura, A.; Ogasawara, S.; Haramaki, M.; Kojiro, M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* **1998**, 28 (1), 68–77.
- (209) Witmer, A. N.; Dai, J.; Weich, H. A.; Vrensen, G. F. J. M.; Schlingemann, R. O. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1, 2, and 3 in Quiescent Endothelia. *J. Histochem. Cytochem.* **2002**, 50 (6), 767–777.
- (210) Meyer, J. P.; Kozlowski, P.; Jackson, J.; Cunanan, K. M.; Adumeau, P.; Dilling, T. R.; Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. Exploring Structural Parameters for Pretargeting Radioligand Optimization. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (19), 8201–8217.
- (211) Houghton, J. L.; Zeglis, B. M.; Abdel-Atti, D.; Sawada, R.; Scholz, W. W.; Lewis, J. S. Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57 (3), 453–459.
- (212) Läppchen, T.; Rossin, R.; van Mourik, T. R.; Gruntz, G.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Janssen, H. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. DOTA-Tetrazine Probes with Modified Linkers for Tumor Pretargeting. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, 55, 19–26.
- (213) Janzer, M.; Larbig, G.; Kübelbeck, A.; Wischnjow, A.; Haberkorn, U.; Mier, W. Drug Conjugation Affects Pharmacokinetics and Specificity of Kidney-Targeted Peptide Carriers. *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27 (10), 2441–2449.
- (214) Quinn, T.; Zhang, X.; Miao, Y. Targeted Melanoma Imaging and Therapy with Radiolabeled Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide Analogues. *G. Ital.*

Dermatol. Venereol. **2010**, *145* (2), 245–258.

- (215) Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; Abraham, J. A. The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. Multiple Protein Forms Are Encoded through Alternative Exon Splicing. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (18), 11947–11954.
- (216) Houck, K. A.; Leung, D. W.; Rowland, A. M.; Winer, J.; Ferrara, N. Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (36), 26031–26037.
- (217) Stollman, T. H.; Scheer, M. G. W.; Franssen, G. M.; Verrijp, K. N.; Oyen, W. J. G.; Ruers, T. J. M.; Leenders, W. P. J.; Boerman, O. C. Tumor Accumulation of Radiolabeled Bevacizumab due to Targeting of Cell- and Matrix-Associated VEGF-A Isoforms. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (2), 195–200.
- (218) Pace, L.; Nicolai, E.; D'Amico, D.; Ibello, F.; Della Morte, A. M.; Salvatore, B.; Micol Pizzuti, L.; Salvatore, M.; Soricelli, A. Determinants of Physiologic ¹⁸F-FDG Uptake in Brown Adipose Tissue in Sequential PET/CT Examinations. *Mol. Imaging Biol.* **2011**, *13* (5), 1029–1035.