

Radiomarcage de proteínas y nanosistemas proteicos con  
radiometales (tecnecio-99m, galio-67) para estudios de  
biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

Marta Yábar Galdeano

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

**Tutor académico:** Lluís Masip Vernis, Doctor Ingeniero Químico, Departamento  
Ingeniería Química, lluis.masip@urv.cat

**En cooperación con:** Clínica Universidad de Navarra

**Supervisor:** Iván Peñuelas Sánchez, Radiofarmacéutico, Profesor de Investigación  
Avanzada, Responsable de la Unidad de Radiofarmacia y Laboratorio PET-GMP y  
Director de la Unidad de Imagen Molecular Traslacional. ipenuelas@unav.es

Junio 2021



Yo, Marta Yábar Galdeano, con DNI, 73465664-F, soy concedora de la guía de prevención de plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: en estudiantes (aprobada en julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 07 de junio de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MY' or similar initials, written over a horizontal line.



## ENTIDAD COLABORADORA

He desarrollado este Trabajo de Final de Grado durante mi estancia en prácticas externas en la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona), uno de los 50 mejores hospitales del mundo según la revista Newsweek y el mejor hospital privado de España por séptima vez consecutiva según el Monitor de Reputación Sanitaria MRS 2020. En concreto, en el Servicio de Medicina Nuclear en la Unidad de Radiofarmacia y la Unidad Imagen Molecular Traslacional bajo la supervisión del Dr. Iván Peñuelas, Profesor de Investigación avanzada, Profesor titular de Farmacia y Tecnología farmacéutica, Director de la Unidad de Radiofarmacia y la Unidad de Imagen Molecular Traslacional.

La principal actividad investigadora que desarrolla el grupo de investigación de Radiofarmacia, Radionanofarmacología e Imagen Molecular Traslacional (RADIOMIN), dirigido por el Dr. Iván Peñuelas se centra en:

- Estudios de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular PET/CT y SPECT/CT de compuestos radiomarcados en modelos animales, a partir de los cuales se obtiene información metabólica y funcional.
- Desarrollo de nuevos radiofármacos PET.



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento al Dr. Iván Peñuelas, por brindarme esta oportunidad, por los consejos y el tiempo dedicado. Como bien dices, acabé en estas prácticas como en paracaídas, pero no puedo estar más contenta de haber aterrizado aquí.

Gracias también a Jon Ander, por la paciencia, la confianza y la entrega diaria. Aunque te sobre con dos segundos para hacer los cálculos, y yo necesite: cinco minutos, papel y boli; formamos un gran equipo. Admiro tu forma de trabajar y tu pasión por la química, te mereces todo lo bueno que te pase.

Agradecer a todo el personal del Servicio de Medicina Nuclear de la Clínica Universidad de Navarra la acogida, el ambiente de trabajo y la ayuda durante estos meses.

A Tarragona, lugares que marcan y huelen a felicidad, donde he vivido cuatro años inolvidables y he conocido a personas que me han hecho sentir en casa. Gracias a 'Piso al cubo', porque soy incapaz de recordar cuantas veces he tenido la sensación, de estar viviendo con vosotros, un momento al que voy a querer volver siempre. Gracias también a mis 'menorquines', porque mal de muchos, consuelo de tontos (pero consuelo, al fin y al cabo). A Lar, por haber sido mi mano derecha (y la izquierda si era necesario). A Laura y Miguel, por no haber dejado de ayudarme nunca y acabar convirtiéndose en personas indispensables.

A mi cuadrilla, ver cómo pasa el tiempo y nosotras nos quedamos, gracias por acompañarme en una etapa más de mi vida. Por las cenas de los viernes, tan necesarias para desconectar y recargar pilas.

Y como se suele decir, lo mejor para el final. Mi más sincero agradecimiento a mi familia, por la confianza, el apoyo incondicional y los valores que me han inculcado.



## Tabla de contenido

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	4
1. Introducción .....	6
1.1 Información general sobre las biomoléculas a marcar en este trabajo.....	7
1.2 Radioquímica del Tecnecio-99 metaestable .....	11
1.3 Radioquímica del galio .....	13
1.4 Técnicas de imagen molecular .....	15
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	18
3. Materiales y metodología experimental.....	20
3.1 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de micropartículas de caseína y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT .....	20
3.2 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de endolisina modificada y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT .....	23
3.3 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ y $^{67}\text{Ga}$ del anticuerpo bevacizumab y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT.....	26
4. Resultados y discusión .....	32
4.1 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de micropartículas de caseína y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT .....	32
4.2 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de endolisina y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT.....	34
4.3 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ y $^{67}\text{Ga}$ del anticuerpo bevacizumab y estudio de su biodistribución <i>in vivo</i> mediante imagen molecular SPECT/CT.....	36
5. Conclusiones.....	42
6. Bibliografía .....	46
7. Autoevaluación.....	48
8. Anexos .....	49



## Abreviaturas

**Rf:** Factor de retención

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

**PMT:** Fotomultiplicadores

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial

**MEK:** Metiletilcetona

**Ácido gentísico:** Ácido 2-5 hidroxibenzoico

**Radio-TLC:** Radiocromatografía en capa fina

**iTLC-SG:** del inglés, *instant Thin Layer Chromatography with silica gel*

**iTLC-SA:** del inglés, *instant Thin Layer Chromatography with silicic acid*

**MBq:** Megabecquerel

**NSCLC:** del inglés, *Non-squamous non-small cell lung cancer*

**MRI:** Imagen por Resonancia Magnética

**CT:** Tomografía computarizada

**SPECT:** Tomografía por emisión de fotón único

**PET:** Tomografía por emisión de positrones

**BFCA:** Quelante bifuncional

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

**NOTA:** Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético

**DTPA:** Ácido  $N^{\alpha}$ -dietilentriaminopentaácetico

**DFO:** Desferroxiamina

**p-NCS-benzyl-NODA-GA:** Ácido 2,2' - (7- (1-carboxi-4 - ((4-isotiocianatobencil) amino) -4-oxobutil) -1,4,7-triazonan-1,4-diil) diacético



## Resumen

En este Trabajo de Final de Grado se han llevado a cabo 3 estudios de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT.

El primer estudio, tiene como principal objetivo estudiar la biodistribución de un tipo de micropartículas de caseína modificadas. Para ello, se optimizó el marcaje directo de las micropartículas con el radiometal  $^{99m}\text{Tc}$ . Se obtuvieron imágenes SPECT/CT de las micropartículas en una rata *Wistar* hembra sana. Los resultados mostraron, que la mayor parte de las micropartículas de caseína permanecen inalteradas en el estómago al concluir las 8 horas del estudio y solo una pequeña parte de las mismas han podido liberar su contenido en intestino delgado. El estudio aporta información sobre el uso de microsistemas y nanosistemas como vehículo de principios activos.

En el segundo estudio, se evaluó la biodistribución de un tipo de endolisina modificada. Para ello, las endolisinas se marcaron radiactivamente con carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Se obtuvieron imágenes SPECT/CT en ratones *Balb/c* sanos, y en ratones *Balb/c* a los que se les inoculó en la extremidad posterior derecha *Escherichia coli* activas, y en la extremidad posterior izquierda *Escherichia coli* inactivadas por calor. Los resultados mostraron que las endolisinas modificadas alcanzan y permanecen en el foco de infección causado por el *Escherichia coli*, siendo capaces de diferenciar entre el germen vivo, por el que tienen una mayor afinidad, y el mismo previamente inactivado por calor. En los ratones control, las endolisinas modificadas no alcanzan ni permanecen en las extremidades posteriores. El estudio aporta información significativa sobre el uso de endolisinas en la lucha contra las bacterias multirresistentes.

En el tercer estudio, se evaluó la biodistribución de dos formulaciones diferentes de bevacizumab radiomarcado. En la primera formulación, el bevacizumab se marcó radiactivamente con  $^{99m}\text{Tc}$ , y en el segundo caso con  $^{67}\text{Ga}$ . Posteriormente, se administraron ambas formulaciones simultáneamente en un mismo animal. Para ello, se optimizaron las condiciones de marcaje con  $^{67}\text{Ga}$ , utilizando el quelante bifuncional p-NCS-benzyl-NODA-GA. El marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$  se llevó a cabo con carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Los anticuerpos radiomarcados se administraron por vía intravenosa a ratones C57. Se obtuvieron imágenes SPECT/CT que mostraron que la biodistribución del bevacizumab no se vio modificada por el tipo de radiomarcaje. Este estudio abre la puerta al uso de marcajes mixtos.

---

Palabras clave: Biodistribución, radiomarcaje, tecnecio-99m, galio-67, micropartículas de caseína, endolisina, bevacizumab.

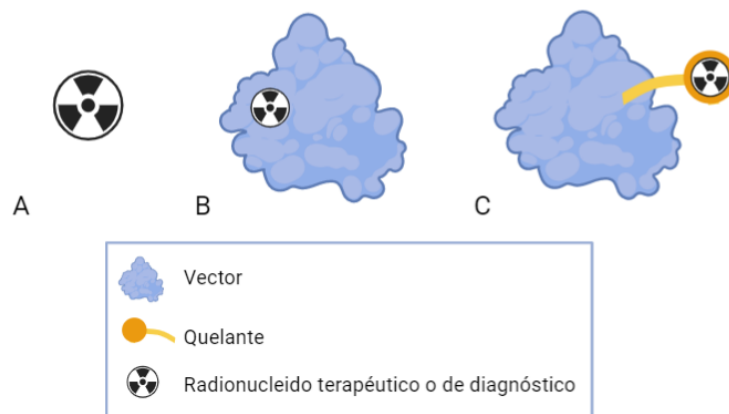


## 1. Introducción

La radiofarmacia es una especialidad sanitaria multidisciplinar que diseña, produce y dispensa medicamentos que contienen un elemento radiactivo (radiofármacos), utilizados en Medicina Nuclear, de forma segura y mínimamente invasiva (1).

Un radiofármaco es cualquier producto, que contenga uno o más radionucleidos, preparado con una finalidad terapéutica o diagnóstica. Los radiofármacos pueden estar formados únicamente por un isótopo radiactivo (también denominado radionucleido) (*Figura 1A*); o bien por un isótopo radiactivo unido a un vector directamente (*Figura 1B*) o utilizando un Quelante que estabilice la unión (*Figura 1C*) (2).

Al proceso por el cual se lleva a cabo la unión de un radionucleido a un vector se denomina radiomarcaje.



*Figura 1. A Radiofármaco conformado únicamente por un radionucleido B Radiofármaco formado por un radionucleido unido directamente a un vector C Radiofármaco formado por un radionucleido unido a un vector a través de un quelante*

Generalmente, en el diseño de un radiofármaco formado por un vector marcado, el primer paso es la elección de la biomolécula que actuará como vector.

Ejemplos de biomoléculas según sus características fisicoquímicas.:

- Un anticuerpo que reconozca específicamente un epítipo haciendo que el fármaco tenga una distribución diferencial en el organismo hasta su diana.
- Una enzima que lleve a cabo una función fisiológica concreta en el organismo.

Una vez escogida la biomolécula, se procede a la elección del radionucleido más adecuado para el marcaje. Para la elección del radionucleido se tienen en cuenta características como: el

periodo de semidesintegración, el tipo de emisión (rayos alfa, rayos gamma, positrones...), su obtención (generador, ciclotrón, reactor nuclear...), entre otras.

Los radionucleidos durante su decaimiento radiactivo emiten una energía electromagnética. Según el tipo de emisión del radionucleido con el que están marcados, los radiofármacos, se clasifican en:

i) Radiofármacos terapéuticos cuando están constituidos por radionucleidos emisores beta o alfa, producen daño biológico.

ii) Radiofármacos de diagnóstico, donde se aprovecha esta propiedad emisora de rayos gamma ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ) o de positrones ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ) para ser detectados por un equipo de imagen.

Los radiofármacos se administran en cantidades traza, no existe una relación dosis-respuesta y se prescriben, preparan y dosifican en función de la cantidad de radiactividad y no del ingrediente activo (3).

#### Radiofármacos de diagnóstico

Para llevar a cabo el estudio de biodistribución *in vivo* de una biomolécula marcada radiactivamente se obtienen imágenes a diferentes tiempos. Los tiempos a los que se obtienen las imágenes dependen de las características del estudio (características fisicoquímicas de la biomolécula, radionucleido, vía de administración, diana, información que se quiere obtener...). Una vez obtenidas, estas imágenes son reconstruidas aplicando correcciones de atenuación y dispersión, para de ellas obtener información anatómica y funcional. La biodistribución vendrá determinada por las características propias del radiofármaco que harán que éste quede retenido o no en determinadas zonas del organismo durante un tiempo determinado.

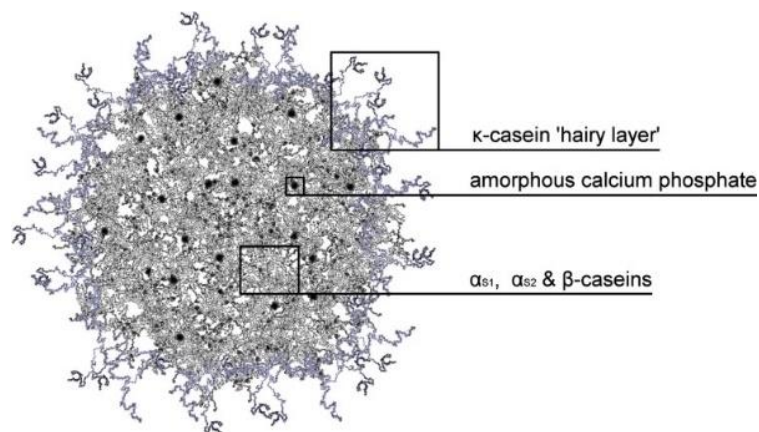
#### 1.1 Información general sobre las biomoléculas a marcar en este trabajo

Existe una amplia variedad de moléculas que pueden actuar como vector: moléculas orgánicas, inorgánicas, péptidos, enzimas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o nanosistemas, entre otros. Las moléculas que actúan como vector, pueden tener afinidad por diversos tipos de dianas que condicionarán su biodistribución como: antígenos, receptores o factores de crecimiento, por ejemplo (2).

A continuación, se describen de forma general las biomoléculas con las que se ha trabajado:

## Micropartículas de caseína

El término caseína hace referencia a una familia de fosfoproteínas que se encuentran presentes en la leche. La caseína de la leche bovina está formada por cuatro péptidos:  $\alpha$  s1,  $\alpha$  s2,  $\beta$ ,  $K$ , y se encuentra asociada al calcio (fosfato de calcio). Estos péptidos debido a sus propiedades fisicoquímicas crean agregados estables conocidos como micelas de caseínas cuya estructura no está definida. Hasta ahora, el modelo de *Holt* (*Figura 2*) es uno de los más aceptados donde los péptidos  $\alpha$  s1,  $\alpha$  s2 y  $\beta$ , se acumulan en la parte interna junto con el fosfato de calcio secuestrado. En la capa externa, se encuentra el péptido  $K$  por tener propiedades hidrofílicas que estabilizan la micela. Según su tamaño, las partículas de caseína se clasifican en: micropartículas, si su tamaño es de 1-100  $\mu$ metros, y nanopartículas, si su tamaño es de 1-100nm.

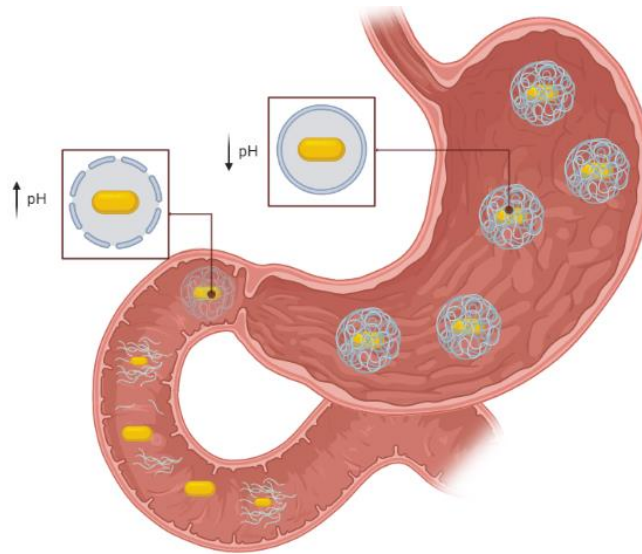


*Figura 2. Imagen extraída del artículo de Glqb et al. 2017 donde se muestra la representación de la estructura de una micela de caseína según el modelo propuesto por Holt (4)*

Las micropartículas de caseína presentan unas características que las convierten en grandes 'candidatas' para la encapsulación y liberación de diferentes productos farmacéuticos y alimentarios. Su punto isoeléctrico promedio es de 4,6. El cambio de conformación en función del pH permite, que cuando estas micelas se encuentran en estómago, con un pH ácido disminuyan su carga, se compacten y protejan al compuesto que viaja en su interior. Una vez el complejo accede al duodeno, donde el pH es neutro, se desestructura la micela facilitando la liberación de la sustancia contenida. Este despliegue estructural permite a su vez el acceso y la acción de las enzimas proteolíticas digestivas contribuyendo a liberación del compuesto vehiculado (*Figura 3*).

Además, gracias a su función dietética, la caseína es una sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura), biocompatible, biodegradable y reabsorbible (4).

Con esto se consigue una liberación controlada en el momento y lugar deseado para una función óptima del compuesto vehiculado que llega protegido hasta la diana de interés.



*Figura 3. Esquema de unas micropartículas de caseína que al llegar al estómago donde el pH es ácido disminuye su carga y se compactan. Una vez las micropartículas acceden al duodeno, donde el pH es neutro, se desestructuran facilitando la liberación de la sustancia contenida*

### Endolisina

El peligroso aumento de bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales ha motivado a investigadores de todo el planeta para buscar nuevas alternativas que contribuya a la solución del problema. Una de estas alternativas es el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos basados en proteínas víricas que, de forma natural, son producidas por bacteriófagos.

En el proceso de lisis de bacterias Gram negativas para la mayoría de los bacteriófagos implica tres etapas representadas en la *Figura 4*:

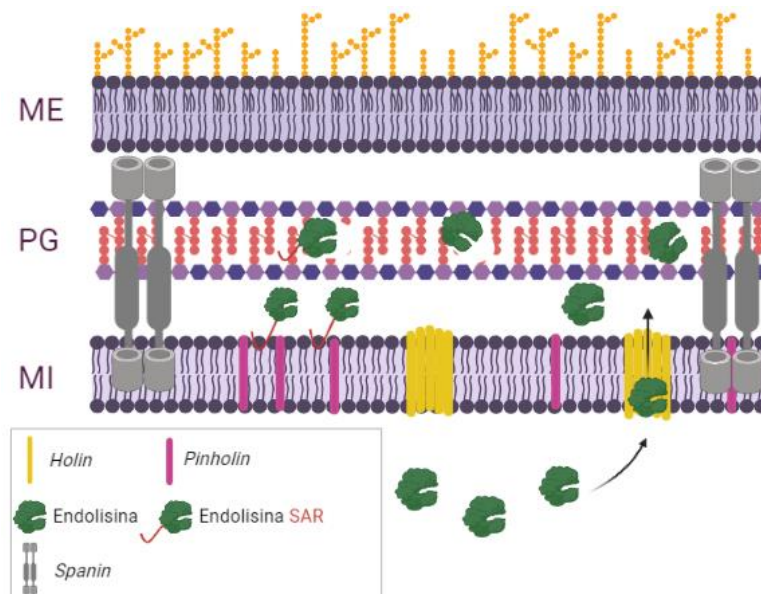
i) Acumulación de proteínas líticas y destrucción de membrana plasmática: están implicadas dos subclases de proteínas víricas tipo holinas: holinas canónicas y pinholinas.

Las holinas canónicas, son proteínas transmembrana que se autoensamblan formando grandes poros en la membrana interna, a través de los cuales, las endolisinas canónicas acceden al peptidoglicano y lo degradan.

Las pinholinas son otras proteínas transmembrana que forman un gran número de canales de menor tamaño provocando la despolarización de la membrana interna permitiendo la acción de las endolisinas SAR.

ii) Degradación del peptidoglicano: está mediada por endolisinas. Las endolisinas son enzimas víricas con capacidad de lisar el peptidoglicano. Aquellas endolisinas que carecen de una secuencia señal se conocen como endolisinas canónicas, se acumulan en el citoplasma y son liberadas a través de los grandes poros creados por las proteínas holinas canónicas. Por otro lado, están aquellas endolisinas que presentan una secuencia señal de anclaje, que reciben el nombre de endolisinas SAR. Las endolisinas SAR se encuentran unidas a la membrana interna por el lado periplásmico y su liberación se produce como consecuencia de la despolarización de la membrana provocada por las pinholinas.

iii) Fusión membrana externa e interna: se trata de una etapa exclusiva en la lisis de bacterias Gram negativas, donde un tercer tipo de proteínas, las spaninas, provocan un cambio conformacional en la envoltura que causa la fusión de la membrana interna y la membrana externa y finalmente la lisis bacteriana (5).



*Figura 4. Proceso de lisis de bacterias Gram negativas por bacteriófagos siendo ME: Membrana externa, PG: Peptidoglicano y MI: Membrana interna. No se muestra la ultima etapa, donde las spaninas, representadas en color gri, provocan un cambio conformacional en la envoltura que causa la fusión de la membrana interna y la membrana externa y finalmente la lisis bacteriana*

Las endolisinas, a diferencia de las holinas canónicas y pinholinas, son capaces de lisar las bacterias por sí solas. Esta capacidad ha hecho que las endolisinas cobren un gran protagonismo como posibles agentes antibióticos. La producción recombinante de estas proteínas químicas se consigue, generalmente, en *Escherichia coli* (6).

## Bevacizumab

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (93 % humano y 7 % murino) que se une al factor de crecimiento del endotelio A (VEGF-A), bloqueando la unión de los receptores VEGFR-1 (fit-1) y VEGFR-2 (KDR/flk-1) en la superficie de las células endoteliales. El bloqueo de esta unión evita la activación de vías de supervivencia, la proliferación de las células epiteliales y la angiogénesis. Su aplicación está aprobada por la FDA para el tratamiento de cáncer cervical, cáncer colorrectal metastásico, Glioblastoma, NSCLC, cáncer de ovario y cáncer renal metastásico (7) (Figura 5).

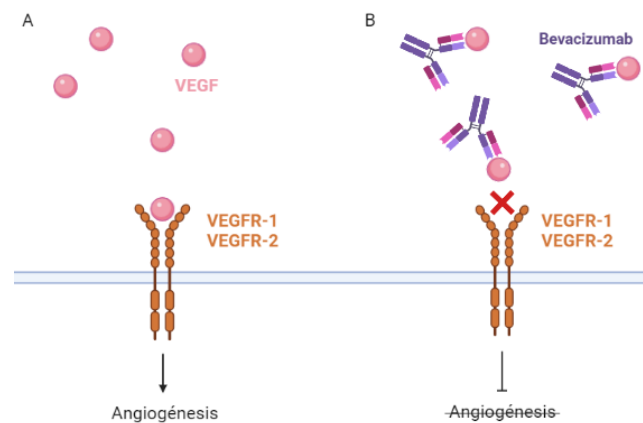


Figura 5. **A** Unión del factor de crecimiento del endotelio A (VEGF-A) a los receptores VEGFR-1 (fit-1) y VEGFR-2 (KDR/flk-1) en la superficie de una célula endotelial **B** Bevacizumab bloquea la unión del VEGF-A a los receptores evitando la activación de vías de supervivencia, la proliferación de las células epiteliales y la angiogénesis

## 1.2 Radioquímica del Tecnecio-99 metaestable

El  $^{99m}\text{Tc}$  es un radionucleido emisor de rayos gamma monoenergético (140 keV) con amplias aplicaciones de diagnóstico en Medicina Nuclear. El uso de este radionucleido se debe a las siguientes características:

- i) Su corto periodo de semidesintegración (6 h) que permite el estudio de moléculas con una semivida corta.
  - ii) Su fácil disponibilidad gracias a su producción mediante generadores  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ .
  - iii) El desarrollo de 'kits fríos' liofilizados, estériles y apirógenos que permiten la preparación extemporánea del radiofármaco.
  - iv) Presenta varios estados de oxidación que facilitan su incorporación a distintas moléculas que posean grupos químicos que actúan como donadores de electrones (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH...)
- (8).

## Generador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se obtiene a partir de un generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Un generador, es un dispositivo que contiene en su interior un radionucleido inicial, denominado radionucleido padre, cuya desintegración radiactiva origina el radionucleido hijo (radionucleido de interés) ambos presentan propiedades fisicoquímicas diferentes que permiten su separación. El periodo de semidesintegración ( $T_{1/2}$ ) del radionucleido padre debe ser lo suficientemente largo para rentabilizar su uso. En el generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  el radionucleido padre es el Molibdeno-99 que tiene un tiempo de semidesintegración largo, de 66h. El  $^{99}\text{Mo}$  se desintegra dando lugar al  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en forma de ion pertecnetato (Figura 6B). El generador se eluye (Figura 6A) con una solución de NaCl 0,9 % que atraviesa la columna de Alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) donde se encuentra fuertemente unido el molibdeno-99 y del que es arrancando el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en forma de pertecnetato de sodio ( $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ ) (8).

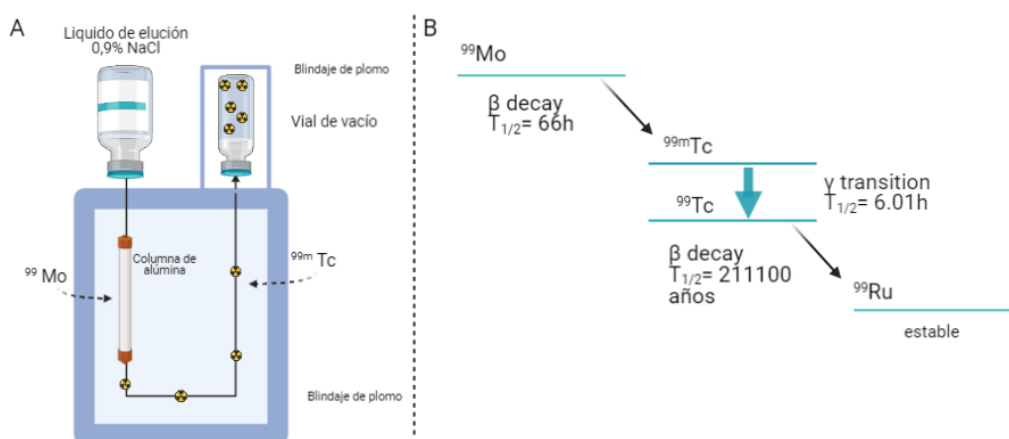


Figura 6. A Generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  B Decaimiento del Mo a un estado metaestable del Tc

## Reducción del pertecnetato de sodio ( $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ )

El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  presenta 8 estados de oxidación, siendo el V, IV, III y I los más estables y utilizados. El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  obtenido del generador en forma de pertecnetato de sodio se encuentra en el mayor estado de oxidación del tecnecio-99-metaestable (VII), especie muy poco reactiva que no se une a ningún compuesto de forma directa por lo que es necesaria su reducción. La reducción del ion pertecnetato se lleva a cabo mediante la adición de un agente reductor. Los más utilizados son las sales de estaño ya que son solubles en agua, estables y poco tóxicas; destacando el cloruro de estaño dihidratado ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Figura 7).

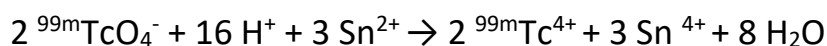


Figura 7. Reducción del ion pertecnetato de tecnecio utilizando  $\text{Sn}_2\text{Cl}$  como agente reductor en medio ácido

La reacción de reducción debe ser óptima para conseguir el máximo rendimiento del marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$ , para ello es necesario reducir al mínimo la cantidad de tecnecio libre, así como la formación de óxidos/hidróxidos de tecnecio, producto indeseado por su tamaño similar al radiofármaco a estudiar. Para conseguir minimizar la presencia de estas especies indeseadas se deben tener en cuenta una serie de factores, como son: la relación estequiométrica entre agente el agente reductor y el radionucleido, la presencia de oxígeno, el pH del medio de reacción, la presencia de quelantes, la naturaleza química del agente reductor, o la adición de agentes antioxidantes (3).

El  $^{99m}\text{Tc}$  reducido ya es una especie reactiva y puede, adicionarse directamente a un compuesto, o combinarse con agentes quelantes que estabilicen la unión al vector. En función del estado de oxidación en el que se encuentre puede formar diferentes complejos de Tecnecio.

Otro agente reductor comúnmente utilizado es el borohidruro de sodio  $[\text{NaBH}_4]$ , se trata de un agente reductor más fuerte que el cloruro de estaño dihidratado. La reducción del tecnecio al estado de oxidación I mediante la adición de boranocarbonato de sodio  $[\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2]$  permite la formación de los carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  (I) (Figura 8) (8). Este precursor  $[\text{^{99m}Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  está formado por tres monóxidos de carbono (CO) y otros 3 sitios de coordinación que en función del número de sustituciones de moléculas de agua se pueden unir uno, dos o tres ligandos. La gran afinidad que presentan estos sitios de coordinación por los grupos funcionales tiol (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>) y tioéster (R-S-CO-R'), grupos donadores de electrones que encontramos en aminoácidos como la cisteína, histidina o metionina, permite el marcaje de moléculas peptídicas (9).

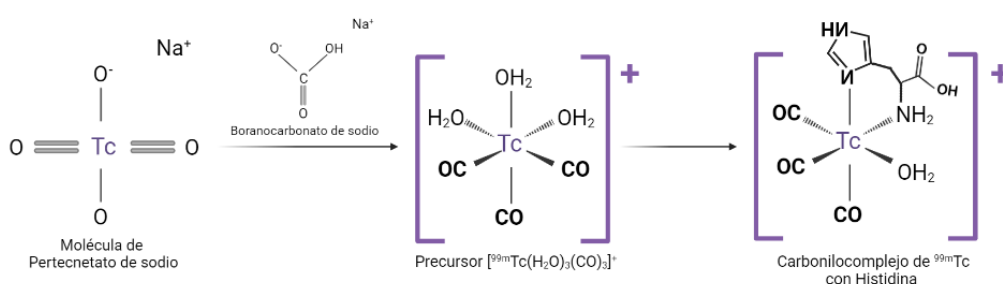


Figura 8. Esquema del radiomarcaje de una histidina mediante carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$

### 1.3 Radioquímica del galio

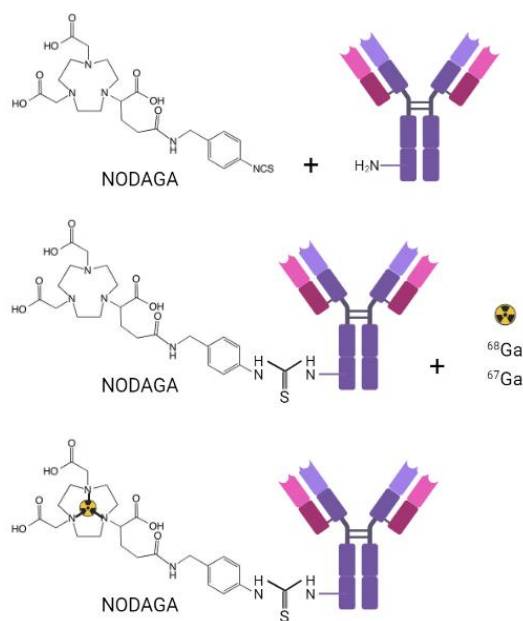
El galio es un metal empleado en Medicina Nuclear como radionucleido de diagnóstico. Dentro de los isótopos radiactivos de galio los más ampliamente utilizados son el  $^{67}\text{Ga}$ , y el  $^{68}\text{Ga}$ .

El  $^{67}\text{Ga}$  es un radioisótopo producido en un acelerador de partículas y disponible comercialmente como citrato de galio. El  $^{67}\text{Ga}$  decae por captura electrónica a Zinc estable ( $^{67}\text{Zn}$ ) con un tiempo de desintegración de 78,3 horas, emitiendo rayos gamma con una energía de 93 keV (38 %), 185 keV (21 %) y 300 keV (16,8 %) (10).

El  $^{68}\text{Ga}$  es un radionucleido producido en un generador  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , donde el germanio ( $^{68}\text{Ge}$ ) es el radionucleido padre ( $T_{1/2}=270,8\text{ d}$ ) que se desintegra en galio ( $^{68}\text{Ga}$ ). El  $^{68}\text{Ga}$  es un radioisótopo emisor de positrones con una energía de 352,6 keV y 836,0 keV que decae a Zinc estable ( $^{67}\text{Zn}$ ) con un tiempo de desintegración corto de 67,7 minutos, tiempo adecuado para la realización de estudios *in vivo* y para su comercialización a centros cercanos (11).

### Marcaje con galio mediante Quelantes Bifuncionales

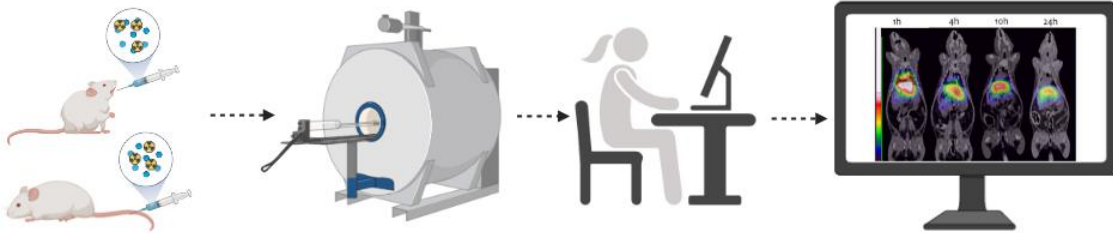
Para el marcaje de una biomolécula con un radioisótopo de galio es necesario emplear un quelante bifuncional (BFCA) que sirva de *linker* entre la biomolécula y el radioisótopo que garantice la estabilidad *in vivo* del marcaje. Estos quelantes según su estructura química se clasifican en: i) Quelantes macrocíclicos como el DOTA: ácido 1, 4, 7, 10 tetraazaciclododecano-N, N', N'', N''' – tetraacético, NOTA: ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético y el p-NCS-benzyl-NODA-GA: 2,2'-(7-(1-carboxy-4-((4-isothiocyanatobenzyl) amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl) diacetic acid; ii) Quelantes no-macroscíclicos como el DTPA: ácido  $N^{\alpha}$ -dietilentriaminopentaacético y el DFO: desferroxiamina. El quelante bifuncional p-NCS-benzyl-NODA-GA es uno de los más importantes representado en la *Figura 9* (12).



*Figura 9. Ejemplo de radiomarcaje de una biomolécula con galio utilizando el quelante bifuncional NODAGA*

## 1.4 Técnicas de imagen molecular

En la última década, la utilización de dispositivos de imágenes preclínicas para pequeños animales está siendo clave para el desarrollo de fármacos en diferentes áreas de investigación, destacando la oncología, la neurología y la cardiología. La obtención de imágenes *in vivo* de forma no invasiva permite, mediante el estudio de la biodistribución de fármacos la selección de aquellos candidatos más prometedores (*Figura 10*).



*Figura 10. Esquema del proceso para llevar a cabo un estudio de biodistribución in vivo de una biomolécula radiomarcada desde la administración del radiofármaco, hasta la adquisición de las imágenes*

Dentro de estos dispositivos de imagen preclínica, empleados para el diagnóstico por imagen, podemos diferenciar entre los métodos convencionales y las técnicas de imagen molecular, utilizadas en Medicina Nuclear.

En el diagnóstico por imagen convencional, para producir las imágenes se utiliza una fuente de radiación electromagnética externa, ya sea: rayos X (RX), campos magnéticos (MR) o ultrasonidos (US).

Un ejemplo de éste es la Tomografía Computarizada (CT), que utiliza una fuente de rayos X y un conjunto de detectores enfrentados, que se hacen girar en torno al objeto para la adquisición de múltiples imágenes (*Figura 11A*). Posteriormente, las proyecciones son recogidas y procesadas por un ordenador que reconstruye las imágenes adquiridas en 3D. De la imagen tomográfica 3D se pueden hacer tres tipos de cortes: Sagital, Longitudinal y Transversal (*Figura 11B*). En el caso de la imagen CT, el algoritmo de reconstrucción más habitual es la retroproyección filtrada.

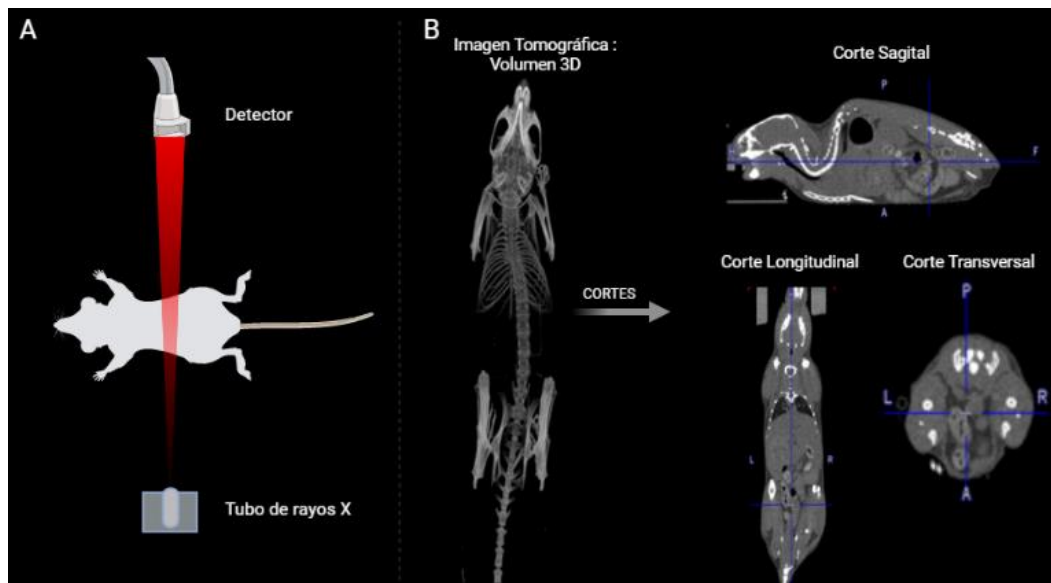


Figura 11. **A** Fundamento equipo CT **B** Imagen Tomográfica en 3D y sus respectivos cortes sagital, longitudinal y transversal

Por otro lado, se encuentran las técnicas de imagen molecular en Medicina Nuclear que proporcionan información sobre la función del órgano y su actividad celular.

Un ejemplo es la Tomografía por emisión de fotones únicos SPECT, donde para la adquisición de estas imágenes se hacen girar unos detectores (o varias dependiendo del número de cabezales del equipo) alrededor del paciente/animal registrando imágenes planares en cada paso angular, denominadas proyecciones. Comúnmente, esta gamma cámara está formada por: un colimador, que define la dirección del rayo gamma; un cristal de centelleo, que convierte los rayos gamma de alta energía en fotones de luz de baja energía; un array de tubos fotomultiplicadores (PMT), que amplifica la señal luminosa para crear una señal eléctrica; y un ordenador, que recoge y procesa las señales (Figura 12).

En la adquisición de las imágenes se pueden modificar una serie de parámetros para ajustarla a las características del estudio: tamaño de la matriz, *Zoom*, número de proyecciones, tiempo de adquisición, modo 'step and shoot' o modo continuo, etc. Estas proyecciones son reconstruidas para la formación de las imágenes tomográficas a partir de técnicas como la retroproyección filtrada o la reconstrucción iterativa (13).

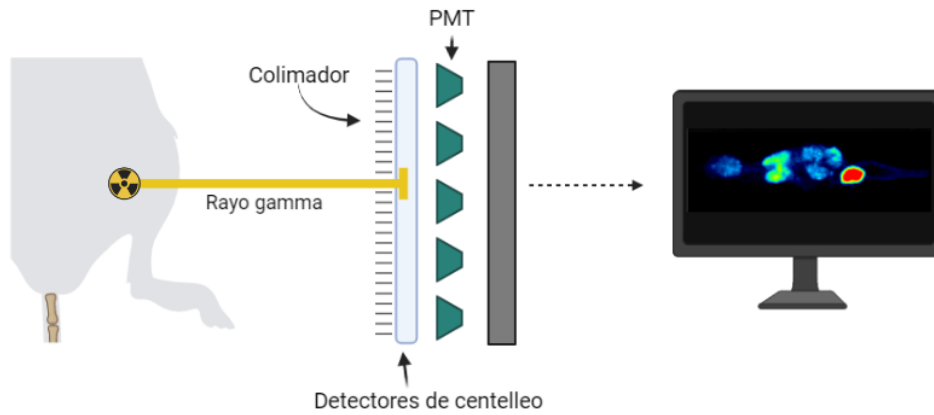


Figura 12. Fundamento del equipo de imagen molecular SPECT

Mientras que la imagen convencional aporta una información anatómica que nos permite localizar el órgano, tejido o zona; las técnicas de Medicina Nuclear proporcionan información funcional y bioquímica. Esta información resulta complementaria, y por ello, equipos híbridos como el SPECT/CT donde se combina la Tomografía por emisión de fotón único con la Tomografía Computarizada, permiten visualizar procesos moleculares con una alta sensibilidad y resolución espacial (Figura 13) (14).

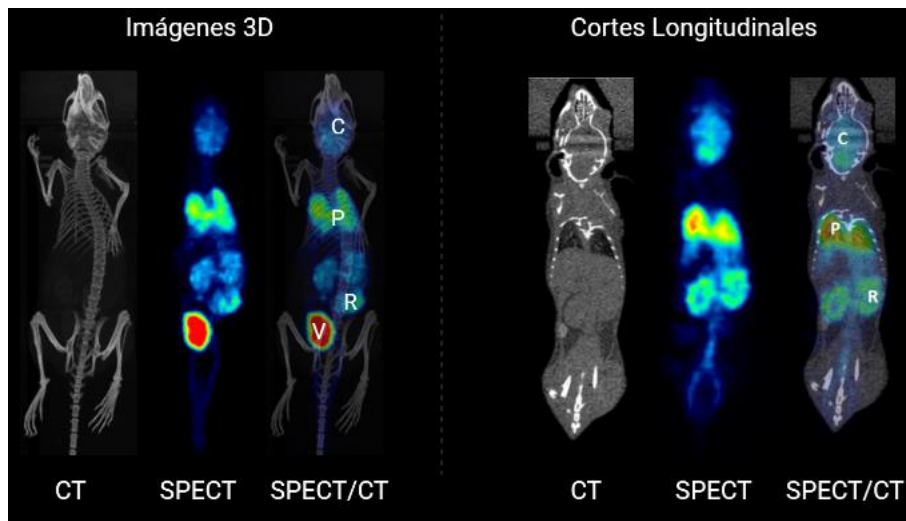


Figura 13. Imagen molecular de la biodistribución de un radiofármaco obtenida con SPECT, CT y SPECT/CT donde C: Cerebro; P: Pulmones; R: Riñones; I: Intestino; V: Vejiga

## 2. Hipótesis de trabajo y objetivos

En este contexto, se define el **objetivo general** del trabajo como el radiomarcaje de tres biomoléculas diferentes para llevar a cabo el estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT en pequeños animales.

Se trata de tres estudios independientes, en colaboración con diferentes grupos de investigación/empresas externas. Las biomoléculas utilizadas en estos estudios son: micropartículas de caseína, endolisina modificada y el anticuerpo monoclonal bevacizumab.

### Micropartículas de caseína

Las micropartículas de caseína han sido creadas por un grupo de investigación por su capacidad para encapsular compuestos. El grupo de investigación a partir de modificaciones en la estructura clásica de las micelas crea un tipo de micropartículas de caseína. El objetivo de este estudio es establecer la biodistribución de las micropartículas de caseína modificadas. Para ello, las micropartículas de caseína se marcan radiactivamente y se adquieren imágenes SPECT/CT a 1 h, 4 h y 8 h, tras la administración oral en una rata *Wistar*.

El estudio trata de corroborar la hipótesis de que estas micropartículas de caseína modificadas servirán como vehículo de fármacos u otras sustancias para su posterior liberación en la porción del tracto digestivo deseada.

Se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

- Desarrollo y optimización del marcaje directo con el radiometal  $^{99m}\text{Tc}$  de las micropartículas de caseína.
- Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las micropartículas de caseína en una rata *Wistar* adquiriendo imágenes a 1 h, 4 h y 8 h.

### Endolisina

La empresa colaboradora ha creado una endolisina modificada mediante ingeniería de proteínas como alternativa a los antibióticos convencionales por su efecto bactericida. El objetivo de este estudio es establecer la biodistribución de la endolisina modificada en su trayectoria desde la inoculación intravenosa hasta el foco de infección causado por una bacteria Gram negativa. Las endolisinas radiomarcadas se administraron vía intravenosa a ratones *Balb/c* hembras.

Se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

- Desarrollo del marcaje mediante carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  de las endolisinas modificadas.
- Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las endolisinas radiomarcadas desde su inoculación intravenosa hasta el foco de infección causado por *Escherichia coli*.
- Evaluar la capacidad para alcanzar y permanecer en el foco de infección siendo este causado por bacterias vivas o inactivadas.

#### Anticuerpo monoclonal Bevacizumab

En este estudio se evalúa la biodistribución de dos formulaciones diferentes del anticuerpo monoclonal bevacizumab radiomarcado (bevacizumab- $^{67}\text{Ga}$  y bevacizumab- $^{99m}\text{Tc}$ ). Para ello, es necesario desarrollar y optimizar el marcaje del bevacizumab con el radiometal  $^{67}\text{Ga}$  y desarrollar el radiomarcaje del anticuerpo utilizando un sistema tipo *kit de carbonilocomplejos* de  $^{99m}\text{Tc}$ . Con el objetivo de evaluar la biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT de las dos formulaciones (bevacizumab- $^{67}\text{Ga}$  y bevacizumab- $^{99m}\text{Tc}$ ); éstas se administran, tanto simultáneamente, como por separado, en ratones C57 por vía intravenosa.

Se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

- Desarrollo del marcaje del bevacizumab con  $^{99m}\text{Tc}$
- Desarrollo y optimización del marcaje del bevacizumab con  $^{67}\text{Ga}$
- Optimización del pH al que tiene lugar la reacción de marcaje con  $^{67}\text{Ga}$ .
- Optimización los controles de calidad y los procesos de purificación del radiofármaco con el fin de depurar las especies no funcionales en el marcaje con  $^{67}\text{Ga}$ .

### 3. Materiales y metodología experimental

#### 3.1 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de micropartículas de caseína y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

##### a) Optimización de la concentración del agente reductor y marcaje directo con $^{99m}\text{Tc}$

Se debe reducir al mínimo la cantidad de  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  libre, que puede formarse en presencia de poco agente reductor, así como la formación de especies coloidales de  $^{99m}\text{Tc}$  debida a un exceso del mismo.

Para ello, se prepararon diferentes diluciones del agente reductor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en agua ácida (49  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$  1M y 12 ml de agua) cuyo fin es regular el pH del medio para favorecer la reacción de reducción, consiguiéndose concentraciones de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 y 1,2 mg/ml.

De cada una de estas diluciones se añadieron 40  $\mu\text{l}$  a un vial de 0,3 ml de una suspensión de 11,5 mg/ml de micropartículas de caseína, se encapsularon y se agitaron en el vórtex durante 30 segundos.

En la siguiente fase se procedió a purgar de oxígeno los viales mediante la introducción de helio a 2,5 bares de presión evitando posibles fugas de gas al final del proceso (Figura 14).

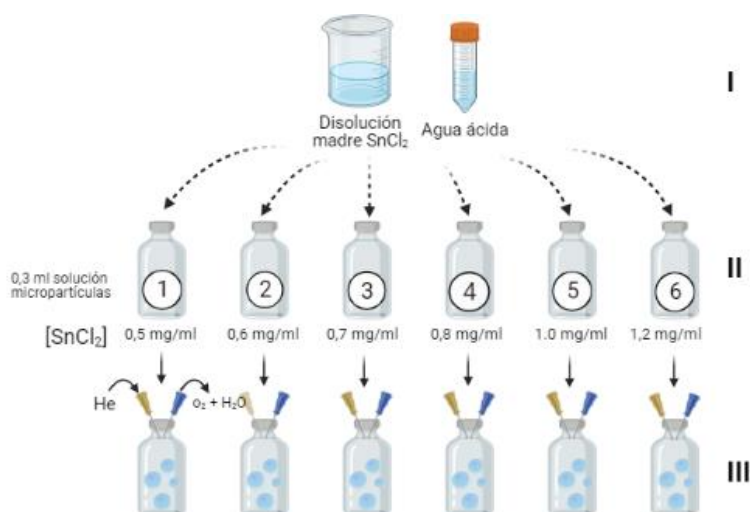


Figura 14. Esquema de los pasos llevados a cabo en el proceso de optimización de la concentración de cloruro de estaño dihidratado. Donde: I Preparación de las 6 concentraciones de cloruro de estaño dihidratado. II Mezcla de la solución de micropartículas con el agente reductor. III Purgado con helio

El  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  para el marcaje de las micropartículas se obtuvo a partir de un generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Drytec®, General Electric Healthcare, Reino Unido) mediante una elución reciente de 1 GBq. A cada uno de los 6 viales resultantes del proceso se les añadieron aproximadamente 175 ( $\pm 20$ ) MBq de  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  en 0,5 ml de suero fisiológico (0,9 % NaCl) cuya actividad fue medida en un activímetro previo a una incubación durante 20 minutos (Figura 15).

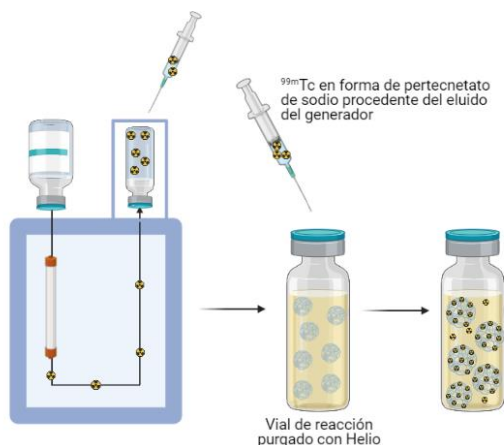


Figura 15. Se muestra la elución del generador y el marcaje directo de las micropartículas de caseína con  $^{99m}\text{Tc}$

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo el control de calidad del marcaje mediante cromatografía en capa fina (TLC) y la actividad radiactiva se midió con un activímetro. Como fase estacionaria se utilizaron tiras *instant Thin Layer chromatography-Silicagel* (iTLC-SG) y como fase móvil metiletilcetona (MEK).

La prueba consistió en depositar una microgota de muestra a 1 cm del extremo inferior de la tira iTLC-SG, punto de origen. Posteriormente, se introdujo la tira con la muestra en el recipiente con la fase móvil MEK. Una vez desarrollada la tira, cuando la fase móvil alcanza el límite superior de la tira o frente, se procedió a cortar las tiras por la mitad con el fin de medir la actividad radiactiva presente en cada una de las mitades. Los criterios empleados para la interpretación de resultados se basaron en el factor de retención (Rf). En una tira de radiocromatografía planar el punto donde se añade la muestra se conoce como origen y tiene un Rf de 0 y al extremo hasta el que migra la fase móvil se le conoce como frente y tiene un Rf de 1. En nuestro caso Rf=0 se corresponde con las micropartículas de caseína radiomarcadas con tecnecio y se situará en el origen de la tira, mientras que un Rf de 1 se corresponde con el tecnecio libre que migrará hasta el frente de la tira (Figura 16). Si toda la actividad se encuentra en Rf=0 la pureza del marcaje será del 100 % porque no habrá contaminantes en nuestra muestra ( $^{99m}\text{Tc}$  libre).

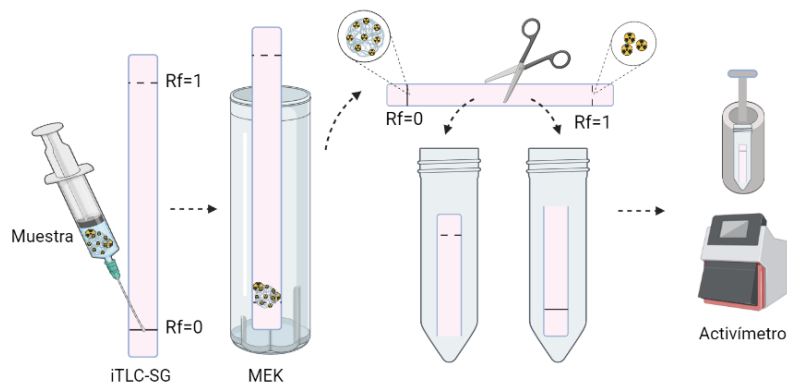


Figura 16. Esquema del control de calidad del marcaje de las micropartículas de caseína. Se muestra cómo se añade la microgota con los componentes radiomarcados, se desarrolla la tira en la fase móvil MEK y se corta para leer la actividad en cada una de las partes en un activímetro

b) Estudio biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

Para el estudio de biodistribución se reprodujo el protocolo de marcaje óptimo resultante de la prueba anterior.

Todos los procedimientos con animales descritos en este trabajo se han llevado a cabo siguiendo un protocolo previamente aprobado por el “Comité de Ética y Bioseguridad” de la Universidad de Navarra en línea con la legislación europea de animales de experimentación (2010/63/UE, protocolo 066-16) y han sido alimentados con una dieta estándar, con disponibilidad libre de agua y comida, y cuidados en condiciones ambientales controladas.

Se administró una dosis única de 10 mg de las micropartículas en 600 µl con una actividad de 170,2 MBq vía oral a una rata *Wistar* con un peso de 278 g.

Para la adquisición de las imágenes la rata fue anestesiada con isoflurano al 2 % (flujo de oxígeno 0,21l/min) y colocada en posición prono en un tomógrafo SPECT-CT MILabs (Figura 17). Se obtuvieron imágenes 1, 4, y 8 horas después de la administración de las <sup>99m</sup>Tc-micropartículas. Para visualizar, corregir y analizar todas las imágenes obtenidas en este trabajo se utilizó el programa PMOD (PMOD Technologies, Suiza).



Figura 17. Se muestra el proceso llevado a cabo para el estudio de biodistribución *in vivo*

### 3.2 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de endolisina modificada y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

#### a) Radiomarcaje del Kit comercial de carbonilocomplejos

Para marcar la endolisina se empleó un marcaje de tipo indirecto mediante carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ . En este caso se optó por el “kit CRS Trycarbonil kit de PSI” que contiene boranocarbonato de sodio [ $\text{Na}_2\text{BH}_3\text{CO}_2$ ], sustancia que actúa simultáneamente como reductor y como fuente *in situ* de CO.

El [ $^{99m}\text{Tc}$ ] $\text{TcO}_4^-$  se obtuvo a partir del generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  mediante una elución reciente de 5 ml.

El proceso de marcaje de los carbonilocomplejos mostrado en la *Figura 18*, se realizó siguiendo protocolos previamente optimizados por investigadores del centro (15).

Brevemente, entre 740 y 1110 MBq en 1 ml de  $^{99m}\text{Tc}$  fueron adicionados al “kit CRS Trycarbonil kit de PSI” y se incubó la disolución durante 30 minutos a 100 °C en un bloque térmico.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el vial se enfrió ligeramente y se redujo la temperatura del bloque térmico hasta 37 °C. Tras enfriarse el kit, se neutralizó con 0,3 ml de una mezcla en proporción 2:3 de una disolución tampón fosfato (pH 7,4) 0,6 M y HCl 1 M. Fue necesario realizar un posterior ajuste de pH empleando una solución análoga de fosfato con NaOH hasta alcanzar el pH deseado de 6,5. La medición del pH se llevó a cabo con tiras de pH MACHEREY-NAGEL.

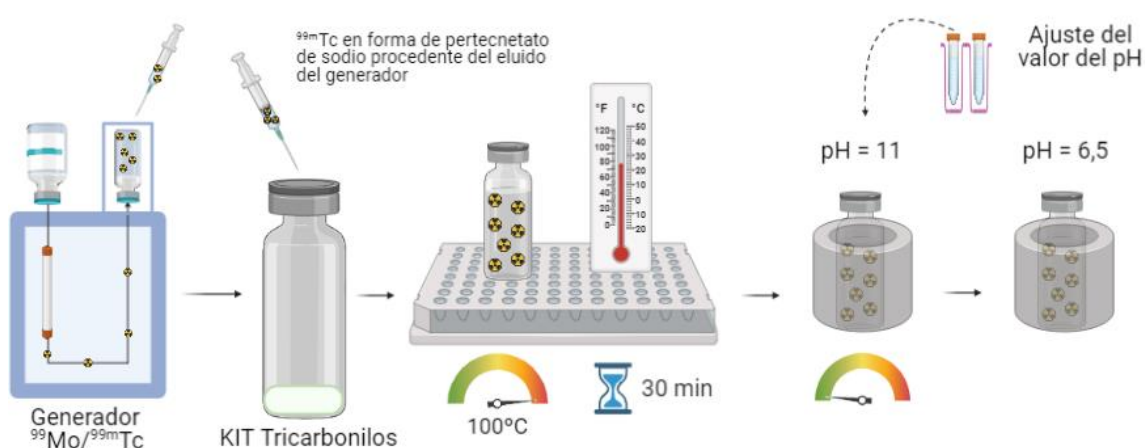
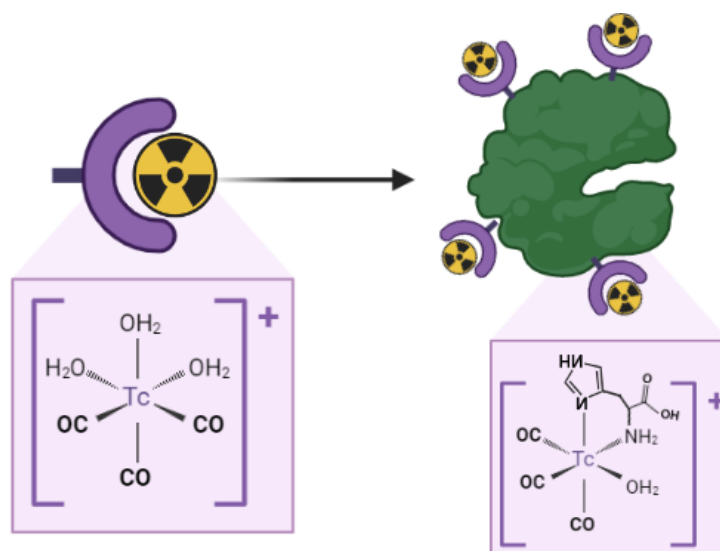


Figura 18. Esquema del proceso de formación de los carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$

## b) Marcaje de la endolisina con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}$

La solución de endolisinas disuelta en suero, se añadió al kit de carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, tras lo cual se procedió a una etapa final de purificación. En la *Figura 19* se muestra el marcaje de la endolisina con carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ .



*Figura 19. Radiomarcaje endolisina modificada mediante carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$*

## c) Purificación de la endolisina marcada con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}$

Se llevó a cabo una doble purificación por centrifugación empleando un micro concentrador Amicon de 10 kDa (*Figura 20A*). La primera centrifugación se llevó a cabo a alta velocidad, 10.000 rpm durante 10 minutos. Tras esta primera centrifugación se recuperó el producto invirtiendo el filtro y se realizó una segunda centrifugación a baja velocidad, 2500 rpm durante 10 minutos.

## d) Control de calidad del marcaje

A continuación, se procedió a comparar el perfil cromatográfico de los carbonilocomplejos de tecnecio, de la muestra de endolisinas marcadas antes y después de la purificación (*Figura 20B*).

Para ello se utilizó el método de radio-TLC con un lector de actividad. Se prepararon tres tiras iTLC-SG como fase estacionaria, una para cada supuesto, y como fase móvil se utilizó medio salino.

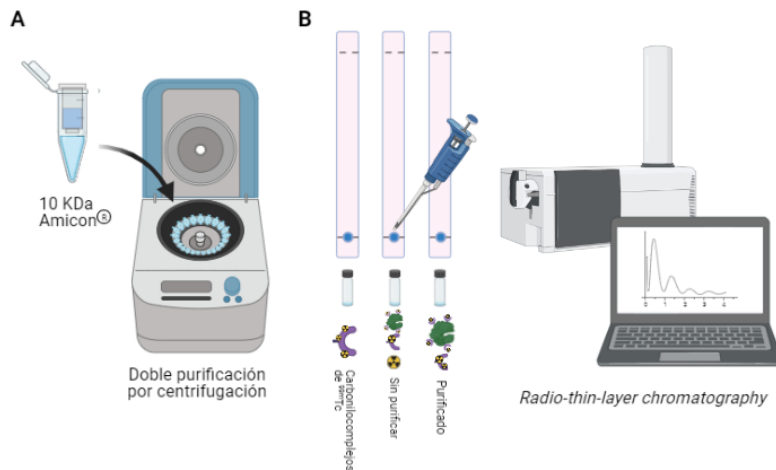


Figura 20. A. Purificación por centrifugación B. Esquema del proceso de control de calidad por radio-iTLC de los carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  y de la muestra radiomarcada antes, y después de la purificación

e) Estudio biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

El estudio se realizó con ratones *Balb/c* hembras (n=8) de un peso medio de 20 gramos. Los grupos estudiados fueron 4 ratones control y 4 ratones a los que se les inoculó 50  $\mu\text{l}$ /pata intramuscular de una suspensión de *Escherichia coli* (infección miositis) de  $2 \times 10^8$  UFC en una extremidad posterior derecha, y la misma cantidad de *Escherichia coli* inactivadas por calor en un bloque térmico con agitación durante 30 minutos a  $90^\circ\text{C}$  en la extremidad posterior izquierda (Figura 21).

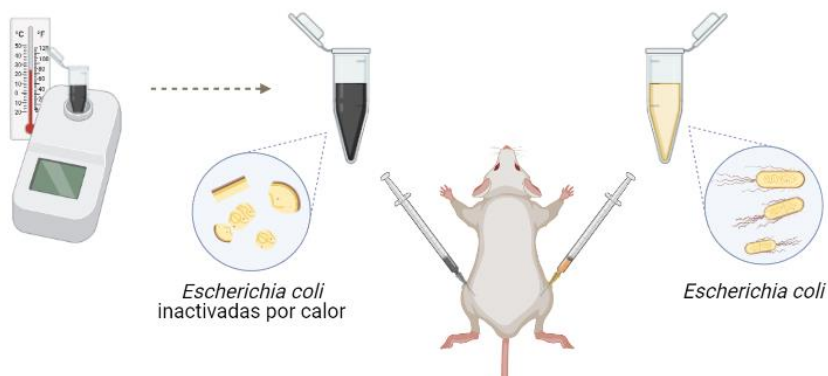


Figura 21. Inoculación *Escherichia coli* en extremidad posterior derecha y *Escherichia coli* inactivadas por calor en extremidad posterior izquierda

La dosis administrada fue de 0,3 mg de endolisina por animal, con un promedio de actividad radiactiva de 35,15 MBq. Para la adquisición de las imágenes los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2 % (flujo de oxígeno 0,21 l/min) y colocados en posición prono en un tomógrafo SPECT-CT MILabs. Se obtuvieron imágenes a 1h, 4h y 24h después de la administración por vía intravenosa de las endolisinas marcadas.

### 3.3 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ y $^{67}\text{Ga}$ del anticuerpo bevacizumab y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

Se realizó el marcaje del anticuerpo bevacizumab con dos tipos de marcajes diferentes:

- El marcaje del bevacizumab con  $^{67}\text{Ga}$  se llevó a cabo mediante un marcaje de tipo indirecto por medio del quelante bifuncional *p-NCS-benzyl-NODA-GA*, al que llamaremos NODAGA a partir de ahora.
- El marcaje del bevacizumab con  $^{99m}\text{Tc}$  se llevó a cabo mediante un marcaje de tipo indirecto por medio de carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ .

#### a) Optimización del proceso de radiomarcaje con $^{68}\text{Ga}$

Previa a la realización del marcaje se llevaron a cabo los siguientes procesos:

- Optimización del pH al que tiene lugar la reacción de marcaje
- Optimización de las fases estacionaria y móvil de la técnica cromatográfica para el control del marcaje
- Calibración de las diferentes especies susceptibles de encontrarse en la lectura cromatográfica con el fin de valorar de manera óptima la especie de interés (Bevacizumab-NODAGA- $^{68}\text{Ga}$ )

Este ensayo previo al marcaje se realizó con el radionucleido  $^{68}\text{Ga}$  ya que el centro cuenta con un generador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  que permite tener disponibilidad diaria de dicho radionucleido. Por el contrario, el cloruro de  $^{67}\text{Ga}$  se obtiene a partir de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  comercial, lo cual implica una disponibilidad limitada (3 días a la semana) y un mayor coste económico.

Aunque el  $^{68}\text{Ga}$  y el  $^{67}\text{Ga}$  son isótopos con propiedades radiactivas diferentes, sus propiedades químicas responsables del marcaje son iguales.

Llevamos a cabo diversas pruebas con el fin de optimizar tanto el pH del proceso de marcaje, como las condiciones de evaluación de la pureza química por radio-TLC.

#### Optimización del pH

Las reacciones de marcaje con galio ocurren de forma óptima a pH cercano a 5. Si el pH es muy bajo, el galio no tiene afinidad y no ocurre la reacción, por el contrario, si el pH es muy superior a 5 se forman especies como el hidróxido de galio  $\text{Ga}(\text{OH})_3$  que precipitan y no son reactivas.

Con el objetivo de encontrar cual es el rango de pH óptimo para nuestra reacción de marcaje se evaluó por radio-TLC la pureza química del compuesto bevacizumab-NODAGA-<sup>68</sup>Ga a los siguientes pH: 3; 3,25; 4; 4,5; 5 y 5,5.

#### Optimización de la cromatografía

Se trabajó en la búsqueda tanto de la mejor fase estacionaria, como de la óptima fase móvil. Se realizó una primera prueba con <sup>68</sup>Ga libre.

Para mejorar la rutina con citrato se trabajó con las siguientes fases móviles: NaCl-HCl 0,1M y HCl 0,1M. Las fases estacionarias con las que se trabajaron fueron: iTCL-SG, iTCL-SA y TCL-SG 60.

#### Calibración de las diferentes especies susceptibles de aparecer en la cromatografía

Para poder hacer el control de la pureza química del marcaje es necesario identificar el cromatograma de las siguientes especies:

- <sup>68</sup>Ga libre (Figura 22A)
- NODAGA-<sup>68</sup>Ga (Figura 22B)
- Bevacizumab-NODAGA-<sup>68</sup>Ga (Figura 22C). El compuesto que se busca marcar.
- MEZCLA 1: Bevacizumab-NODAGA-<sup>68</sup>Ga + <sup>68</sup>Ga Libre
- MEZCLA 2: <sup>68</sup>Ga libre + NODAGA-<sup>68</sup>Ga + Bevacizumab-NODAGA-<sup>68</sup>Ga

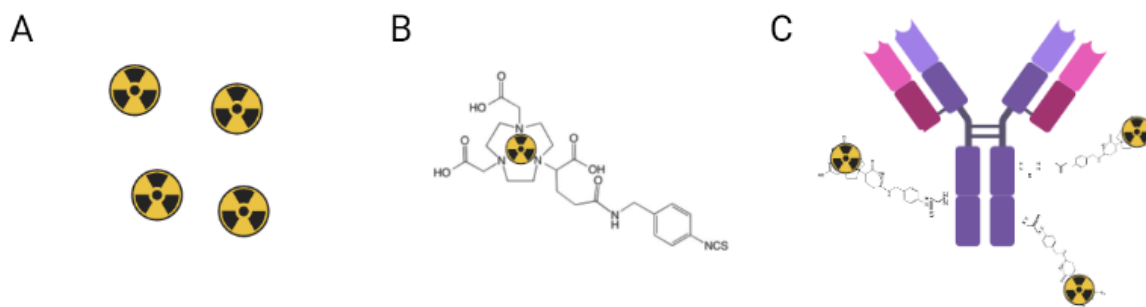


Figura 22. Especies radiactivas A. <sup>68</sup>Ga/<sup>67</sup>Ga libre B. Quelante NODAGA marcado con <sup>68</sup>Ga/<sup>67</sup>Ga C. Anticuerpo bevacizumab unido a quelante NODAGA marcado con <sup>68</sup>Ga/<sup>67</sup>Ga

#### b) Radiomarcaje indirecto del anticuerpo bevacizumab con <sup>67</sup>Ga mediante el quelante bifuncional NODAGA

Como el anticuerpo bevacizumab se encuentra en un medio ácido, y la reacción de conjugación del quelante NODAGA mediante la formación de un enlace tiourea con el bevacizumab requiere

de un pH básico (pH=9), se realizó un intercambio de *buffer* a través de una columna de purificación por exclusión molecular (Figura 23A). Para ello, se equilibró una columna MidiTrap G-25 DGD, haciendo pasar 5 veces una solución de NaHCO<sub>3</sub>, como fase móvil. Una vez equilibrada, se purificó 1ml de la solución de bevacizumab (25 mg/ml), consiguiéndose así, un cambio de medio de los anticuerpos a un pH de 9 en el cual ya podrá tener lugar la reacción de conjugación deseada.

La relación molar bevacizumab:NODAGA óptima para el marcaje fue de 1:20. Para conseguir esta relación fue necesario conocer la masa de bevacizumab de la solución purificada diluida 1:50. Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS ( $\lambda = 280\text{nm}$ ) utilizando como blanco, la fase móvil utilizada en la purificación previa. A partir de la absorbancia medida y aplicando la ley de Beer-Lambert se calculó la concentración de anticuerpo (0,15  $\mu\text{mol}$  de bevacizumab). Y a partir de esta concentración, aplicando la relación molar óptima se calcularon los gramos de NODAGA necesarios para el marcaje que fueron 1,78 mg NODAGA. Se añadió la cantidad de quelante a la solución de bevacizumab y se dejó incubando 2 h a 37°C en agitación suave.

Posteriormente se purificó en una columna de Amicon eliminando el quelante libre y llevando a cabo un segundo cambio de medio. El nuevo medio fue una disolución 2,5 M de 0,5 g de ácido gentsísico (para evitar la degradación del enlace tiourea) y 2,05 g de acetato sódico (buffer para equilibrar el pH) (Figura 23B).

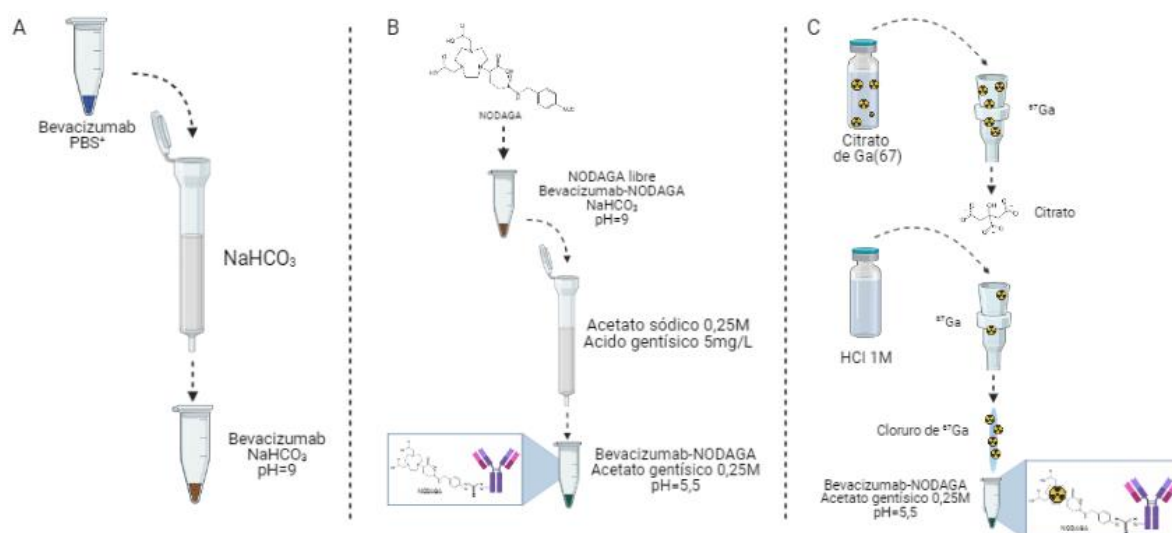


Figura 23. Esquema del radiomarcado del anticuerpo monoclonal bevacizumab con <sup>67</sup>Ga mediante el quelante bifuncional NODAGA **A** Cambio de medio del anticuerpo **B** Unión del quelante NODAGA al bevacizumab y purificación **C** Conversión del citrato de galio a cloruro de galio, marcaje con cloruro de <sup>67</sup>Ga e incubación

Como paso previo al marcaje del bevacizumab-NODAGA, se procedió a cambiar el medio en el que se comercializa el galio, de citrato de galio a cloruro de galio (*Figura 23C*).

Primero se hizo pasar la solución de citrato de galio a través de unos cartuchos que tienen afinidad por el galio y lo retienen. A continuación, se hizo pasar una solución de HCL 1M por los cartuchos, consiguiéndose una solución de cloruro de galio con una actividad radiactiva final de 147,6 MBq, utilizada para llevar a cabo el marcaje.

Posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de cloruro de galio al *ependorf* que contenía los complejos bevacizumab-NODAGA purificados. La mezcla se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C para favorecer la unión del  $^{67}\text{Ga}$  al complejo bevacizumab-NODAGA. Finalmente, la pureza química del complejo resultante se evaluó mediante radio-TLC.

#### c) Radiomarcaje indirecto del anticuerpo bevacizumab mediante carbonilocomplejos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$

La presentación comercial del bevacizumab contiene excipientes para evitar su degradación. Estos excipientes compiten con el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  durante la reacción marcaje por lo que fueron eliminados mediante una purificación por exclusión molecular.

Se llevó a cabo el protocolo de marcaje explicado en el apartado 3.2 Radiomarcaje con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de un tipo de endolisina modificada.

Brevemente, se realizó una primera purificación en columna de exclusión molecular con el objetivo de eliminar estos excipientes de la muestra de anticuerpos. La columna utilizada fue MidiTrap G-25 DGD, equilibrada con PBS. Se eluyó el generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Se añadió una actividad de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de 145,78 MBq al "*kit CRS Trycarbonil kit de PSI*". Se dejó incubar en el bloque térmico durante 30 minutos a 100°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se enfrió ligeramente el vial y se redujo la temperatura del bloque térmico hasta 37°C. Finalmente, se neutralizó el kit, se añadieron 50  $\mu$ l de la solución de bevacizumab purificado y se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C. La pureza química se evaluó por radio-TLC.

d) Estudio de la biodistribución in vivo mediante imagen molecular SPECT/CT de anticuerpos marcados con  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

En el estudio de biodistribución *in vivo* fueron estudiados un total de 4 ratones C57 con un peso medio de 21g (Figura 24):

- Dos ratones C57 a los que se les administró el anticuerpo bevacizumab radiomarcado con  $^{67}\text{Ga}$  y el anticuerpo bevacizumab radiomarcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en una dosis vía intravenosa de 37 MBq de actividad.
- Un ratón C57 al que únicamente se le administró anticuerpo bevacizumab radiomarcado con  $^{67}\text{Ga}$  en una dosis vía intravenosa de 18,5 MBq de actividad.
- Un ratón C57 al que únicamente se le administró anticuerpo bevacizumab radiomarcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en una dosis vía intravenosa de 18,5 MBq de actividad.

Para la adquisición de las imágenes los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2% (flujo de oxígeno 0,21l/min) y colocados en posición prono en una gamma cámara SPECT-CT. Se obtuvieron imágenes 1, 24, y 48 horas y a los 5 días después de la administración

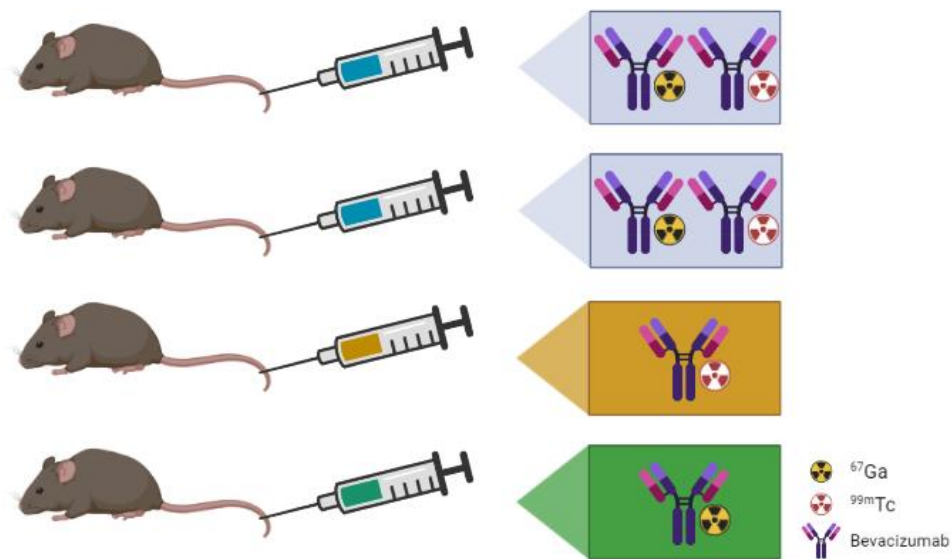


Figura 24. Administración intravenosa del anticuerpo monoclonal bevacizumab radiomarcado con  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$



## 4. Resultados y discusión

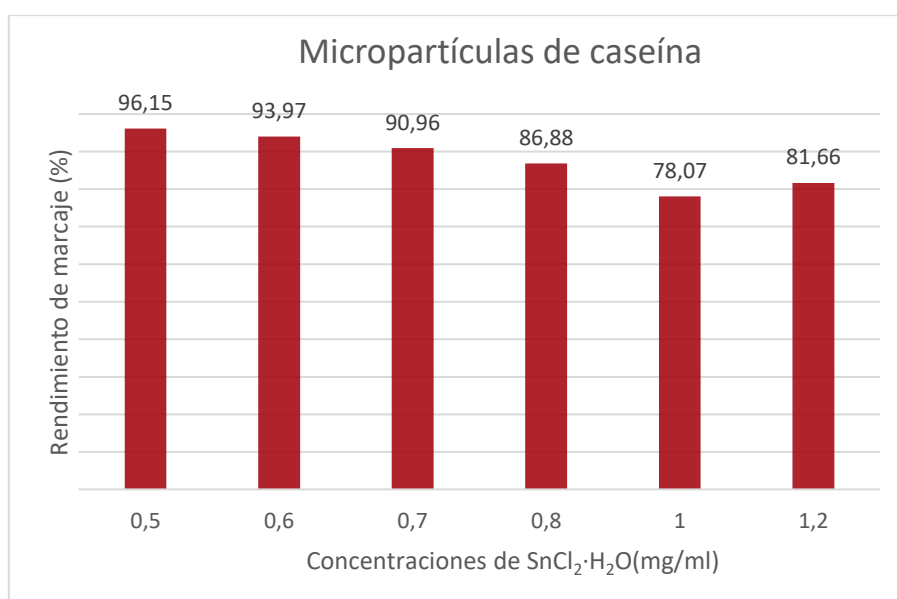
### 4.1 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de micropartículas de caseína y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

#### a) Radiomarcaje directo con $^{99m}\text{Tc}$

La concentración óptima de cloruro de estaño dihidratado para la reducción del pertechnetato de tecnecio fue de 0,5 mg/ml obteniéndose un rendimiento de marcaje del 96 %. Los rendimientos de marcaje obtenidos se muestran en la *Figura 25*. El rendimiento del marcaje se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de marcaje (\%)} = \frac{A_{\text{origen}}}{A_{\text{origen}} + A_{\text{frente}}} * 100$$

Donde  $A_{\text{origen}}$  es la actividad presente en el origen de la tira iTLC-SG y  $A_{\text{frente}}$  es la actividad presente en el frente de la tira. Las actividades se muestran en el *Anexo 1*.



*Figura 25. Rendimientos de marcaje de las micropartículas de caseína a diferentes concentraciones de agente reductor.*

#### b) Estudio de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

En el programa especializado de imagen molecular PMOD, si se elige la opción *rainbow*, el nivel de radiactividad captado se traduce en una gama de colores, siendo el color rojo el que representa el nivel de mayor actividad, y el azul el de actividad más baja. En este caso la señal

de colores representa la localización de las micropartículas de caseína (Figura 26A). Las imágenes están corregidas por el factor de *decay* del tecnecio de manera que son comparables en intensidad entre sí.

La biodistribución del  $^{99m}\text{Tc}$  libre es conocida, y se localiza en estómago, glándulas salivares y tiroides (16). En nuestras imágenes no se observó captación en tiroides, esto indica, que nuestro marcaje es estable *in vivo* y que lo que observamos se corresponde con las micropartículas, y no con el  $^{99m}\text{Tc}$  libre.

El resultado muestra que la mayor parte de las micropartículas marcadas (58 %) con  $^{99m}\text{Tc}$  permanecen inalteradas en el estómago al concluir las 8 horas del estudio. El resto (42 %) se localizan en: intestino delgado a la hora, válvula ileocecal a las cuatro horas y en intestino grueso a las ocho horas. Por tanto, solo una pequeña parte de las mismas han podido liberar su contenido en intestino delgado y la mayor parte de estas partículas liberadas, a las 8 horas ya han alcanzado el intestino grueso. Este perfil de biodistribución fue similar al observado para nanopartículas de caseína (17), su localización dentro del cuerpo estaba restringida al tracto gastrointestinal de los animales y no se observaron evidencias de “translocación” o absorción de las nanopartículas. En la Figura 26B se muestra el corte Longitudinal de la rata a las 8h. Mas allá de las 8h no tenemos información de la biodistribución. Para conocer la velocidad de liberación de la sustancia transportada sería conveniente realizar imágenes más allá de las 8h.

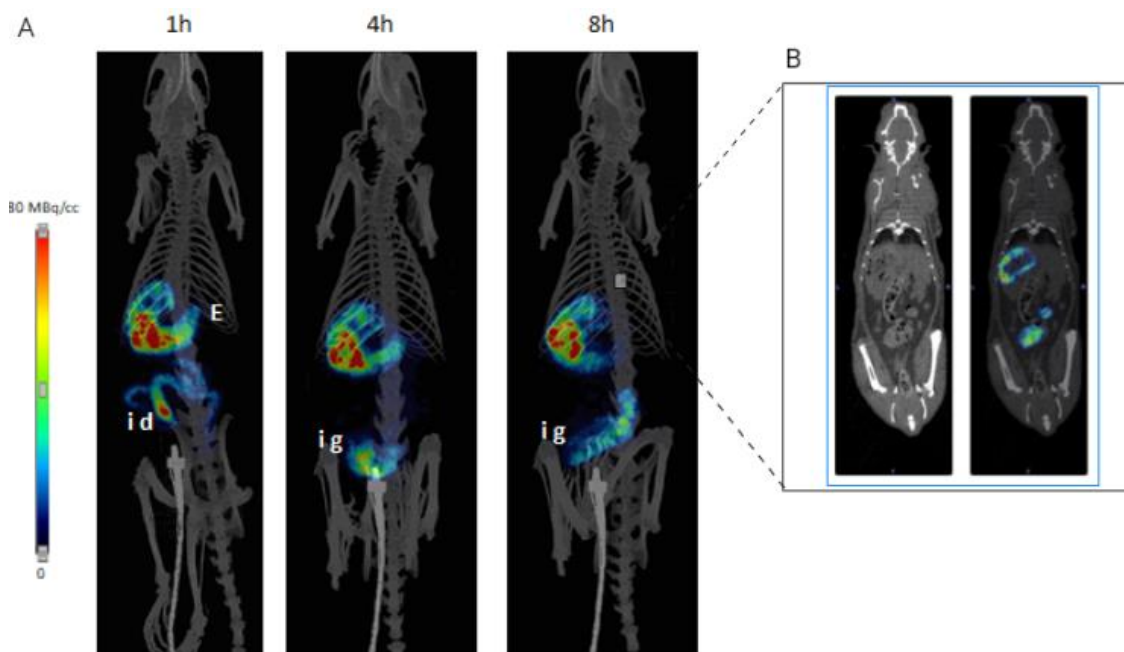
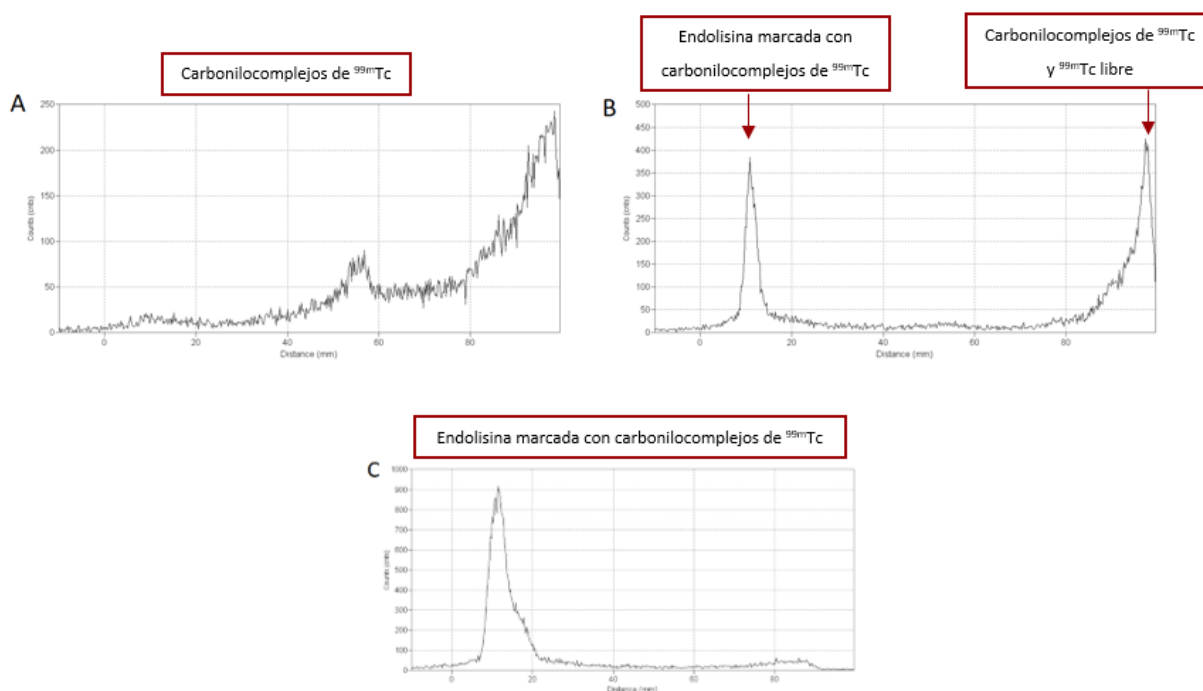


Figura 26. A Imágenes 3D de la biodistribución *in vivo* de las micropartículas de caseína radiomarcadas con  $^{99m}\text{Tc}$  a 1h, 4h y 8h de la administración B Ejemplo de un corte Longitudinal a las 8h

## 4.2 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ de un tipo de endolisina y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

### a) Radiomarcaje de endolisina con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}$

Los resultados de la radio-TLC se muestran en la *Figura 27*. La *Figura 27A* se corresponde con una muestra de Carbonilocomplejos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ . La *Figura 27B* se corresponde con la solución resultante del marcaje de la endolisina antes de la purificación. Se observan dos picos, un primer pico empezando por la izquierda, que se corresponde con la especie de interés (endolisina marcada con carbonilocomplejos de tecnecio) y un segundo pico que se corresponde con los carbonilocomplejos de tecnecio y el tecnecio libre. La *Figura 27C* nos muestra el resultado de la purificación donde únicamente observamos el pico correspondiente a la especie de interés (endolisina marcada con carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ ) lo que indica que la purificación fue óptima.



*Figura 27. Cromatogramas de Carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  (A) y de la muestra antes (B) y después (C) de la purificación.*

La *Figura 28* muestra el resultado del marcaje y purificación del día en que las endolisinas marcadas, fueron administradas y se llevó a cabo el estudio de biodistribución. La pureza radioquímica como muestra el perfil cromatográfico fue del 100 %.

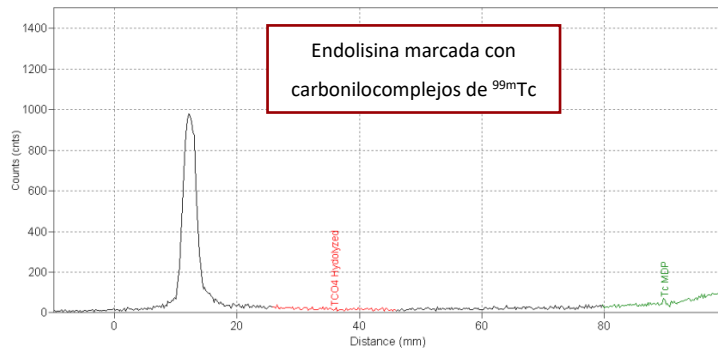


Figura 28. Perfil cromatográfico de la muestra de las endolisinas marcada con carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  purificada

b) Estudio de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

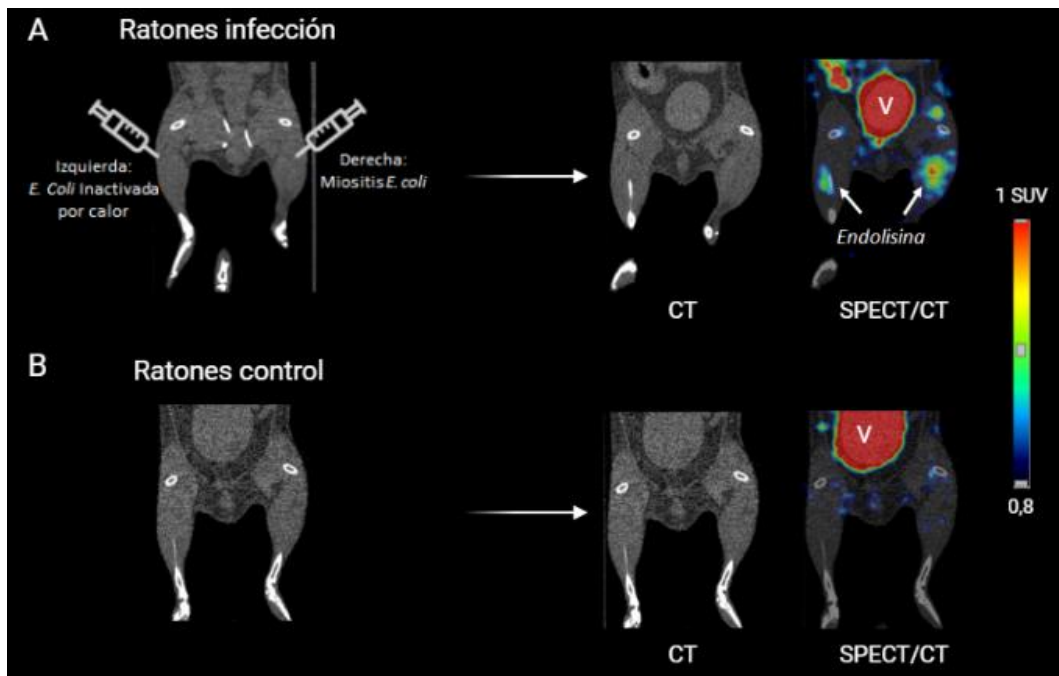


Figura 29. **A** Ejemplo de las imágenes adquiridas a las 24 horas en un ratón enfermo **B** Ejemplo de las imágenes obtenidas a las 24 horas en un ratón sano

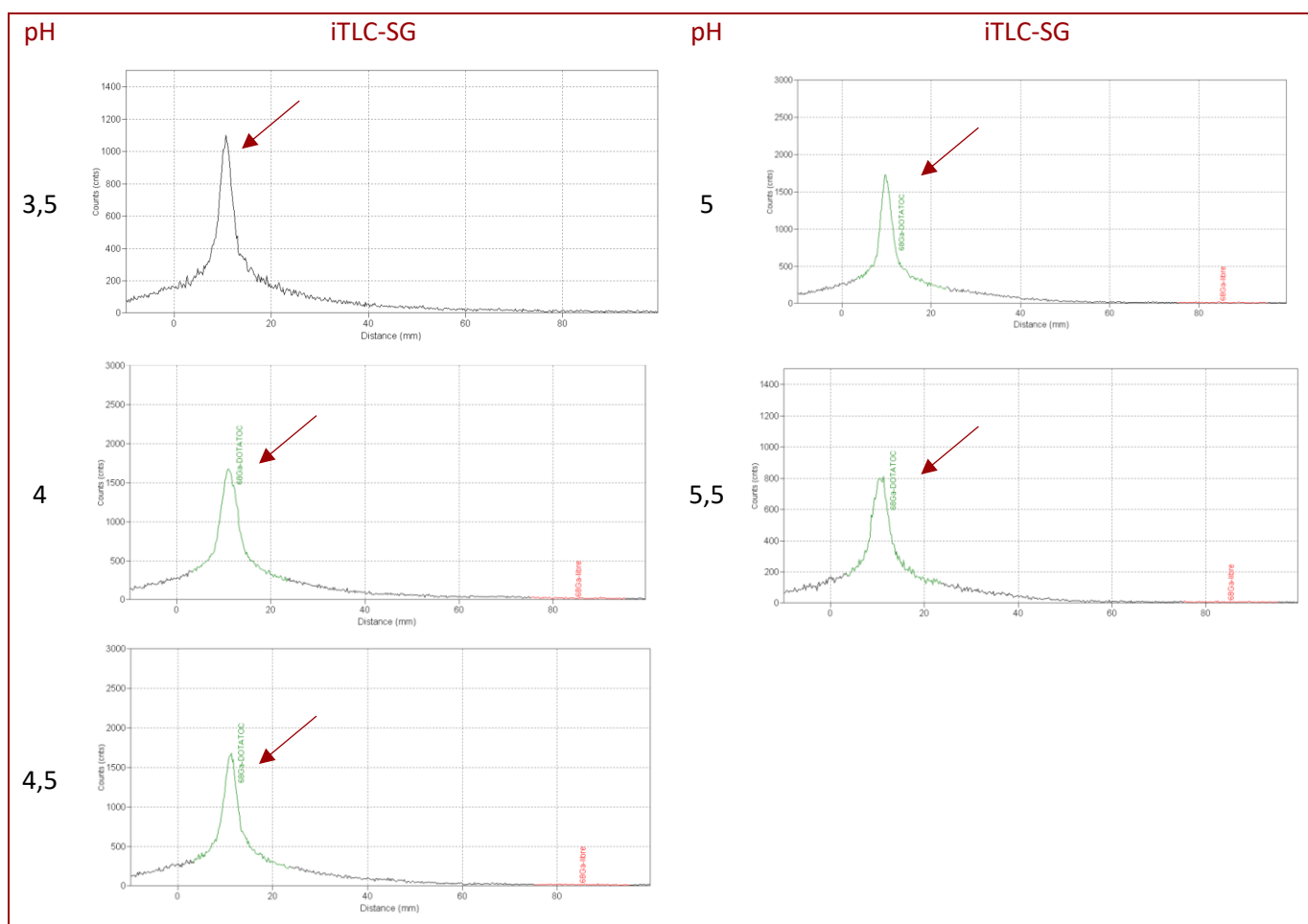
En la *Figura 29A* se muestran las extremidades posteriores de un ratón a las 24h de la administración intravenosa de las endolisinas marcadas en un ratón al que se le provocó infección en las extremidades posteriores. En la *Figura 29B* se muestran las extremidades posteriores de un ratón sano a las 24h de la administración intravenosa de las endolisinas marcadas. Los resultados mostraron que las endolisinas marcadas llegan al foco de infección. Además, las endolisinas alcanzan con mayor intensidad y persistencia el foco de miositis causada por *Escherichia coli* activo que por el depósito de *Escherichia coli* inactivado. En los ratones control el radiofármaco no alcanza las extremidades posteriores.

### 4.3 Radiomarcaje con $^{99m}\text{Tc}$ y $^{67}\text{Ga}$ del anticuerpo bevacizumab y estudio de su biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

#### a) Optimización del proceso de marcaje con $^{68}\text{Ga}$

##### Optimización del pH

De los pH revisados y aptos para la prueba se eligió un pH de 5,5. La *Figura 30* muestran los resultados de los pH sometidos a análisis. Tal y como muestran las gráficas se aprecia un único pico bien definido que representa la pureza de nuestro marcaje. Los picos obtenidos en las diferentes radio-TLC no son comparables entre sí ya que la cantidad de muestra añadida no es idéntica. Pruebas previas realizadas por el grupo de investigación decían que en el rango de pH 1-3 el marcaje no funcionaba. Por tanto, siempre que no haya un exceso de ácido, el marcaje funciona correctamente.



*Figura 30. Radio-TLC muestras de bevacizumab radiomarcado a diferentes pH la flecha señala el Bevacizumab-NODAGA-68Ga*

### Optimización de la cromatografía

Para la elección de la mejor combinación, se tiene en cuenta el factor de retardo (Rf). La *Tabla 1* muestra los factores de retardo resultantes de combinar las diferentes fases estacionarias y móviles estudiadas. Se trata de conseguir, una combinación que dé como resultado la migración total del  $^{68}\text{Ga}$  libre (Rf=1). Las combinaciones que cumplieron estos requisitos fueron las fases estacionarias iTLC-SG y iTLC-SA en fase móvil HCL 0,1 M. Por ello, las pruebas posteriores se realizaron con estas fases. Además, la fase móvil HCL 0,1 M permite realizar los controles de calidad en menos tiempo.

*Tabla 1: Optimización fases utilizadas en la radiocromatografía planar*

Fase estacionaria	Fase Móvil	Muestra	Rf
<b>iTLC-SA</b>	<b>HCL 0.1 M</b>	<b><math>^{68}\text{Ga}</math> libre</b>	<b>1</b>
iTLC-SA	NaCl + HCL 0.1 M	$^{68}\text{Ga}$ libre	0.5
<b>iTLC-SG</b>	<b>HCL 0.1 M</b>	<b><math>^{68}\text{Ga}</math> libre</b>	<b>1</b>
iTLC-SG	NaCl + HCL 0.1 M	$^{68}\text{Ga}$ libre	0.8
<b>TLC-SG 60</b>	NaCl + HCL 0.1 M	$^{68}\text{Ga}$ libre	0

### Calibración de las diferentes especies susceptibles de aparecer en la cromatografía

En la *Figura 31* se muestran los perfiles cromatográficos de las especies estudiadas que nos permiten distinguir unas de otras y así cerciorarnos que al hacer el control de calidad de nuestro marcaje la señal se corresponda con nuestra especie de interés. En las dos últimas filas se muestra el perfil cromatográfico de dos mezclas preparadas añadiendo las diferentes especies, los resultados muestran que somos capaces de identificarlas y distinguir las.

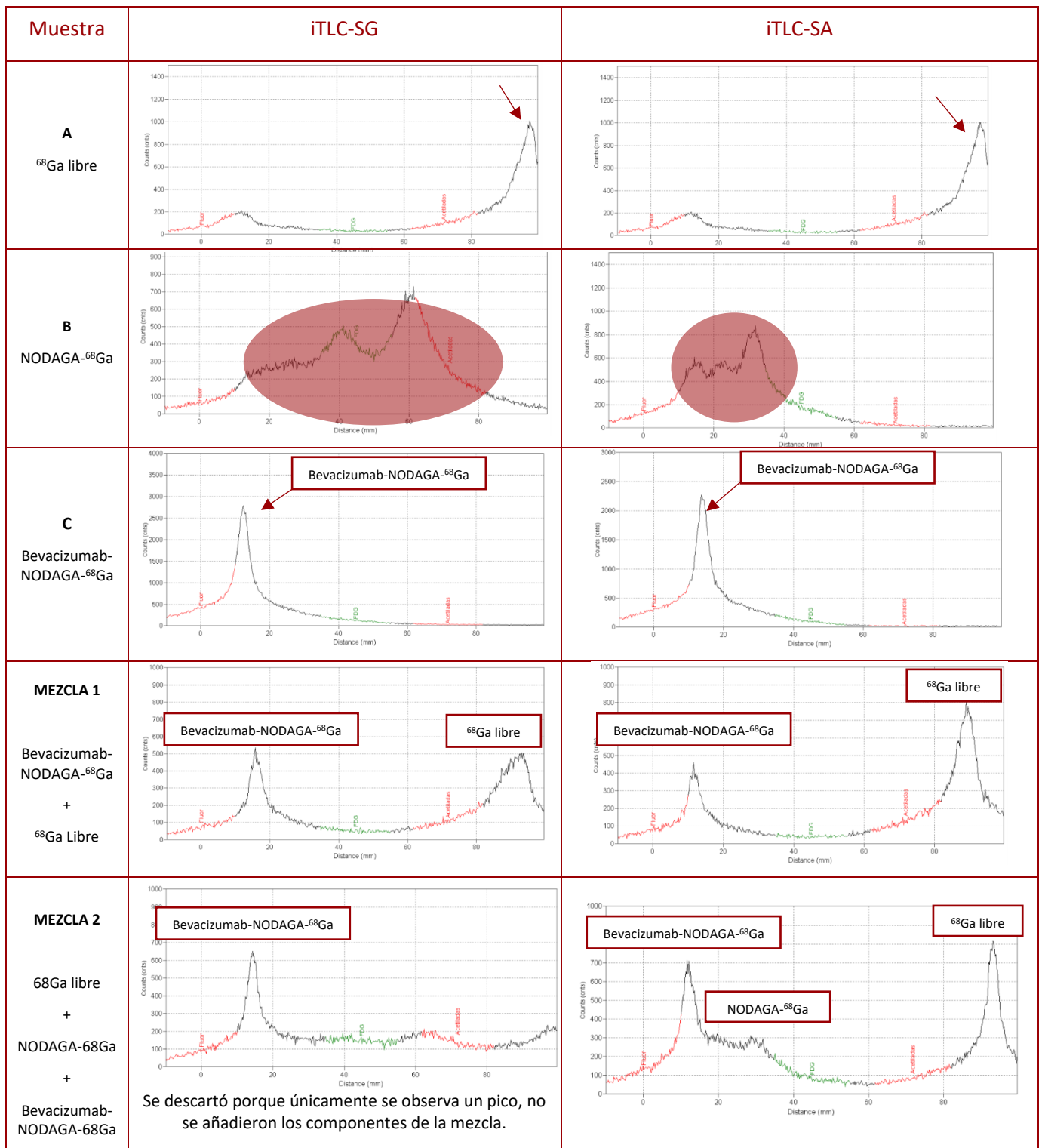


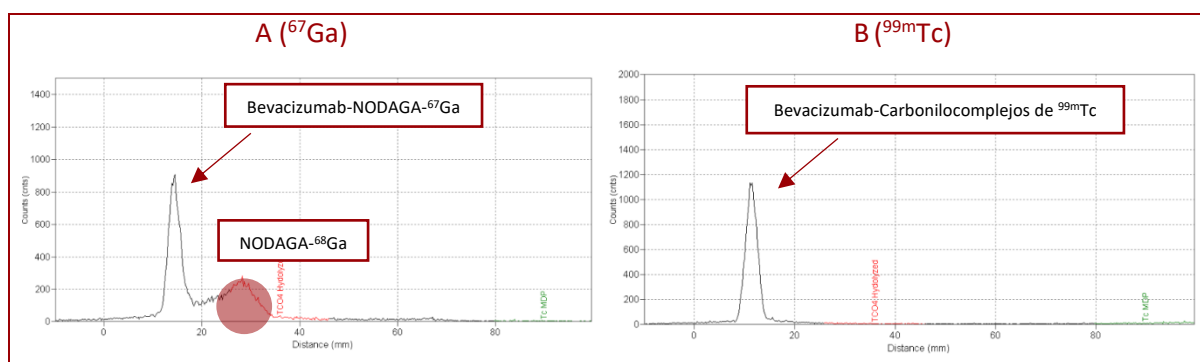
Figura 31. Se muestran representados los cromatogramas y señaladas las especies identificadas resultantes de evaluar por radio-TLC (utilizando las fases estacionarias iTLC-SG y iTLC-SA) las siguientes muestras: **A:**  $^{68}\text{Ga}$  libre **B:** NODAGA- $^{68}\text{Ga}$  **C:** Bevacizumab-NODAGA- $^{68}\text{Ga}$  **MEZCLA 1:** Bevacizumab-NODAGA- $^{68}\text{Ga}$  +  $^{68}\text{Ga}$  Libre **MEZCLA 2:**  $^{68}\text{Ga}$  libre + NODAGA- $^{68}\text{Ga}$  + Bevacizumab-NODAGA- $^{68}\text{Ga}$

b) Radiomarcaje indirecto del anticuerpo bevacizumab con  $^{67}\text{Ga}$  mediante el quelante bifuncional NODAGA y con carbonilocomplejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Una vez optimizado el pH (5,5), elegida la fase estacionaria (iTLC-SG) y la fase móvil (HCL 0,1M) y detectada la cromatografía de los contaminantes se marcó radiactivamente el anticuerpo con  $^{67}\text{Ga}$  y se realizó el correspondiente control de calidad que se muestra en la *Figura 32A*.

El perfil cromatográfico resultante de la radio-TLC del marcaje de bevacizumab con NODAGA- $^{67}\text{Ga}$  (*Figura 32A*) muestra un pico estrecho y definido correspondiente con la actividad en el origen de la tira, es decir, con el bevacizumab-NODAGA- $^{67}\text{Ga}$ . También aparece un segundo pico pequeño contiguo correspondiente a la especie NODAGA- $^{67}\text{Ga}$ , para eliminarlo, se llevó a cabo una segunda purificación (no se muestra en el trabajo).

El perfil cromatográfico resultante de la radio-TLC del marcaje de bevacizumab con carbonilocomplejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (*Figura 32B*) muestra un único pico estrecho y definido que corresponde con la actividad en el origen de la tira que se corresponde con el bevacizumab- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .



*Figura 32. Cromatograma resultante del marcaje del anticuerpo monoclonal bevacizumab con  $^{67}\text{Ga}$  (A) y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (B)*

c) Estudio de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT

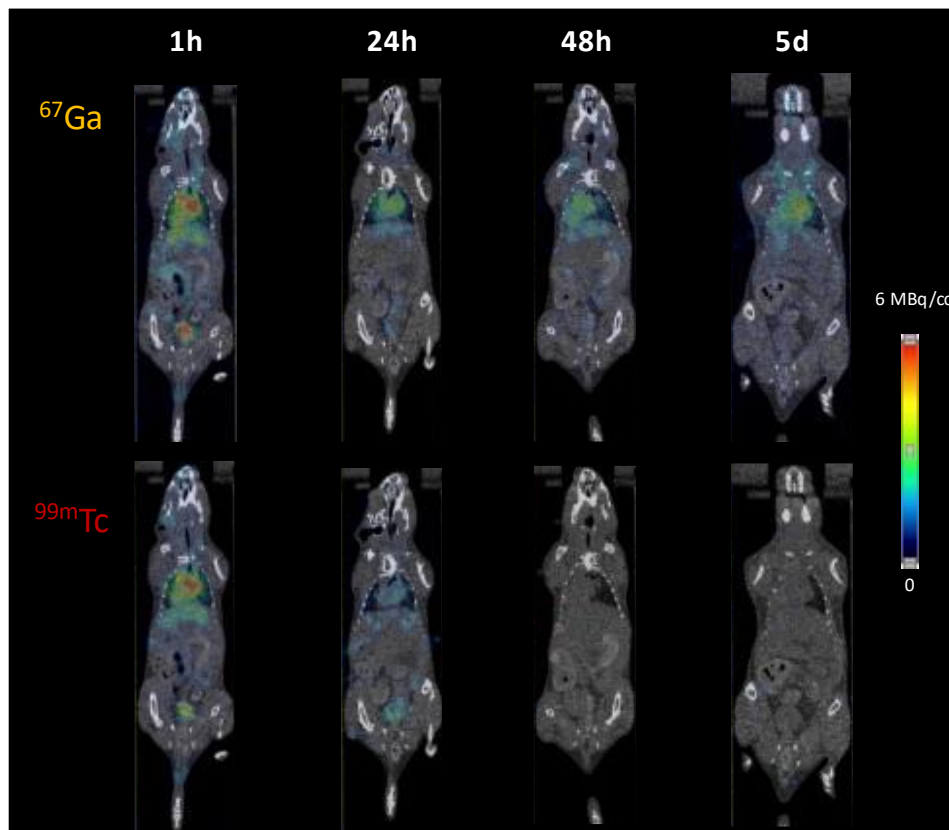


Figura 33. Imágenes SPECT/CT obtenidas a 1h, 24h, 48h y 5 días tras la administración intravenosa del anticuerpo bevacizumab radiomarcado con  $^{67}\text{Ga}$  y con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Las imágenes de los ratones a los que únicamente se les administró un tipo de radioisótopo no se muestra en el trabajo. Su biodistribución fue la misma que en los ratones donde se administraron los dos radioisótopos, estos resultados evidencian que la biodistribución del bevacizumab no se ve modificada por la administración simultánea del anticuerpo radiomarcado  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

La Figura 33 muestra las imágenes de SPECT/CT de la distribución del bevacizumab marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y con  $^{67}\text{Ga}$  tras su administración intravenosa. La mayor captación se encuentra en corazón debida a la afinidad del bevacizumab por el VEGF.

Las imágenes son cortes longitudinales del mismo ratón a lo largo del tiempo, pero al adquirir las imágenes, se ha filtrado el espectro de emisión correspondiente a cada radioisótopo. El espectro de las imágenes de la parte superior corresponde al  $^{67}\text{Ga}$ , que, en su desintegración radiactiva, emite rayos gamma con una energía de 93 keV, 185 keV y 300 keV. El espectro de las imágenes de la parte inferior corresponde al  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , que, en su desintegración radiactiva, emite rayos gamma monoenergético de 142 keV.

A las 24h prácticamente no se observa tecnecio debido a su corto periodo de semidesintegración de 6 horas. Este resultado demuestra que el  $^{99m}\text{Tc}$  no es un radioisótopo adecuado para estudiar la biodistribución de biomoléculas grandes como los anticuerpos.

Como control, para evaluar si el  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{99m}\text{Tc}$  que observamos se encuentra unido al bevacizumab se consulta un estudio llevado a cabo por *Arcocha-Torres et al. 2020*. En los controles con cloruro de  $^{67}\text{Ga}$  (*Anexo 2*), la actividad se localizó fundamentalmente en nasofaringe, hígado y médula ósea y en el control con  $^{99m}\text{Tc}[\text{TcO}_4^-]$  (*Anexo 3*) la actividad se localizó fundamentalmente en estómago (18).

Este estudio abre la puerta al uso de marcajes mixtos que permitan evaluar la distribución de dos componentes diferentes. Un ejemplo de esto sería el marcaje de diferentes componentes de una nanopartícula con el objetivo de comprobar, si esta se mantiene intacta, o si, por el contrario, se desintegra y estos componentes viajan de forma independiente.

## 5. Conclusiones

### Micropartículas de caseína

Un gran número de publicaciones hacen referencia a las ventajas y propiedades que presentan las micelas de caseína como vehículo para la administración de fármacos, probióticos u otras sustancias activas (4). No obstante, son insuficientes los datos acerca de su comportamiento y biodistribución *in vivo*. Las técnicas de imagen molecular nos ofrecen la posibilidad de conocer el destino de las micropartículas en el organismo y su farmacocinética de una forma no invasiva. En el presente estudio se ha planteado utilizar técnicas de imagen molecular SPECT/CT para estudiar la biodistribución de las micropartículas de caseína previamente marcadas con un isótopo radiactivo. Para marcar radiactivamente las micropartículas de caseína se utilizó el radiometal  $^{99m}\text{Tc}$  debido a su periodo de semidesintegración medio (6 horas) y su fácil disponibilidad. Se desarrolló un marcaje de tipo directo de las micropartículas con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando  $\text{SnCl}_2$  como agente reductor. Las principales desventajas de utilizar este agente reductor son: la presencia de tecnecio libre, si se añade poco agente reductor; y la formación de óxidos/hidróxidos de tecnecio, por un exceso de agente reductor. Por ello, se llevó a cabo una optimización del marcaje ensayando diferentes concentraciones de agente reductor. La concentración de  $\text{SnCl}_2$  con la que se obtuvo el rendimiento de marcaje más elevado (96 %) fue de 0,5 mg/ml. Con el objetivo de obtener información detallada de la biodistribución, las micropartículas radiomarcadas, fueron administradas por vía oral a una rata *Wistar* y se adquirieron imágenes 1 h, 4 h y 8 h después de la administración. Las imágenes mostraron que la mayor parte de las micropartículas marcadas (58 %) con  $^{99m}\text{Tc}$  se localizan en el estómago al concluir las 8 horas del estudio, y el resto (42 %), se localizan en: intestino delgado a la hora, y en intestino grueso a las ocho horas. El perfil de biodistribución fue similar al observado para nanopartículas de caseína (17) cuya localización dentro del cuerpo estaba restringida al tracto gastrointestinal y no se observaron evidencias de “translocación” o absorción de las nanopartículas. Los resultados de nuestro estudio se contrastaron con el perfil de biodistribución de la administración oral de  $^{99m}\text{Tc}$  libre para cerciorarnos de que la captación observada se correspondía con las micropartículas marcadas, y no con  $^{99m}\text{Tc}$  libre (16).

Por tanto, en este primer estudio se concluye que:

- Se ha conseguido marcar las micropartículas de caseína satisfactoriamente con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando un radiomarcaje directo obteniendo un rendimiento de marcaje elevado (96 %), habiendo optimizado previamente la concentración de agente reductor ( $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

- El estudio de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT de las micropartículas de caseína evidenció la estabilidad del marcaje *in vivo*.
- Las micropartículas de caseína radiomarcadas, tras ser administradas por vía oral a una rata *Wistar* se acumulan en estómago y son liberadas paulatinamente a intestino durante las 8 h evaluadas.

### Endolisina

Las proteínas víricas derivadas de los bacteriófagos están siendo estudiadas como alternativa a los antibióticos convencionales, pero los conocimientos sobre la farmacocinética de estos derivados de fagos son escasos, y esto limita sus aplicaciones clínicas. Se ha realizado un reducido número de estudios *in vivo*, entre ellos destacan los estudios *in vivo* mediante modelos farmacocinéticos (19). Una herramienta que presenta las características idóneas para obtener esta información de forma no invasiva, son las técnicas de imagen molecular con isótopos radioactivos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la biodistribución *in vivo* de una endolisina modificada con actividad antibacteriana tras su administración intravenosa. Para el marcaje se optó por el  $^{99m}\text{Tc}$  como el radionucleido más adecuado. El método elegido para marcar las endolisinas fue emplear carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  debido a la disponibilidad de *kits* fríos que permiten la preparación extemporánea del radiofármaco. No se llevó a cabo ninguna optimización del marcaje porque se reprodujo un protocolo de marcaje previamente optimizado por investigadores del centro para el marcaje de anticuerpos mediante carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Este precursor de carbonilocomplejos de tecnecio ( $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ) está formado por tres sitios de coordinación que tienen gran afinidad por los grupos funcionales tiol (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>) y tioéster (R-S-CO-R'), lo que posibilita el radiomarcaje de biomoléculas peptídicas, como la endolisina, que contienen estos grupos funcionales en algunos residuos de aminoácidos. Pese a que el rendimiento del marcaje de las endolisinas no fue muy elevado (50 %), tras la purificación de la muestra, se consiguió una pureza química del 100 %. Con el objetivo de evaluar la capacidad de estas endolisinas para alcanzar y permanecer en un foco de infección causado por bacterias Gram negativas vivas o inactivadas, se estudiaron un grupo de ratones control y un grupo de ratones a los que se les inoculó en la extremidad posterior izquierda, *Escherichia coli* activas, y en la extremidad posterior izquierda, *Escherichia coli* inactivadas por calor. Se obtuvieron imágenes SPECT/CT que evidenciaron que las endolisinas llegan al foco de infección alcanzando con mayor afinidad el foco de infección causado por bacterias *Escherichia coli* activas. Mientras que, en los ratones control sanos, las endolisinas no alcanzaron las extremidades posteriores.

Por tanto, del segundo estudio se concluye que:

- La endolisina puede marcarse de forma eficiente con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando un sistema tipo *kit* de carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$ .
- Se ha identificado de forma satisfactoria el perfil cromatográfico de las endolisinas radiomarcadas y de los posibles contaminantes (carbonilocomplejos de  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{99m}\text{Tc}$  libre)
- El estudio de biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT resultante de la administración intravenosa de las endolisinas radiomarcadas en ratones *Blab/c* evidenció que parte de las endolisinas modificadas alcanzan y permanecen en el foco de infección causado por *Escherichia coli* durante las 24h evaluadas.

#### Bevacizumab

En radiofarmacia, el radioinmunodiagnóstico, es una herramienta basada en el uso de anticuerpos monoclonales radiomarcados para diagnosticar patologías. Para diseñar nuevos radiofármacos en este ámbito, es necesario optimizar el radiomarcaje de anticuerpos monoclonales con nuevos radiometales. Uno de los anticuerpos monoclonales más conocido y estudiado es el anticuerpo monoclonal bevacizumab. El radiomarcaje del bevacizumab con el radiometal  $^{99m}\text{Tc}$  ha sido desarrollado y optimizado presentando un gran potencial para ser utilizado como trazador para adquirir imágenes de tumores en estudios preclínicos (20). Sin embargo, el  $^{99m}\text{Tc}$  tiene un periodo de semidesintegración de 6 horas, y el bevacizumab, un tiempo de semivida biológica superior, quedando los estudios limitados a 24 horas (15). Por tanto, es necesario radiomarcar este anticuerpo con nuevos isótopos radioactivos que permitan abarcar el tiempo de circulación del bevacizumab. Este estudio, tuvo como objetivo desarrollar y optimizar el marcaje del bevacizumab con el radiometal  $^{67}\text{Ga}$  utilizando el quelante bifuncional NODAGA que sirve de nexo entre el radionucleido y el bevacizumab estabilizando la unión. Para ello, se optimizaron las condiciones experimentales de marcaje y controles de calidad (pH de la reacción, y fases de la radiocromatografía planar). Para la optimización del marcaje se utilizó el radionucleido  $^{68}\text{Ga}$  por su abundante disponibilidad en el centro y porque sus propiedades químicas son iguales a las del radiometal  $^{67}\text{Ga}$ . Todos los pH revisados fueron aptos, y se eligió el pH de 5,5 para los posteriores marcajes. Las mejores fases estacionarias fueron: iTLC-SG y iTLC-SA, y entre las fases móviles estudiadas, la óptima fue HCL 0,1 M. Se identificó el perfil cromatográfico de todas las posibles especies resultantes del marcaje para poder detectar la

presencia de contaminantes. Una vez optimizado, se desarrolló el marcaje con  $^{67}\text{Ga}$  con aquellas condiciones experimentales que dieron un mayor rendimiento de marcaje.

De forma paralela, se desarrolló también el marcaje del anticuerpo utilizando un sistema tipo *kit de carbonilocomplejos* de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  previamente optimizado, obteniéndose un rendimiento de marcaje del 100 %. Con el objetivo de evaluar la biodistribución *in vivo* mediante imagen molecular SPECT/CT de las dos formulaciones (bevacizumab- $^{67}\text{Ga}$  y bevacizumab- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ); éstas son administradas tanto simultáneamente, como por separado, en ratones C57 por vía intravenosa. La captación se localizó mayoritariamente en corazón y la biodistribución del bevacizumab fue idéntica independientemente del radionucleido con el que fue marcado. Como control, se comparó el perfil de biodistribución de ambas formulaciones con estudios donde se administró vía intravenosa, cloruro de galio y pertecnetato de tecnecio. La actividad en los controles se localizó en nasofaringe, hígado y médula ósea, en el caso del cloruro de galio, y en estómago en el caso de pertecnetato de tecnecio.

Por tanto, del tercer estudio se concluye que:

- Se han desarrollado de forma satisfactoria dos estrategias de radiomarcaje del anticuerpo bevacizumab.
- El anticuerpo bevacizumab ha sido marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  utilizando un sistema tipo *kit* de carbonilocomplejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con una elevada pureza química.
- El anticuerpo bevacizumab puede marcarse de forma sencilla y reproducible con  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{68}\text{Ga}$  utilizando un radiomarcaje de tipo indirecto mediante el quelante bifuncional NODAGA, tras optimizar previamente el pH al que tiene lugar la reacción de marcaje.
- Se han optimizado las fases de la radiocromatografía planar. Las fases estacionarias iTLC-SG y iTLC-SA, y la fase móvil HCL 0,1M, fueron las que permitieron llevar a cabo un control de calidad más rápido, óptimo y sencillo.
- Es posible la administrado vía intravenosa del anticuerpo bevacizumab radiomarcado con dos radionucleidos diferentes en ratones C57.
- Para estudiar la biodistribución de una molécula de gran tamaño como un anticuerpo es necesario emplear un radionucleido de vida media relativamente larga ( $^{67}\text{Ga}$ ), de lo contrario, un radionucleido con un semiperiodo de desintegración corto como el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , dejaremos de ver captación, cuando el anticuerpo todavía se esté distribuyendo.

## 6. Bibliografía

1. Obaya Valdivia A, López López J, Vargas-Rodríguez YM, Camacho González O. Producción de radiofármacos para tomografía por emisión de positrones (PET) y su aplicación en el diagnóstico de diversas enfermedades. *Educacion Quimica*. 2016;27(4):292–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.04.005>
2. Vermeulen K, Vandamme M, Bormans G, Cleeren F. Design and Challenges of Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2019;49(5):339–56.
3. Saha B. Radiopharmaceuticals and General Methods of Radiolabeling. In 2018. p. 93–121.
4. Głąb TK, Boratyński J. Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Topics in Current Chemistry*. 2017;375(4).
5. Cahill J, Young R. Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Advances in Virus Research*. 2019;103:33–70.
6. Lin DM, Koskella B, Lin HC, Lin DM, Lin HC, Gastroenterology S. Phage therapy : An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. 2017;8(3):162–73.
7. Gerriets V, Kasi A. Bevacizumab. In *Treasure Island (FL)*; 2021.
8. Papagiannopoulou D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2017;60(11):502–20.
9. Waibel R, Alberto R, Willuda J, Finnern R, Schibli R, Stichelberger A, et al. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nature Biotechnology*. 1999;17(9):897–901.
10. Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA. FICHA TECNICA CITRATO DE GALIO (67GA) CURIUM PHARMA SPAIN 37 MBq/ml SOLUCION INYECTABLE. [cited 2021 Jun 1]. Available from: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/70090/FT\\_70090.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/70090/FT_70090.pdf)
11. Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA. FICHA TECNICA GALLIAD 0.74 - 1.85 GBQ GENERADOR DE RADIONUCLIDO. [cited 2021 Jun 1]. Available from: [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/83618/FT\\_83618.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/83618/FT_83618.html)
12. Spang P, Herrmann C, Roesch F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2016;46(5):373–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003>

13. Ljungberg M, Pretorius PH. SPECT/CT: an update on technological developments and clinical applications. *The British Journal of Radiology*. 2018;91(1081):20160402.
14. Wells RG. Instrumentation in molecular imaging. *Journal of Nuclear Cardiology*. 2016;23(6):1343–7.
15. Rocio RM. TESIS DOCTORAL Radiomarcaje y biodistribución mediante SPECT-CT de nanopartículas con bevacizumab. 2020;166–7.
16. Boschi F, Pagliuzzi M, Rossi B, Cecchini MP, Gorgoni G, Salgarello M, et al. Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc99m-pertechnetate. *Journal of Biomedical Optics*. 2013;18(7):076005.
17. Gil AG, Irache JM, Peñuelas I, González Navarro CJ, López de Cerain A. Toxicity and biodistribution of orally administered casein nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;106:477–86.
18. de Arcocha-Torres M, Quincoces G, Martínez-López AL, Erhard A, Collantes M, Martínez-Rodríguez I, et al. Preparation, radiolabeling with 99mTc and 67Ga and biodistribution studies of albumin nanoparticles covered with polymers. *Revista Espanola de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*. 2020;39(4):225–32.
19. Lin YW, Chang RY, Rao GG, Jermain B, Han ML, Zhao JX, et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antipseudomonal bacteriophage therapy in rats: a proof-of-concept study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(9):1229–35.
20. Camacho X, Fernanda Garcia M, Calzada V, Fernandez M, Porcal W, Alonso O, et al. Synthesis and Evaluation of 99mTc Chelate-conjugated Bevacizumab. *Current Radiopharmaceuticals*. 2013 Mar 22 [cited 2021 Jun 3];6(1):12–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23035645/>

## 7. Autoevaluación

La realización de este Trabajo de Final de Grado durante mi estancia en prácticas en la Clínica Universidad de Navarra ha sido una experiencia única y muy positiva tanto a nivel profesional como personal. Me ha permitido, entre otras cosas, conocer el día a día de un grupo de investigación y trabajar en un laboratorio GMP (*Good Manufacturing Practices*).

Al comienzo de la elaboración del trabajo la radiofarmacia era un área desconocida para mí, pero recibir formación en radiofarmacología, radioquímica, protección radiológica y fundamentos físicos de la Medicina Nuclear me ha permitido desarrollar este trabajo.

Para trabajar en instalaciones radioactivas es necesario haber realizado el curso de Operador de Instalaciones Radioactivas. Pese a que mi participación en los proyectos de investigación estaba condicionada por no tener el curso, esto no ha limitado mi aprendizaje e implicación en el desarrollo de los proyectos. He estado presente en todos los pasos, llevando a cabo aquellas tareas no radiactivas. Para las tareas radiactivas, he llevado a cabo entrenamientos en frío que me han permitido simular las condiciones de trabajo de los investigadores.

Concluyendo, el desarrollo de este trabajo ha sido un aprendizaje constante donde he tenido la oportunidad de adquirir conocimientos nuevos y asentar conceptos aprendidos en asignaturas de la carrera como: Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular, Procesos de Separación y Purificación, Química, Enzimología o Inmunología.

## 8. Anexos

### Anexo 1:

Tabla 2: Rendimientos de marcaje de las micropartículas de caseína a diferentes concentraciones de agente reductor.

Muestras	[SnCl <sub>2</sub> ]	Actividad en Rf= 1	Actividad en Rf=0	Rendimiento %
1	<b>0.50 mg/ml</b>	<b>0.46 µCi</b>	<b>11.50 µCi</b>	<b>96.15 %</b>
2	0.60 mg/ml	0.66 µCi	10.30 µCi	93.97 %
3	0.70 mg/ml	1.53 µCi	15.40 µCi	90.96 %
4	0.80 mg/ml	4.15 µCi	27.50 µCi	86.88 %
5	1.00 mg/ml	5.30 µCi	18.60 µCi	78.07 %
6	1.20 mg/ml	8.10 µCi	36.00 µCi	81,66 %

### Anexo 2: Control <sup>99m</sup>Tc

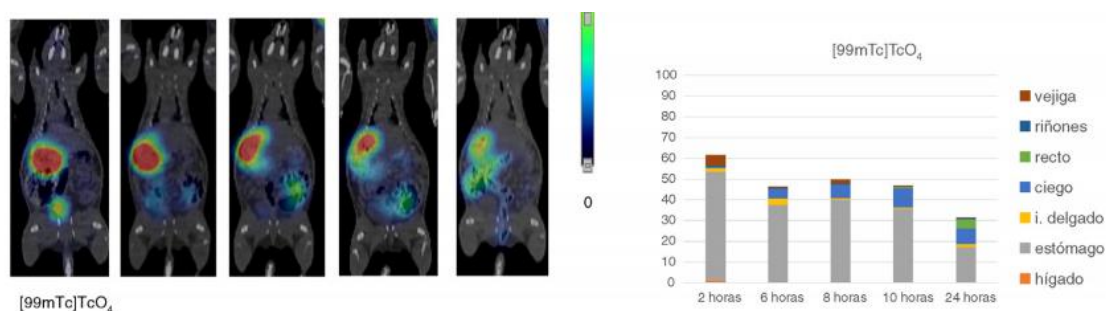


Figura 34. Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular de Arcocha-Torres et al. Publicado July 1, 2020. Volume 39, Issue 4. Páginas 225-232. 2020

### Anexo 3: Control <sup>67</sup>Ga

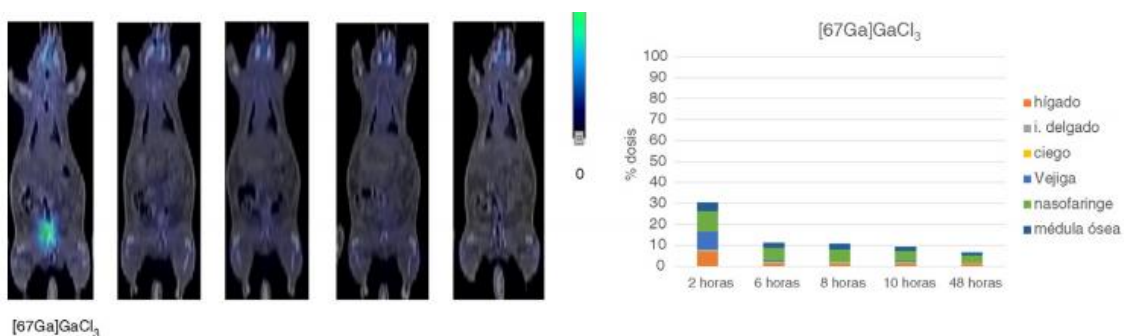


Figura 35. Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular de Arcocha-Torres et al. Publicado July 1, 2020. Volume 39, Issue 4. Páginas 225-232. 2020

**ANNEX 2**

**FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG**

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Marta Yábar Galdeano

Nom i Cognoms del Tutor/a: Lluís Masip Vernis

Data de la entrevista amb l'alumne: 14-03-2021

Recomanacions durant el seguiment:

- Discussió sobre la planificació i terminis per les diferents parts del treball de fi de grau.
- Discussió sobre els continguts i l'extensió del treball de fi de grau.
- Discussió sobre com procedir amb la revisió de la memòria escrita.
- Discussió específica sobre la memòria i els resultats obtinguts.

Observacions:

- El tutor considera que la memòria del treball realitzat hauria de tenir (un cop completada) l'extensió i continguts adients per un treball de fi de grau. Comentar però que en el moment de signar aquest document la memòria escrita encara no està finalitzada i encara queden parts importants per completar i revisar.
- L'alumne sempre ha tingut una actitud molt bona i s'ha mostrat molt activa en el desenvolupament del treball de fi de grau.

Observacions Darrera revisió:

- Comentar sobre l'última versió de la introducció.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 22 de maig 2020