

## Marcación de un derivado de glucosa con $^{99m}\text{Tc}$ mediante la formación de un complejo Tc(V)-nitruro. Estudios preliminares. Article AJ 52-5.

Soledad Fernández<sup>1</sup>; Javier Giglio<sup>1</sup>; Ignacio Laborda<sup>1</sup>; Marcelo Incerti<sup>2</sup>; Ana Rey<sup>1</sup>.

*Cátedra de Radioquímica, Dpto. Estrella Campos<sup>1</sup>.  
Cátedra de Química Farmacéutica, Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Química,  
Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.<sup>2</sup>.*

---

### Resumen

La preparación de derivados de glucosa marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  reviste gran interés para la evaluación del consumo de glucosa in vivo en oncología y cardiología nuclear. Este trabajo presenta la marcación de un análogo de glucosa (GLU-DTC) mediante la formación de un complejo Tc(V)-nitruro simétrico. Para ello se incorporó a la biomolécula un grupo ditiocarbamato capaz de coordinar al metal. La marcación fue realizada mediante sustitución de ligandos, obteniéndose una única especie con pureza radioquímica superior al 90%, la que se mantuvo durante al menos 4 hs. La caracterización fisicoquímica y biológica muestra que el complejo  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitruro(GLU-DTC)<sub>2</sub> es un compuesto estable y altamente hidrofílico, aunque su unión a proteínas plasmáticas es mayor a la esperada, hecho que justificaría la alta actividad retenida en sangre y en hígado durante la evaluación biológica en ratones CD1 normales. Estos resultados indican que la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  de este derivado de glucosa produce una alteración significativa de su comportamiento biológico.

**Palabras clave:** Tecnecio-99m; Radiofármacos; Complejo  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitruro; Glucosa.

### Abstract

The preparation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled glucose derivatives is of great interest to evaluate the in vivo glucose uptake in nuclear oncology and cardiology. This paper presents the labelling of a glucose analogue (GLU-DTC) through the formation of a Tc(V)-nitride symmetrical complex. For this purpose, a dithiocarbamate group was incorporated to the biomolecule, in order to coordinate the metal. The labelling reaction was carried out by substitution yielding a single complex with radiochemical purity above 90%. This complex was stable for at least 4 hours. The physicochemical and biological characterization shows that the  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitride(GLU-DTC)<sub>2</sub> complex is a stable and highly hydrophilic compound, although its plasma protein binding is greater than expected, a fact which justifies the high activity retained in blood and liver during the biological evaluation in normal CD1 mice. These results indicate that  $^{99m}\text{Tc}$  labelling of this glucose derivate alters significantly its biological behaviour.

**Key words:** Tecnecio-99m; Radiofármacos; Complejo  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitruro; Glucosa.

## Introducción

La glucosa es una molécula clave en el metabolismo por tratarse de un nutriente utilizado por prácticamente todos los tejidos. Por este motivo, la evaluación del consumo regional de glucosa in vivo es clínicamente muy importante, ya que permite establecer la vitalidad de distintos órganos y el estado metabólico de un tejido. En el área oncológica, posibilita la obtención de imágenes de grupos de células con metabolismo glucídico anormalmente alto, siendo además un eficiente y rápido medio para establecer la respuesta a una terapia. En este sentido, la [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodesoxiglucosa (FDG) ha cobrado gran importancia en los últimos años en Medicina Nuclear mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET). Debido a la relevancia clínica de la FDG, contar con análogos de la glucosa marcados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es de

gran interés debido al menor costo tanto del radionucleido como del equipamiento necesario para los estudios utilizando un emisor gamma. Existen pocos antecedentes en la bibliografía relativos a la marcación con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de análogos de la glucosa<sup>1-4</sup> debido a la dificultad intrínseca que representa introducir un metal no fisiológico como el tecnecio en una biomolécula pequeña sin que se altere la actividad biológica. El método más comúnmente empleado, el llamado "pendant approach", consiste en añadir a la molécula biológica mediante síntesis una serie de grupos donadores de electrones capaces de coordinar al metal, la llamada unidad quelante. Esta unidad quelante se separa de la parte activa de la biomolécula mediante una cadena hidrocarbonada o espaciador, cuya longitud debe optimizarse para asegurar que la actividad biológica se mantenga (fig. 1).



Figura 1. Esquema del método pendant approach para la marcación de moléculas.

La rica química de coordinación del Tc ofrece variadas posibilidades en cuanto a estados de oxidación, "cores" y grupos donadores de electrones para diseñar dicha unidad quelante. Los complejos Tc(V) nitruro, inicialmente desarrollados por Baldas y colaboradores<sup>5</sup>, se caracterizan por la presencia de un triple enlace terminal tecnecio-nitrógeno que deja 4 posiciones de coordinación disponibles para la unión al ligando. Las mismas suelen llenarse mediante dos li-

gandos bidentados iguales o diferentes, dando lugar a complejos simétricos o asimétricos, respectivamente (fig. 2). Los complejos simétricos completan la esfera de coordinación del "core" con dos moléculas de un ligando bidentado, generalmente ditiocarbamatos, y han permitido el desarrollo de potenciales radiofármacos de perfusión cardíaca, en particular el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Bis (N-etoxi-N-etil-ditiocarbamato ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NOET)<sup>6</sup>. Este tipo de complejos han sido acoplados a moléculas

las de interés biológico, existiendo ejemplos promisorios en la literatura entre los que se destacan análogos de bombe-

sina<sup>7</sup>, ácidos grasos<sup>8</sup>, péptidos RGD<sup>9</sup> y agentes para la detección de receptores de benzodiazepinas<sup>10</sup>.

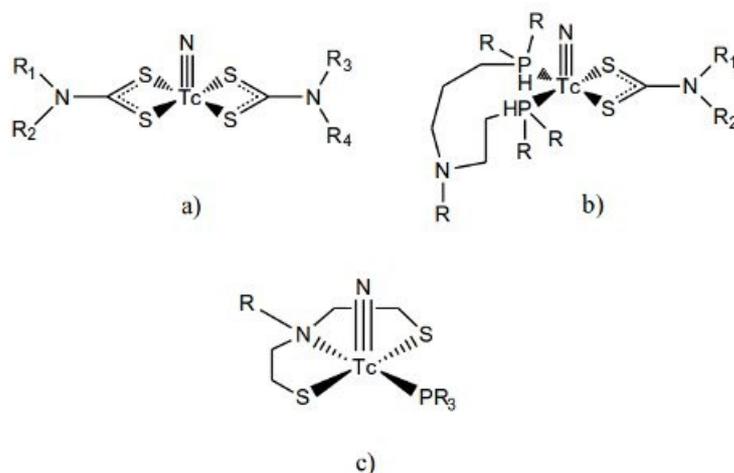


Figura 2. Complejos Tc(V)-nitruro. a) Complejo simétrico. b) Complejo asimétrico. c) Complejo asimétrico 3+1.

Este trabajo presenta la marcación de un derivado de glucosa ([4-(4,5-dihidroxi-6-hidroximetil-tetrahidropiran-3-iloxi)-butil]-ditiocarbamato de sodio o GLU-DTC) (Fig. 3) mediante la formación de un complejo Tc(V)-nitruro y los estu-

dios preliminares de su caracterización fisicoquímica y biológica. Dicho análogo presenta sobre el carbono-2 de la glucosa una cadena hidrocarbonada con un grupo ditiocarbamato, ligando bidentado capaz de formar este tipo de complejos.

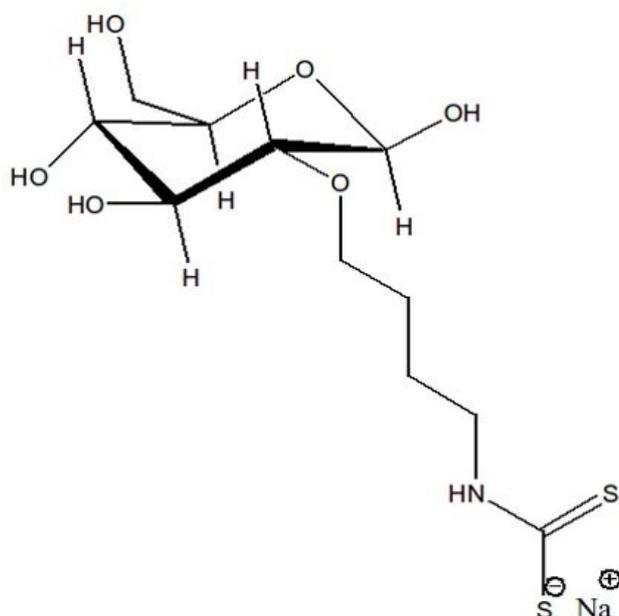


Figura 3. Estructura del ligando GLU-DTC.

## Materiales y métodos.

Marcación con  $^{99m}\text{Tc}$ . La marcación fue realizada mediante sustitución de ligandos, por agregado de  $^{99m}\text{Tc}$ -pertenecio (20-30 mCi, 1 mL) a un kit comercial (Cis Bio international) seguida de incubación con el ligando GLU-DTC (20-30 mg) durante una hora a temperatura ambiente. El kit contiene una formulación liofilizada de ácido 1,2-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético (5.0 mg), dihidracina succínica (5.0 mg), cloruro estano dihidratado (0.1 mg), fosfato de sodio dibásico heptahidratado (10.9 mg) y fosfato de sodio monobásico monohidratado (0.6 mg). El control de la pureza radioquímica de las especies  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitruro fue realizado mediante cromatografía en papel Whatman 1 y acetona como fase móvil, mientras que la pureza radioquímica del complejo final con el ligando GLU-DTC fue controlada mediante un sistema de HPLC de fase reversa acoplado a un detector gamma con cristal de NaI(Tl), utilizando una columna Waters C18 (Bondapack™ 125 Å, 10 µm, 3.9 x 300 mm) y un gradiente de fase móvil: (A) Ácido trifluoroacético 0.1% en agua y (B) Ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo a un flujo de 1.0 mL/min.

Lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. La lipofilicidad del complejo final con GLU-DTC en escala trazadora fue estudiada a pH 7.4, a través de la determinación del correspondiente coeficiente de partición octanol/buffer. Para ello, fueron mezclados 2 mL de octanol en un tubo de centrífuga con 2 mL de buffer fosfato 0.1M, pH 7.4. Se agregaron posteriormente 100 µL del complejo agitando mediante vórtex durante 2 minutos. La mezcla fue centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm y una vez separadas ambas fases, se midió la actividad en alícuotas de cada una de ellas en un contador de centelleo sólido de NaI(Tl) de 3"x 3".

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

Caracterización in vivo. Fueron realizados estudios de biodistribución sobre ratones CD1 normales utilizando un procedimiento previamente aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal. El complejo fue inyectado por vía intravenosa (0.1 mL, 10-15 µCi) y los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a 0.5, 1, 2 y 4 horas post-inyección (tres animales por tiempo). Durante la disección fueron extraídos los órganos de interés así como también muestras de sangre y orina, a los cuales se les determinó la actividad captada.

## Resultados

Marcación con  $^{99m}\text{Tc}$ . La marcación del ligando GLU-DTC por medio de la formación de complejos  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -nitruro fue realizada en 2 etapas: preparación de un intermediario y sustitución mediante el ligando de interés. La preparación del intermediario se realiza en medio acuoso empleando  $\text{SnCl}_2$  como reductor y dihidracina succínica como fuente de nitrógeno. El intermediario obtenido no es una especie única sino varias especies conteniendo el core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  (V) cuya estructura no ha sido establecida. La reducción completa del pertenecio para formar estas especies fue controlada mediante cromatografía en papel empleando acetona como fase móvil. En este

sistema, las especies reducidas presentan un Rf (factor de retardo) de 0 mientras que el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  remanente presenta un Rf de 1. Se exige una pureza radioquímica del intermediario superior al 90 % para proceder a la sustitución; la misma se logra por agregado del precursor e incubación a temperatura ambiente. La eficiencia de sustitución fue controlada por un sistema de HPLC de fase

reversa, el cual mostró la formación de una especie con un tiempo de retención de aproximadamente 10 minutos. Se observó, además, un pico menor con un tiempo de retención de aproximadamente 2 minutos, correspondiente a precursor nitrado sin reaccionar. En la fig. 4 se muestra un cromatograma gamma típico.

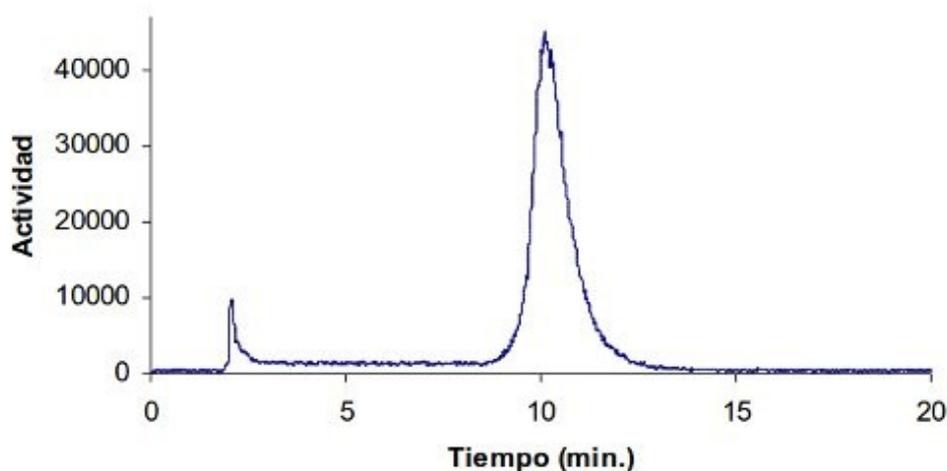


Figura 4. Cromatograma HPLC con detección gamma del marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  del ligando GLU-DTC.

El complejo de interés fue obtenido con pureza radioquímica variable (50-90%), requiriéndose una cantidad de ligando de al menos 30 mg para que la misma fuera superior al 90%. El complejo resultó ser estable durante al menos 4 horas post-marcación.

Lipofilicidad y unión a proteínas plasmáticas. La lipofilicidad expresada como el logaritmo del coeficiente de repartición octanol/agua resultó ser de -0.96, lo cual muestra su carácter altamente hidrofílico. En cuanto a su unión a proteínas plasmáticas, el valor obtenido por el método de exclusión molecular fue de 40%.

Caracterización in vivo. La biodistribución en ratones CD1 normales a 0.5, 1, 2 y 4 horas post-inyección mostró una actividad sanguínea y hepática relativamente elevadas (aproximadamente 8% y 12%, respectivamente) y depuración prácticamente nula en todo el período estudiado. La excreción fue intensa (59-67%) con actividades prácticamente equivalentes en sistema renal y hepatobiliar durante todo el período evaluado. En cuanto a la captación en el resto de los órganos, se puede decir que no resultó significativa, tal como lo muestra la tabla 1.

**Tabla 1. Datos de la biodistribución en ratones CD1 normales.**

| Órgano                | % Actividad Captada |              |             |             |
|-----------------------|---------------------|--------------|-------------|-------------|
|                       | 0.5 hs              | 1.0 hs.      | 2.0 hs.     | 4.0hs       |
| <b>Sangre</b>         | 8.0 ± 2.5           | 6.8 ± 2.9    | 6.4 ± 3.3   | 8.1 ± 1.4   |
| <b>Hígado</b>         | 15.5 ± 3.3          | 12.44 ± 0.57 | 9.3 ± 2.5   | 11.5 ± 1.2  |
| <b>Corazón</b>        | 0.16 ± 0.03         | 0.18 ± 0.09  | 0.18 ± 0.05 | 0.16 ± 0.04 |
| <b>Pulmón</b>         | 0.56 ± 0.23         | 0.45 ± 0.20  | 0.54 ± 0.26 | 0.62 ± 0.17 |
| <b>Bazo</b>           | 0.18 ± 0.09         | 0.12 ± 0.04  | 0.12 ± 0.09 | 0.14 ± 0.07 |
| <b>Riñón</b>          | 5.00 ± 0.80         | 4.54 ± 0.14  | 4.6 ± 2.0   | 5.01 ± 0.94 |
| <b>Tiroides</b>       | 0.08 ± 0.05         | 0.01 ± 0.00  | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 |
| <b>Músculo</b>        | 6.1 ± 2.7           | 3.91 ± 0.80  | 3.8 ± 1.7   | 4.44 ± 0.64 |
| <b>Hueso</b>          | 1.59 ± 0.61         | 1.25 ± 0.19  | 1.35 ± 0.44 | 1.74 ± 0.37 |
| <b>Cerebro</b>        | 0.08 ± 0.02         | 0.05 ± 0.02  | 0.04 ± 0.01 | 0.02 ± 0.01 |
| <b>Estómago</b>       | 1.05 ± 0.15         | 0.92 ± 0.53  | 1.18 ± 0.49 | 0.57 ± 0.10 |
| <b>Intestino</b>      | 26.1 ± 1.0          | 26.2 ± 7.4   | 27.7 ± 6.5  | 36.5 ± 2.4  |
| <b>Vejiga y orina</b> | 33.0 ± 7.4          | 34.6 ± 6.3   | 42.9 ± 2.9  | 28 ± 14     |

## Discusión

La evaluación del consumo regional de glucosa representa una herramienta fundamental en Medicina Nuclear para diagnóstico oncológico, ya que el metabolismo glucídico anormalmente elevado es una característica de muchos tumores. También presenta importantes aplicaciones en cardiología y neurología. La [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxiglucosa (FDG), análogo de la glucosa es el principal radiofármaco de uso clínico en el área mediante PET. Como ya se mencionó, es de gran interés para la comunidad científica poder desarrollar análogos de glucosa marcados con <sup>99m</sup>Tc debido a su menor costo y mayor accesibilidad. Si bien pocos avances se han conseguido al respecto, es particularmente interesante el estudio de Schibli et. al. [3], en el cual los autores realizan una evaluación ex-

austiva de la marcación de derivados de la glucosa con <sup>99m</sup>Tc mediante “pendent approach”. Si bien no lograron obtener una molécula marcada con propiedades análogas a la FDG, sí establecieron que la derivatización de la molécula en el carbono 2 del anillo de la glucosa da lugar, en algunos casos, a derivados que mantienen la propiedad de ser reconocidos por las hexoquinasas. En base a estos resultados, nuestro trabajo propuso la marcación de un análogo de glucosa que posee a nivel del carbono 2 una cadena alquílica en cuyo extremo se ubicó un grupo ditiocarbamato capaz de coordinar al tecnecio bajo forma de un nitruro complejo simétrico.

La marcación fue realizada con éxito, obteniéndose una única especie con pureza radioquímica superior al 90%, aunque fue requerida una alta cantidad

de ligando para lograr este valor. Dicha marcación ocurre mediante un proceso de sustitución de ligandos, en el cual el primer paso consiste en la preparación del grupo [ $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ ], mientras que la segunda etapa implica la formación del complejo final mediante el agregado del ligando. Aunque el precursor [ $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ ] no es una única especie química, sino una mezcla de especies intermediarias, las mismas dan lugar a un único producto final si el ligando utilizado posee los grupos donores de electrones adecuados. Para la síntesis del grupo [ $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ ] se utilizó una formulación liofilizada de Cis Biointernational que contiene dihidracina succínica, uno de los donadores de nitrógeno más ampliamente utilizados en la química de los complejos  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})$ -nitruro, ya que es soluble en medio acuoso y presenta baja toxicidad. El cloruro de estaño y la sal disódica del EDTA son los otros componentes de la fórmula; el primero de ellos actúa como reductor del metal mientras que el agente quelante es utilizado para prevenir la precipitación del exceso de  $\text{Sn}^{2+}$  u oxidación a  $\text{Sn}^{4+}$  una vez adicionado el ligando en la segunda etapa del proceso. El agregado del ligando GLU-DTC conduce a la formación de un complejo  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})$ -nitruro simétrico, en el que el grupo [ $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ ] está coordinado por dos ligandos bidentados idénticos. En la fig. 5 se muestra la estructura propuesta para el complejo  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{N}-(\text{GLU-DTC})_2$ .

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del complejo formado demuestran su alta estabilidad a lo largo del tiempo de evaluación y su carácter altamente hidrofílico. Sin embargo, los estudios biológicos indican que su unión a proteínas plasmáticas es mayor a la esperada, hecho que justificaría la alta actividad retenida en sangre e hígado.

Como conclusión, el complejo  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})$ -nitruro- $(\text{GLU-DTC})_2$  fue obteni-

do con éxito; es un complejo estable y altamente hidrofílico, aunque su comportamiento biológico no resultó el esperado. La elevada unión a proteínas plasmáticas junto con la alta actividad sanguínea y hepática y la depuración casi nula de estos órganos indican que la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  de este derivado de glucosa produce una alteración significativa de su comportamiento biológico.

## Agradecimientos

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Proyecto FCE\_140) y por Pedeciba-Química. Se agradece la colaboración del Dr. R. Alberto, Universidad de Zurich, Dr. A. Duatti, Universidad de Ferrara, y Dr. R. Pasqualini, Cis Bio International.

## Referencias

1. Petrig J, Schibli R, Dumas C, Alberto R, Schubiger PA. Derivatization of glucose and 2-deoxyglucose for transition metal complexation: substitution reactions with organometallic  $^{99m}\text{Tc}$  and Re precursors and fundamental NMR investigations. *Chemistry* 2001;7:1868-73.
2. Kim EE, Podoloff DA. Imaging with  $^{99m}\text{Tc}$  ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. *RadioLOGY* 2003;226:465-73
3. Schibli R, Dumas C, Petrig J, Spadola L, Scapozza L, Garcia-Garayoa E, Schubiger PA. Synthesis and in vitro characterization of organometallic rhenium and technetium glucose complexes against Glut 1 and hexokinase. *Bioconjugate Chem* 2005;16:105-12.
4. Yang DJ, Kim CG, Schechter NR, Azhdarinia A, Yu DF, Oh CS, et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -

- labeled 1-thio-b-D-glucose as a new tumor-seeking agent: Synthesis and tumor cell uptake assay. *Applied Radiation and Isotopes* 2006;64:207-15.
5. Baldas J, Bonnyman J. Substitution reactions of  $^{99m}\text{TcNCl}_4^-$  a new route to a new class of  $^{99m}\text{Tc}$ -radiopharmaceuticals. *Int J Appl Radiat Isot* 1985;36:133-39.
  6. Pasqualini R, Duatti A, Bellande E, Comazzi V, Brucato V, Hoffschir D, et. al. BisDithiocarbamate Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: A Class of Neutral Myocardial Imaging Agents. *J Nucl Med* 1994;35:334-41.
  7. Faintuch BL, Teodoro R, Duatti A., Muramoto E, Faintuch S, Smith CJ. Radiolabelled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis:preclinical studies. *Nucl Med Biol* 2008;35:401-11.
  8. Cazzole E, Benini E, Pasquali M, Mirtschink P, Walther M, Pietzsch HJ, et. al. Labelling of fatty acid ligands with the strong electrophilic metal fragment  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$  (PNP: diphosphane ligand). *Bioconjugate Chem* 2008;19:450-60.
  9. Decristoforo C, Santos I, Pietzsch HJ, Kuenstler JU, Duatti A, Smith CJ, et. al. Comparison of in vitro and in vivo properties of  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{RGD}$  peptides labelled using different novel Tc-cores. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007;51:33-41.
  10. Boschi A, Ucelli L, Duatti A, Bolzati C, Refosco C, Tisato F, et al. Asymmetrical Nitrido Tc-99m Heterocomplexes as Potential Imaging Agents for Benzodiazepine Receptors. *Bioconjugate Chem* 2003;14:1279-88.