



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Departament de Química

**Nous compostos de tecneci-99m i reni per  
aplicacions en radiofarmàcia mitjançant la  
reacció de transmetal·lació [2+1]**

---

**Jordi Borràs Amoraga**

**Tesi Doctoral 2018**

**Directors:**

**Dr. Joan Suades Ortuño**

**Dr. Ramon Barnadas Rodríguez**

**Programa de Doctorat en Química**



**PROGRAMA DE DOCTORAT:**

Química

**Nous compostos de tecneci-99m i reni per aplicacions en radiofarmàcia mitjançant la reacció de transmetal·lació [2+1]**

Memòria presentada per Jordi Borràs Amoraga per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Jordi Borràs Amoraga

La present Tesi Doctoral ha estat realitzada a la Unitat de Química Inorgànica, en el Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Joan Suades Ortuño i el Dr. Ramon Barnadas Rodríguez, els quals autoritzen la seva presentació.

Dr. Joan Suades Ortuño

Dr. Ramon Barnadas Rodríguez





## ABSTRACT

This thesis can be seen as a continuation of a previous work in our research group based on the development of a transmetallation reaction for the preparation of second generation radiopharmaceuticals. Briefly, the low solubility of the bioconjugated zinc complex allows the straightforward radiolabeling of *fac*- $\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  core. This approach can lead to potential radiopharmaceuticals with high specific activity.

In this work, two new rhenium complexes have been synthesized by means of a reported zinc complexes derivatized with glucosamine and piperazine. Two  $\pi$ -acceptors ligands, triphenylphosphine trisulfonate and *tert*-butyl isocyanide, have been used to improve the features of the potential radiotracer, and, at the same time, the use of this ligands will test the versatility of the [2+1] transmetallation reaction.

On the other hand, since in the last few years folic acid has awakened interest as a biovector, two new zinc complexes bioconjugated with folic acid have been synthesized to be used in the transmetallation reaction. Afterwards, the corresponding rhenium complexes have been synthesized as a model for the final technetium-99m homologue.

The proper obtention of the bioconjugated rhenium complexes has paved the way to perform the radiosynthesis with technetium-99m. After some optimizations, we are able to affirm that the [2+1] transmetallation reaction is a very convenient reaction to bioconjugate *fac*- $\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  because of its simplicity from an experimental point of view. Moreover, the radiotracers bioconjugated with glucosamine and folic acid derivatives have been studied *in vivo* and *in vitro*. These studies have shown a clear biological activity for each potential radiopharmaceuticals.

Finally, a lipophilic zinc complex has been synthesized and characterized to apply the above-mentioned reaction for liposome radiolabeling. Despite this product is not anchored in the phospholipid bilayer, the corresponding rhenium and technetium-99m products show an amphiphilic behavior. Thus, since amphiphilic molecules can interact with phospholipids, in this work is shown how the [2+1] transmetallation reaction can be useful for liposome radiolabeling.



# INDEX

I. ABBREVIATIONS.....	i
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Nuclear medicine.....	1
1.1.1. Nuclear medicine for diagnosis.....	2
1.1.2. Nuclear medicine for therapy.....	4
1.1.3. Radiopharmaceuticals.....	6
1.1.3.1. First generation radiopharmaceuticals.....	6
1.1.3.2. Second generation radiopharmaceuticals.....	7
1.1.3.3. Third generation radiopharmaceuticals.....	8
1.1.4. Technetium.....	8
1.1.5. Cold rhenium.....	12
1.1.6. Previous work in the research group.....	13
1.2. Liposomes.....	17
1.2.1. Liposomes classification.....	18
1.2.2. Liposomes labelling strategies.....	19
1.2.3. Metallosurfactant.....	21
1.2.4. Liposomes in nuclear medicine.....	22
2. OBJECTIVES.....	23
3. COMPLEXOS DE ZINC I RENI BIOCONJUGATS PER A APLICACIONS EN RADIOFARMÀCIA.....	27
3.1. Síntesi del complex Re(DtGlu)TPPTS.....	28
3.2. Síntesi del complex Re(DtPip)ISO.....	34
3.3. Complexos de zinc i reni derivatitzats amb l'àcid fòlic.....	37
3.3.1. Funcionalització de l'àcid fòlic.....	38
3.3.2. Síntesi dels complexos de Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh).....	41
3.3.3. Síntesi dels complexos de Re(DtFolEh)TPPTS i Re(DtFolAq)TPPTS.....	44
3.3.4. Reacció de transmetal·lació en pseudocondicions de radiofarmàcia..	48
4. ESTUDIS AMB TECNECI-99m.....	51
4.1. Estudis de solubilitat dels compostos de zinc.....	51

4.2. Compostos de tecneci-99m .....	52
4.2.1. Síntesi de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .....	53
4.2.2. Procediment general per la síntesi de complexos de Tc-99m .....	54
4.3. Estabilitat dels radiocompostos.....	58
4.3.1. Estabilitat del sistema <i>fac</i> - $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ en cisteïna .....	59
4.3.2. Estabilitat dels compostos de Tc-99m en sèrum de ratolí.....	60
4.4. Experiments <i>in vivo</i> .....	62
4.4.1. Assajos d'unió cel·lular del complex $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ .....	64
4.4.2. Assajos d'unió cel·lular dels complexos $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ i $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ .....	66
4.5. Estudis <i>in vivo</i> .....	68
4.5.1. Biodistribució <i>cut and count</i> .....	72
4.5.2. Imatges nanoSPECT/CT .....	73
4.5.2.1. Biodistribució de $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ .....	74
4.5.2.2. Biodistribució de $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ i $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ ...	76
5. TRANSMETAL·LACIÓ [2+1] PER MARCATGE DE LIPOSOMES .....	81
5.1. Obtenció del precursor lipofílic de zinc .....	82
5.1.1. Síntesi Boc-HP .....	83
5.1.2. Síntesi $\text{NH}_2$ -HP .....	87
5.1.3. Síntesi $\text{Zn}(\text{DtHP})$ .....	88
5.2. Síntesi de $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ .....	91
5.3. Estudis dels complexos en liposomes .....	93
5.3.1. Estudis d'agregació de $\text{Zn}(\text{DtHP})$ pur i en vesícules de SPC .....	96
5.3.1.1. Estudis d'autoagregació del $\text{Zn}(\text{DtHP})$ .....	96
5.3.1.2. Estudis de formació de vesícules mixtes a partir de films homogenis $\text{Zn}(\text{DtHP})\text{:SPC}$ .....	97
5.3.2. Estudis d'agregació de $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ pur i en vesícules de SPC .....	99
5.3.2.1. Autoagregació de $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ .....	100
5.3.2.2. Estudis de formació de vesícules mixtes a partir de films homogenis $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}\text{:SPC}$ .....	101
5.3.2.3. Quantificació de la encapsulació de $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ en vesícules de SPC.....	105
5.3.2.4. Estudis d'incorporació de $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ en vesícules preformades de SPC .....	108
5.3.2.5. Mesures d'estabilitat dels liposomes en el temps .....	110
5.3.2.6. Reacció de transmetal·lació en condicions de pseudoradiofarmàcia.....	111
5.3.3. Reacció de transmetal·lació [2+1] amb $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .....	114

6. CONCLUSIONS.....	119
7. MATERIALS AND METHODS.....	123
7.1. Instrumentation .....	123
7.1.1. Spectroscopy .....	123
7.1.1.1. Nuclear magnetic resonance .....	123
7.1.1.2. Infrared spectra.....	123
7.1.1.3. Ultraviolet-Visible spectra .....	124
7.1.1.4. Dynamic light scattering .....	124
7.1.2. Spectrometry.....	125
7.1.2.1. High resolution mass spectrometry.....	125
7.1.2.2. Coupled plasma emission spectroscopy .....	125
7.1.3. Elemental analysis .....	125
7.1.4. Reverse phase high pressure resolution chromatography (RP-HPLC).....	126
7.1.5. Gamma Counter .....	128
7.1.6. NanoSPECT/CT.....	128
7.1.7. Transmission electron cryomicroscopy.....	129
7.2. Synthesis and characterization .....	129
7.2.1. Synthesis of bioconjugated rhenium compounds .....	129
7.2.1.1. Synthesis of Re(DtGlu)TPPTS .....	129
7.2.1.2. Synthesis of Re(DtPip)ISO .....	130
7.2.1.3. Synthesis of folic derivatives.....	131
7.2.1.3.1. Organic synthesis.....	131
7.2.1.3.2. Zinc complexes with folic derivatives.....	135
7.2.1.3.3. Rhenium complexes with folic derivatives.....	136
7.2.1.3.4. Synthesis of Re(DtFolAq)TPPTS in pseudoradiopharmaceutical conditions .....	138
7.2.2. Synthesis of bioconjugated technetium-99m compounds.....	138
7.2.2.1. Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .....	138
7.2.2.2. Preparation of Tc-99m complexes by transmetallation reaction with Zn derivatives .....	139
7.2.3. Synthesis of Zn, Re and $^{99m}\text{Tc}$ compounds for liposome radiolabelling.....	139
7.2.3.1. Organic synthesis .....	139
7.2.3.2. Synthesis of Zn(DtHP) .....	142
7.2.3.3. Synthesis of Re(DtHP)TPPTS .....	143

7.2.3.4. Attempt of Re(DtHP)TPPTS synthesis in aqueous solution with SPC liposomes .....	144
7.2.3.5. Synthesis of <sup>99m</sup> Tc(DtHP)TPPTS .....	144
7.3. <i>In vitro</i> studies .....	145
7.3.1. Cysteine stability study.....	145
7.3.2. Serum stability study .....	145
7.3.3. Cell culture.....	146
7.3.4. Cell binding assay .....	147
7.4. <i>In vivo</i> studies.....	149
7.4.1. Preparation of mice tumour models.....	149
7.4.2. Biodistribution studies .....	150
7.4.3. Cut and count .....	150
7.5. Aggregation studies.....	150
7.5.1. Aggregates preparation.....	150
7.5.2. Preparation of liposomes from a mixture of homogeneous film .....	151
7.5.3. Preparation of liposomes by incorporation of MT to preformed liposomes of SPC.....	152
7.5.4. Size exclusion chromatography.....	153
7.5.5. Mechanical extrusion of the liposomes .....	153
7.5.6. Liposomes solubilisation .....	154
8. REFERENCES.....	155
9. SUPPORT INFORMATION.....	161

# I. Abbreviations

Abs	Absorbance
ACN	Acetonitrile
Ala	$\beta$ -alanine
Aq	Alkyl
ATR	Attenuated total reflection
BFCA	Bifunctional chelator approach
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl protecting group
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
BSA	Bovine serum albumine
<i>cryo</i> -TEM	Transmission electron cryomicroscopy
CT	Computed Tomography
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Dt	Dithiocarbamate
Eh	Ethoxy
EPR	Enhanced permeability and retention effect
ESI	Electrospray ionization
[ <sup>18</sup> F]FDG	2-deoxy-2-( <sup>18</sup> F)fluoro-D-glucose
Fol	Folic
FR	Folate Receptor
Glu	Glucosamine
Gly	Glycine
GUV	Giant Unilamellar Vesicles



Hex	Hexanoic
HP	Hexa Palmitoyl
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HRMS	High-resolution mass spectrometry
ICP-OES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
ID	Injected Dose
IR	Infrared Spectroscopy
ISO	<i>tert</i> -butyl isocyanide
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MAG <sub>3</sub>	Mercaptoacetyl triglycine
MeOH	Methanol
MLV	Multilamellar Vesicles
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MT/MTs	Metallosurfactan/s
MVV	Multivesicular Vesicles
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OTf	Triflate
OVV	Oligovesicular Vesicles
PA	Palmitoyl Amine
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PET	Positron Emission Tomography
Pip	1-(2-Methoxyphenyl)piperazine
PMX	Pemetrexed
RP-HPLC	Reverse Phase High-Pressure Liquid Chromatography
SPC	Soybean Phosphatidylcholine
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography

Succ	Succinimidyl
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TEAP	Triethylammonium Phosphate Solution
TFA	Trifluoroacetic Acid
THF	Tetrahydrofuran
TPPTS	Triphenylphosphine Trisulfonate
UA	arbitrary units
UV-Vis	Ultraviolet–visible spectroscopy



# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Nuclear Medicine

Nuclear medicine is defined as the medicine speciality which uses radioactive material for medical research, diagnosis or treatment purposes. However, it should be highlighted that the use of sealed radiations, like radiotherapy, is not included in this medical discipline because the mechanisms of action and even the goal is substantially different between both specialities<sup>[1]</sup>. According to the definition, nuclear medicine takes advantage of the energy emitted by a radiocompound (radiopharmaceutical) to provide useful information about function, metabolism or morphology of a certain tissue or organ of the patient. The application of radiopharmaceuticals is not only devoted for diagnosis, during the last few years they have also been used for therapeutic purposes (*e.g.* tumour treatment).

From a historical perspective, it is considered that nuclear medicine was born just after the creation of the first cyclotron by Ernest Orlando Lawrence (Nobel Prize in physics in 1939). In 1936, his brother John Lawrence, who was a doctor interested in the study of hematology, took advantage of his brother's cyclotron becoming the first person to treat a disease with radioactivity using the phosphorus-32 radioisotope for leukemia<sup>[2]</sup>. However, probably the most famous case in the beginnings of nuclear medicine was the treatment of thyroid abnormalities with iodine-128 and iodine-131<sup>[3]</sup>. The following important advance in this field was the discovery of gamma-cameras in the at 1950's<sup>[4]</sup> which provided the first images (tomography) in nuclear imaging.

### 1.1.1. Nuclear medicine for diagnosis

After the discovery of gamma cameras and the increasing number of advances in the methods for obtaining radioisotopes, nuclear imaging was rapidly widespread in hospitals. Therefore, the demand of new radiopharmaceuticals also increased due to their important advantages. Apart from being a non-invasive technique that provides 3D images, it is the unique diagnosis technology capable to detect biochemical and physiological abnormalities before the appearance of anatomical changes in the organism <sup>[5]</sup>. In addition, the introduction of new radiopharmaceuticals is favoured because they are used in such low concentrations that they do not cause undesirable side effects related with chemical toxicity<sup>[6,7]</sup>.

Basically, there are two main different techniques for diagnosis in nuclear medicine: SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) and PET (Positron Emission Tomography). The main difference between both techniques relies on how the gamma photon is generated. For SPECT, the first step is the excitation of the nucleus to an unstable configuration which can take place through different processes such as electron capture or with the decay of an atom from a metastable state. In order to be stabilized, the nucleus is relaxed releasing a gamma photon. In contrast, the PET technique uses positron-emitting radionuclides, which are unstable because they contain too many protons in the nucleolus, as a consequence, they are stabilised by the emission of a positron ( $\beta^+$ ) which collides with a nearby electron giving rise to a process called annihilation. After this event, two equal gamma photons with opposite directions are emitted following Einstein's energy conservation law ( $E=mc^2$ ) and the conservation of linear momentum.

For diagnosis applications, only those radioisotopes with gamma photon decay are useful because the emitted photons are energetic enough to escape from the body of the patient in order to reach the detector. Finally, after computer calculations, a 3D image where the radiocompound has been accumulated is depicted. Nowadays, new SPECT and PET machines are combined with other technologies such as computed tomography (CT) or nuclear magnetic resonance (MRI). The combination of

technologies is very powerful for the diagnosis<sup>[8]</sup> because, while CT and MRI can provide better morphological information, SPECT and PET can supply valuable information about the biochemical processes *in vivo* as the metabolism of the tumor.



**Figure 1.** Image of a SPECT scan machine.

If we compare PET and SPECT scans, both techniques have strengths and weaknesses. Although nowadays SPECT is the most frequently used technique in hospitals, it is difficult to know which technology will dominate the future. Even though PET can reach better spatial resolutions, in general SPECT isotopes are easier to produce and their half-life is much longer than PET radioisotopes. This fact makes it easier to work with them in hospitals and get the image from medical diagnosis. Another reason in favor to SPECT is that different radioisotopes can be used simultaneously in the scan (multiplexing analysis). Since each radioisotope for SPECT radioisotope has its own characteristic energy, the detectors can distinguish between the distribution of each radiopharmaceutical in the final image, knowing the properties of each radiotracer, and this technique can provide valuable information<sup>[9]</sup>.

Short Half-Life		PET Isotopes																		SPECT Isotopes																		Long Half-Life															
1 H Hydrogen																																						2 He Helium															
3 Li Lithium	4 Be Beryllium																																					5 B Boron	6 C Carbon	7 N Nitrogen	8 O Oxygen	9 F Fluorine	10 Ne Neon										
11 Na Sodium	12 Mg Magnesium																																					13 Al Aluminum	14 Si Silicon	15 P Phosphorus	16 S Sulfur	17 Cl Chlorine	18 Ar Argon										
19 K Potassium	20 Ca Calcium																																					21 Sc Scandium	22 Ti Titanium	23 V Vanadium	24 Cr Chromium	25 Mn Manganese	26 Fe Iron	27 Co Cobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Copper	30 Zn Zinc	31 Ga Gallium	32 Ge Germanium	33 As Arsenic	34 Se Selenium	35 Br Bromine	36 Kr Krypton
37 Rb Rubidium	38 Sr Strontium																																					39 Y Yttrium	40 Zr Zirconium	41 Nb Niobium	42 Mo Molybdenum	43 Tc Technetium	44 Ru Ruthenium	45 Rh Rhodium	46 Pd Palladium	47 Ag Silver	48 Cd Cadmium	49 In Indium	50 Sn Tin	51 Sb Antimony	52 Te Tellurium	53 I Iodine	54 Xe Xenon
55 Cs Cesium	56 Ba Barium	57-70 Lanthanides	71 Lu* Lutetium	72 Hf Hafnium	73 Ta Tantalum	74 W Tungsten	75 Re* Rhenium	76 Os Osmium	77 Ir Iridium	78 Pt Platinum	79 Au Gold	80 Hg Mercury	81 Tl Thallium	82 Pb Lead	83 Bi Bismuth	84 Po Polonium	85 At Astatine	86 Rn Radon																																			
87 Fr Francium	88 Ra Radium	89-102 Actinides	103 Lr Lawrencium	104 Rf Rutherfordium	105 Db Dubnium	106 Sg Seaborgium	107 Bh Bohrium	108 Hs Hassium	109 Mt Meitnerium	110 Ds Darmstadtium	111 Rg Roentgenium	112 Cn Copernicium	113 Uut Ununtrium	114 Fl Flerovium	115 Uup Ununpentium	116 Lv Livermorium	117 Uus Ununseptium	118 Uuo Ununoctium																																			

#E Element Denotes an element with isotopes suitable for both PET and SPECT  
 #E Element Denotes an element with multiple isotopes with different physical half-lives

Figure 2. Periodic table of the most used elements in nuclear diagnosis<sup>[9]</sup>.

### 1.1.2. Nuclear medicine for therapy

As previously explained, radiopharmaceuticals can be also employed for tumor treatment. Although currently the use of radiotracers in medicine is mainly devoted to diagnosis, this fact can change according to the following plot from MEDraysintell<sup>[10]</sup>, which predicts that in less than 10 years the sales of radiopharmaceuticals for therapy could be higher than those for diagnosis.

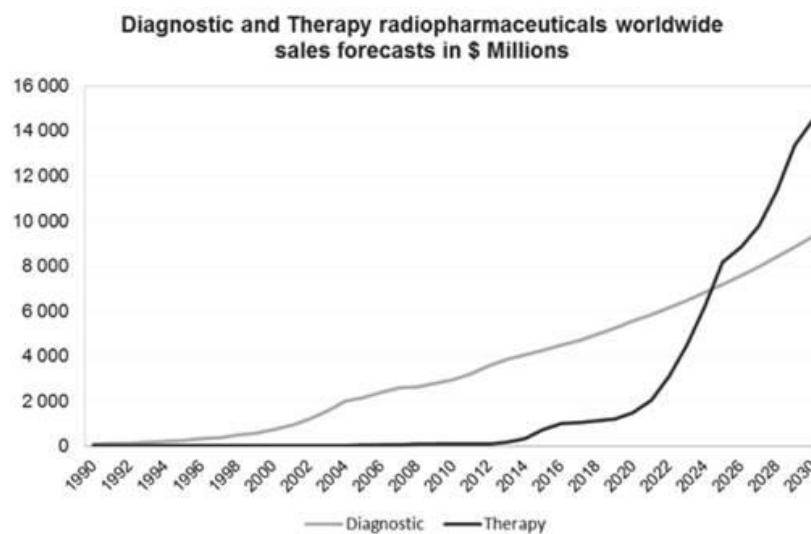


Figure 3. Plot of the sales forecast of diagnosis and therapy radiopharmaceuticals.

If the radiotracer is target specific enough, the main advantage of using radiopharmaceuticals for that purpose is that collateral effects caused by the radiation can be much lower than using an external beam (radiotherapy), because, for sealed radiations the beam has to penetrate through healthy tissues in order to reach the tumor, while the ideal radiopharmaceutical would be retained only in the target tumor, and consequently, it will exclusively irradiate the malignant cells.

In order to minimize the undesirable damage of healthy tissues, the radionuclide should release a low penetrance radiation such as alpha, beta particles or Auger electrons. The damage of the tissues is promoted for the generation of reactive oxygen species (ROS), which are produced after the water radiolysis, and direct DNA damage caused by the particles. It is considered that the ROS effect is responsible for the 70 % of the total damage while direct DNA damage is around 30 %<sup>[11]</sup>.

Nowadays, many new advances in nuclear medicine are based on a concept called theranostics which was first introduced by Funkhouser *et al* in 2002<sup>[12]</sup>, despite the strategy already being used many years ago. In nuclear medicine, theranostics is the combination of a diagnostic and therapy radioisotope in the same single radiopharmaceutical or using a combination of two radiopharmaceuticals with similar radiopharmaceutical properties (theranostic pairs). Since the biodistribution of the therapeutic and the diagnosis agent is the same, it allows to nuclear medicine doctors to know where the therapeutic compound has been accumulated by means of a SPECT/PET scan. Thus, the visualization provides essential information which it makes possible to evaluate how specific the radiopharmaceutical for the treatment towards the tumor is (efficiency). For this reason, theranostics radiopharmaceuticals are getting more studied for the popular personalized medicine concept which is believed to be very important in the future for cancer treatment<sup>[13]</sup>.

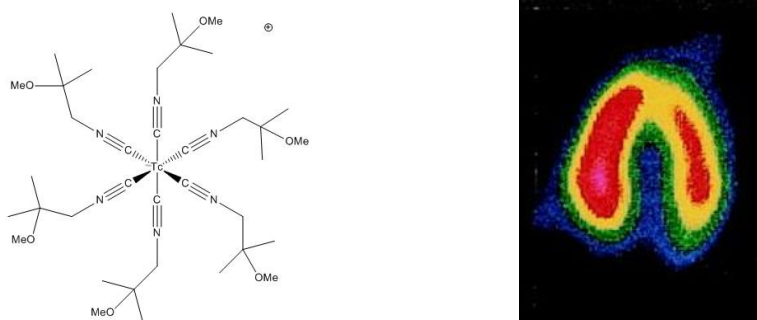


### 1.1.3. Radiopharmaceuticals

To perform and develop a suitable potential radiopharmaceutical many things should be taken into account. Most of the radioisotopes useful for nuclear medicine have a short half-life, and because of this short-time limitation the radiosynthesis should be fast, easy to carry out and they should be obtained with high radiochemical yield ( $\geq 95\%$ ). In addition, for those compounds which use derivatized biomolecules (this concept will be explained in the next sections as “Second generation radiopharmaceuticals”), the synthesis must be performed under high-specific activity conditions. In other words, the ratio between *unlabeled ligands* and *radiolabeled molecules* should be as low as possible, otherwise, a high concentration of unlabeled ligand would saturate the receptor making it difficult for the radiotracer to bind the target. Another important aspect is the incorporation of the radioisotope in the molecule, because the covalent binding could alter the properties of the free ligand changing the binding affinity with the receptor<sup>[5]</sup>.

#### 1.1.3.1. First generation radiopharmaceuticals

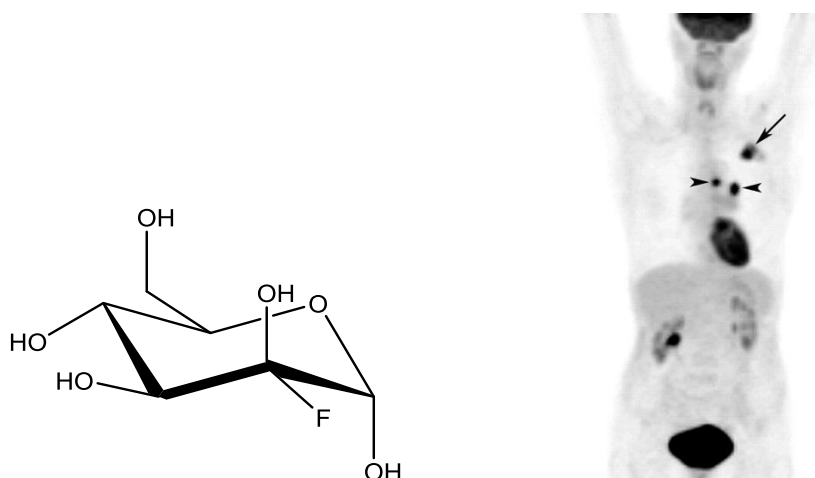
First generation radiopharmaceuticals, or essential radiopharmaceuticals, are the simplest ones from chemical point of view. The compound is specifically retained to the target tissue due to the inherent properties of the whole compounds such as: overall charge, lipophilicity or size. Despite their simplicity, nowadays, one of these radiopharmaceuticals is the most widespread radiocomplexes for radiodiagnosis, it is  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi (Cardiolite<sup>®</sup>), which is used as a myocardial perfusion radiotracer<sup>[14]</sup>. In fact, it was the first organometallic compound used in nuclear medicine<sup>[15]</sup>. As an essential radiopharmaceutical, the Cardiolite<sup>®</sup> activity is not related with targeting functions, on the contrary, the accumulation of the radiocomplex is due to the diffusion mechanism and the electrostatic binding caused by the high membrane potential of the mitochondrial<sup>[16]</sup>.



**Figure 4.** Left to right,  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi molecule and heart perfusion scan obtained with Cardiolite®.

### 1.1.3.2. Second generation radiopharmaceuticals

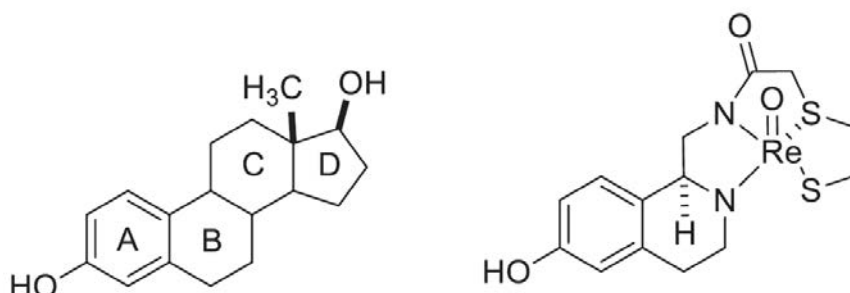
Second generation radiopharmaceuticals, or target-specific radiopharmaceuticals, are those compounds which interact directly with a certain receptor of a cell. To achieve that purpose, the radiotracer contains a biomolecule which presents high affinity towards the target receptor. Among this type of radiotracer, one of the most used for tumor diagnosis is the molecule  $^{18}\text{F}$ FDG, which is an analogue of glucose with an hydroxyl group substituted by a  $^{18}\text{F}$  atom. Since tumor cells have a higher glucose uptake than the healthy cells, this fact promotes the accumulation of  $^{18}\text{F}$ FDG in the cell. In addition, unlike glucose, when FDG is phosphorylated, it is not further metabolized by glycolytic pathway and remains in the cell<sup>[17]</sup>, which increases the activity in cancer cells.



**Figure 5.**  $^{18}\text{F}$ FDG molecule and PET scan of a patient with a lung tumor (arrows).

### 1.1.3.3. Third generation radiopharmaceuticals

The last type of classification of radiopharmaceuticals integrates the radioisotope on the biovector, which means that the whole radiotracer is structurally similar to a biomolecule, mostly hormones. See **Figure 6** which shows a molecule with a rhenium atom incorporated in the carbon skeleton imitating the structure of the estradiol. An advantage of using third generation of radiopharmaceuticals is that the problems with high specific activity are almost solved, since the radiotracer does not have structural similarities with the biologically active molecule until the metal is bonded by the ligand, therefore, the free ligand is not biological active and will not compete with the radiotracer<sup>[18]</sup>.



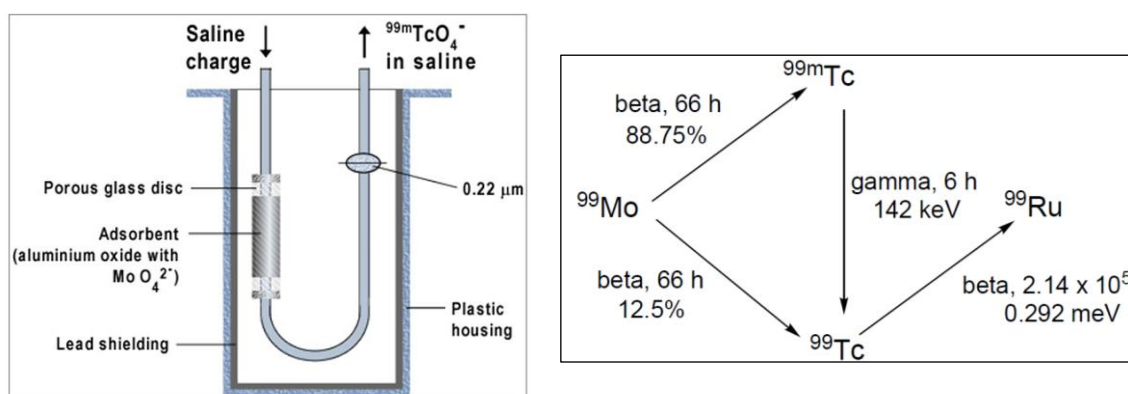
**Figure 6.** Estradiol molecule (left) and rhenium structural homologue (right).

### 1.1.4. Technetium

The element technetium, which is used for SPECT scans, is synonym of nuclear imaging because it is the most used radioisotope due to of its near ideal chemical and nuclear properties. In fact, 90% of the procedures for diagnosis in nuclear medicine use technetium as a radioisotope<sup>[19]</sup>. The 6,01 hours of half-life of <sup>99m</sup>Tc makes this isotope very appropriate for diagnosis because this time is long enough to perform the radiosynthesis, radiopharmaceutical administration and image acquisition. Furthermore, this time is short enough to minimize the overexposure of the patient<sup>[20]</sup>. Finally, the energy of the gamma photons is around 143 KeV which is in the range of

what is considered optimal energy for the gamma cameras of the SPECT scans (126-154 KeV<sup>[21]</sup>).

From a chemical perspective, technetium belongs to group 7 which is also composed by manganese and rhenium. As many transition metals, elements from group 7 present a versatile coordination chemistry, they have a wide number of oxidation states, coordination numbers and many stable core structures with different donor atoms. Although technetium prefers to bind soft elements like sulphur rather than hard donor atoms, many structures with nitrogen and oxygen donors can be found in the literature<sup>[22,23]</sup>. Regarding the advantages to use metals as radiotracers compared with non-metals like fluoride or carbon, it is important to highlight that metals are more flexible from a chemistry point of view, because they permit a rapid and mild radiosynthesis by means of chelating systems, which can give to a large number of possible structures. The use of Tc-99m in hospitals was also promoted by the appearance of technetium-99m generators which makes the preparation of the radioisotope from <sup>99</sup>Mo very easy.

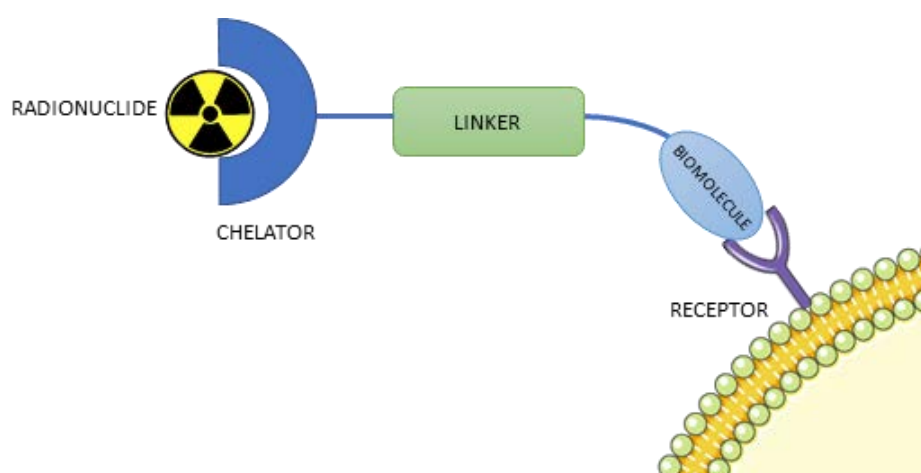


**Figure 7.** On the left representation of <sup>99m</sup>Tc generator. On the right, a diagram of <sup>99</sup>Mo and <sup>99m</sup>Tc decay.

The generator is composed of molybdate ( $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$ ) adsorbed in an ionic exchange column of alumina, which after the radioactive decay process becomes pertechnetate ( $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ ). Since  $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$  has one electric charge less than  $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$ , the affinity of pertechnetate with alumina is lower than molybdate, consequently,  $[\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$  can be easily eluted with a saline solution while  $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$

remains in the column. At the end of the process,  $[\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$  is obtained with a typical concentration around  $10^{-7}$  to  $10^{-8}$  M<sup>[24]</sup>.

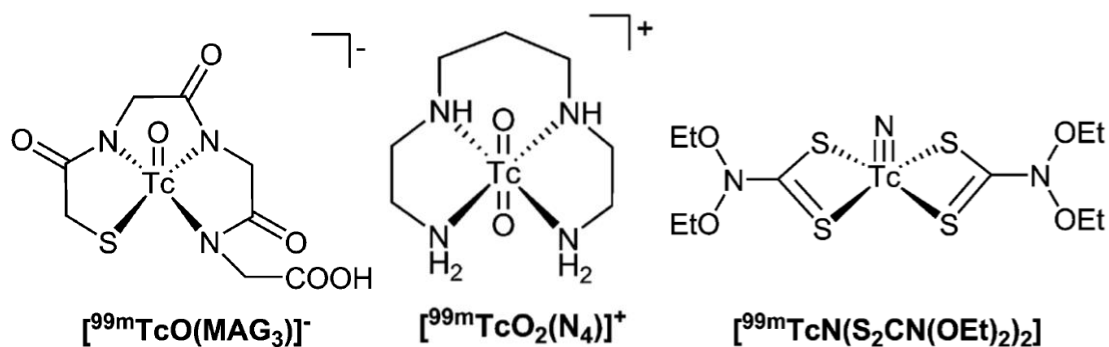
Although  $[\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$  is directly available from the  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator, only few examples with an oxidation state of the metal +7 can be found in the literature, among them, probably  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sulfur-colloid ( $\text{Tc}_2\text{S}_7$ )<sup>[25]</sup>, which is useful for liver scanning, has been one of the most studied. The need of convenient methods to functionalize technetium from pertechnetate with reducing agents or direct reduction of the metal have been widely studied in the last few decades, most of them are focused on taking advantage of its versatility in coordination chemistry. Among the best strategies is the conjugation of the metal to a biomolecule vector such as antibody, peptide, etc. by means of a method called bifunctional chelator approach (BFCA). The system is composed of three main parts; a chelator functional group, a biomolecule in the other side of the structure and a linker between them. The use of chelators systems with transition metals like technetium usually gives rise to reactions with good radioyields (>95%)<sup>[15]</sup>, short times and soft conditions. However, it must be careful with the bulkiness of the BFCA in order not to decrease the specific activity of the radiopharmaceutical or to affect the binding affinity between the biomolecule and the receptor.



**Scheme 1.** Simple diagram of a general BFCA system.

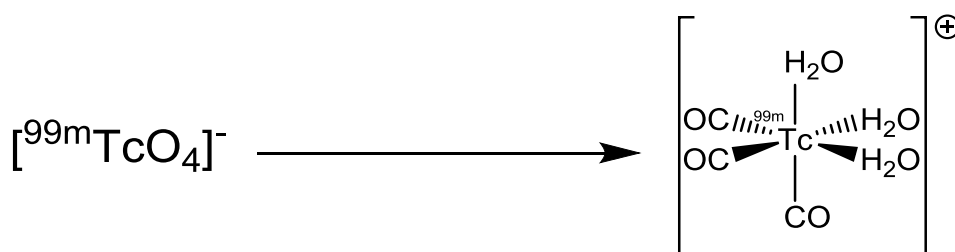
The need to discover easy reactions and stable technetium cores from pertechnetate has been very challenging in the radiochemistry of technetium. One of

the most studied cores was  $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$  incorporated in a tetradentate bifunctional chelator system, usually mercaptoacetyl triglycine ( $\text{MAG}_3$ ), which contains a carboxylic group available for coupling reactions for the bioconjugation. There are a lot of different chelators agents currently used for this purpose composed of chelators that contain two, three or five atom donors which can be applied also for other cores such as  $[\text{TcO}_2]^+$  or  $[\text{TcN}]^{2+}$ [26].



**Figure 8.** Examples of chelators systems useful for Tc-99m with different number of chelator members.

A part from the previously explained cores, during the last decade many research groups have been focusing their attention on  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl (*fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ), a cation developed by Alberto's group[27,28], as a convenient precursor to apply BFCA strategy. Regarding the reaction, pertechnetate is reduced by  $\text{NaBH}_4$  to  $^{99\text{m}}\text{Tc}^+$  while it is carbonylated (**Scheme 2**). Using different carbonylation and reducing agents, the tricarbonyl technetium can be easily prepared by means of a commercially available Isolink kit.



**Scheme 2.** Preparation of  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .

The  $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  is a promising core for radiopharmaceutical applications because it is small, has one positive charge and the carbonyls are chemically inert against ligand exchange. In addition, the three aquo ligands of  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  are so labile that they can be easily substituted by other ligands which can contain the biological active molecule to perform a BFCA system.

#### 1.1.5. Cold rhenium

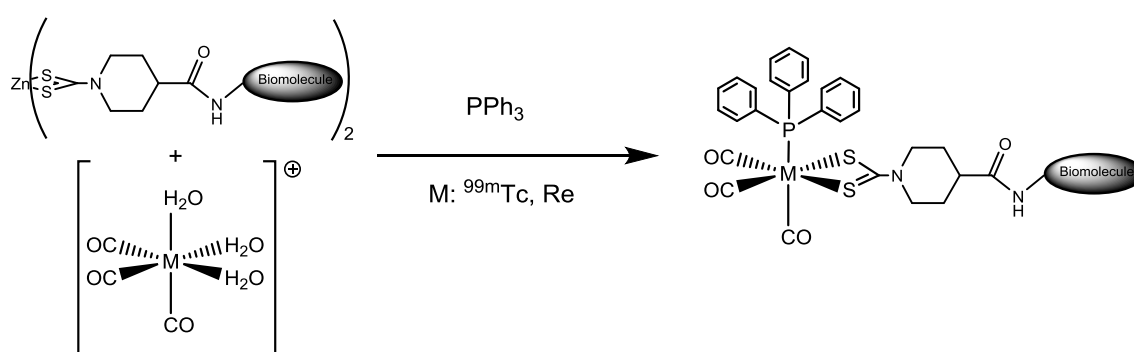
The extremely low concentration of  $^{99m}\text{Tc}$  compound makes it impossible to use standard tools to characterize the technetium-99m products like NMR, infrared spectra, HRMS, etc. It is just possible to directly characterize with mass spectra techniques using concentrated solutions of technetium-99 ( $^{99}\text{Tc}$ )<sup>[29]</sup>.

The most common strategy in radiochemistry to overcome this issue is to synthesize the homologue rhenium compound in handling quantities, taking advantage of the similar physicochemical properties of Tc and Re because of the lanthanide contraction such as atomic radius (Tc = 136 pm, Re = 137 pm)<sup>[30]</sup>, coordination chemistry, etc. However, the chemical behavior of rhenium shows some relevant differences compared with technetium because rhenium is an element of the 4<sup>th</sup> period while technetium is on the 3<sup>rd</sup>. These differences can be summarized as: 1) rhenium is kinetically more inert than technetium in substitution reactions, 2) rhenium compounds are more stable in higher oxidation states.

When the rhenium compound is fully characterized, it is injected to an HPLC system and the retention time of the analysis is compared with the technetium homologue. If both values are very similar, it can be assumed that both compounds are structurally identical. It should be highlighted that this procedure is accepted by the FDA (U.S. Food and drug administration)<sup>[31]</sup>.

### 1.1.6. Previous work in the research group

During the last few years, our research group have been developing a new methodology for the preparation of potential radiopharmaceuticals of technetium-<sup>99m</sup>Tc with high specific activity<sup>[32]</sup>. The strategy is based on <sup>99m</sup>Tc(I)-tricarbonyl, which, as previously mentioned, has three aquo ligands that can be easily substituted by other ligands. The strategy to bioconjugate the *fac*-{<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>}<sup>+</sup> is based on the following reaction.

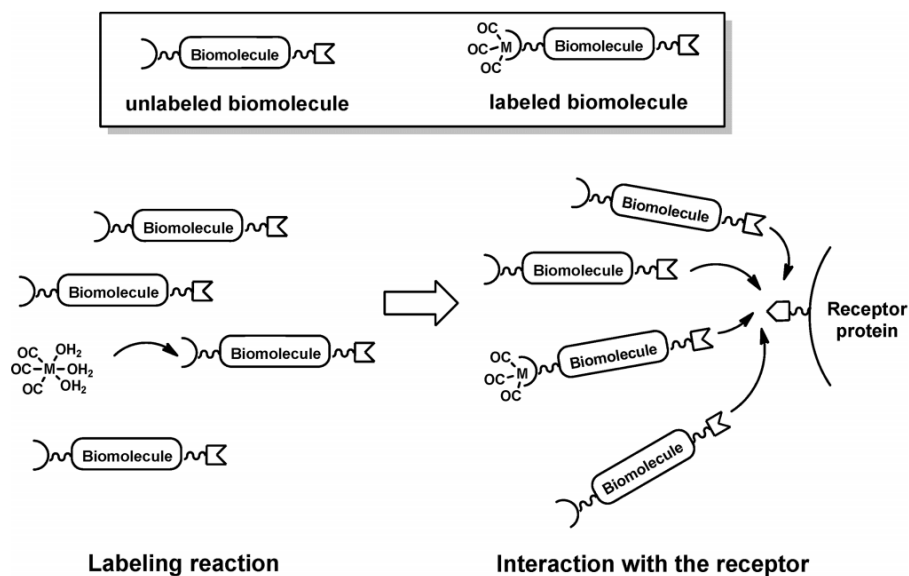


**Scheme 3.** [2+1] transmetalation reaction with the <sup>99m</sup>Tc/Re precursor, a bioconjugated zinc complex in the presence of a  $\pi$ -acceptor ligand for radiopharmaceutical application.

The first approach of this work was the transmetalation reaction between a bioconjugated zinc complex, <sup>99m</sup>Tc/Re tricarbonyl and triphenylphosphine (PPh<sub>3</sub>). This type of reaction which involves a bidentate and a monodentate ligand is known as [2+1] approach.

The importance of this strategy relies on the fact that dithiocarbamate zinc complexes show very low solubilities in aqueous solution. Consequently, the concentration of unlabelled biomolecules after the reaction would, presumably, be so low that it will lead to a potential radiopharmaceutical with high specific activity (this concept was defined in section 1.1.3.) because the ratio between labelled and unlabelled molecules will be very high (**Figure 9**).





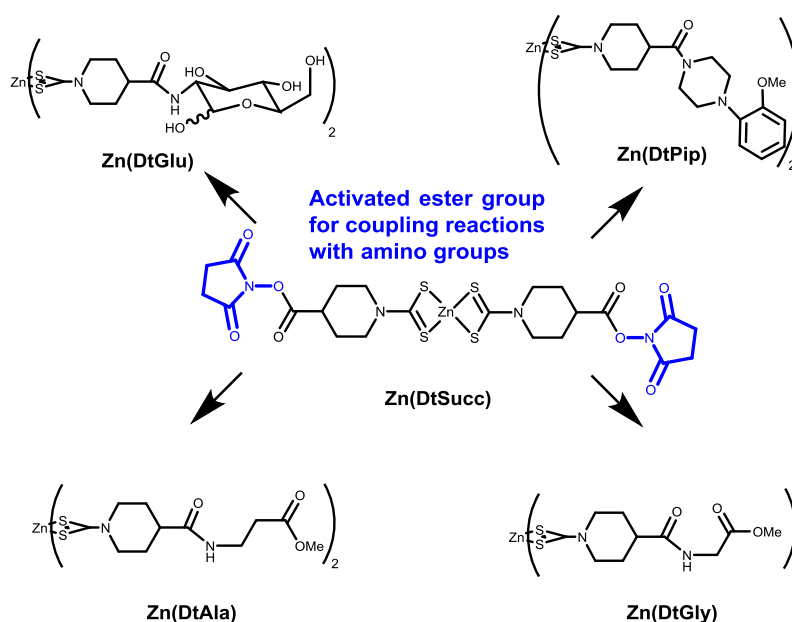
**Figure 9.** Representation of the competition of labeled and unlabeled biomolecules towards a receptor<sup>[32]</sup>.

In addition, this method allows the final product to be achieved without further purification, which is a requirement if this reaction wants to be implemented in hospitals because, ideally, the method would provide an easy procedure to perform radiopharmaceuticals which could be carried out without the use of complex procedures.

The preliminary results were published<sup>[32]</sup> and they agree with the idea that the thermodynamics plays a key role in the reaction. Despite the low concentration of the zinc complex in aqueous solution, the reaction is feasible because the dithiocarbamate forms much more stable complexes with transition metals with  $d^6$  configuration (Re/Tc) respect to  $d^{10}$  complexes (Zn)<sup>[32]</sup>. Although, the  $PPh_3$  ligand is not the most useful ligand for radiopharmacy, it was used as a model to prove the viability of the method with a phosphines as a  $\pi$ -acceptor donor. However, the possible use of other monodentate ligands is an attracting option because it can allow to tune the properties of the whole radiopharmaceutical.

The bioconjugation of the zinc complex with the biological active molecule is carried out with a succinimidyl zinc complex (Zn(Succ)) which has an activated ester that allows the formation of an amide using an amino group by means of a coupling

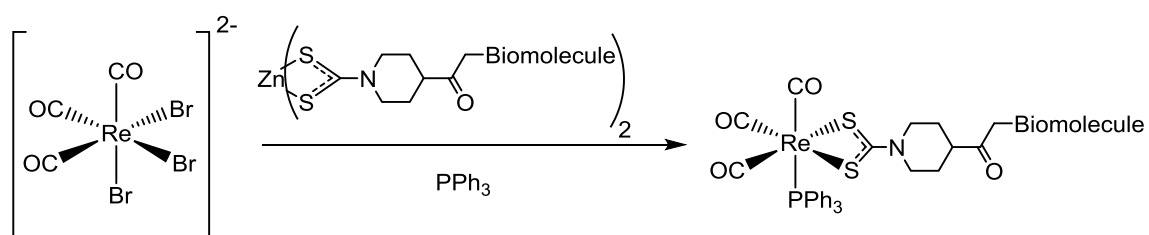
reaction. In the last few years, the following complexes have been previously developed in our group (**Scheme 4**).



**Scheme 4.** The five zinc complexes developed in the work of Dr. Joan Lecina for radiopharmaceutical applications.

The complexes Zn(DtAla) and Zn(DtGly) were used as a model to evaluate the feasibility of the strategy. On the other hand, Zn(DtGlu) and Zn(DtPip) have potential activity as radiopharmaceuticals, because Zn(DtGlu) contains glucosamine which is a glucose derivative that can be used for tumour targeting<sup>[33]</sup>, while compound Zn(DtPip) is an arylpiperazine which shows affinity toward the receptors related with mental diseases like Alzheimer's<sup>[34]</sup>.

After the successful preparation of each zinc compound, they were used for the preparation of the corresponding cold rhenium complex following this general reaction:



**Scheme 5.** Transmetalation reaction between  $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]^{2-}$  precursor and the bionconjugated zinc complex in presence of a monodentate ligand for the preparation of the rhenium model complexes.

All the compounds were fully characterized by means of spectroscopic and spectrophotometric tools. The next step was to use the rhenium model compounds to monitorize the reaction with  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  by means of HPLC coupled with a radiodetector. This reaction was performed in a similar way that the rhenium complex preparation, however, since the reactions with technetium-99m take place much faster, the reaction times and the temperatures were much lower. First results showed that [2+1] transmetallation reaction was perfectly possible despite the very low aqueous solubility of the zinc precursor. It should be highlighted that the best radiochemical yields were obtained with glycine and  $\beta$ -alanine as a biomolecules. However, with the other two compounds, glucosamine and arylpiperazine, the reaction was also performed and the products were detected, and, unfortunately, due to time limitations it was not possible to optimise the conditions of the reaction.

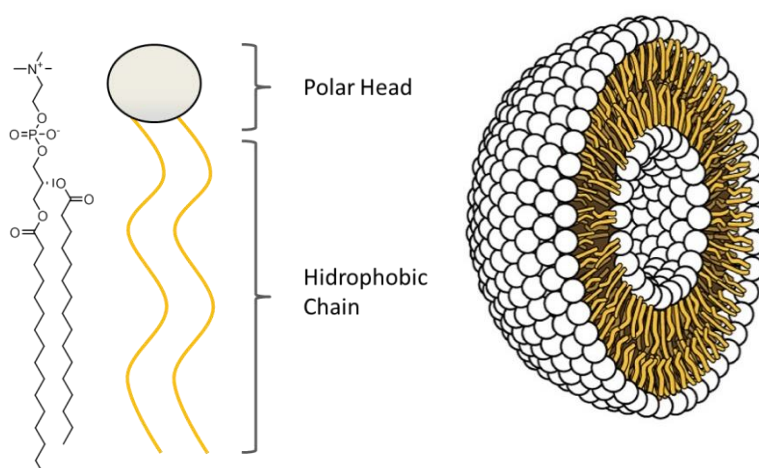
A part from the synthetic studies, for the smallest compounds (glycine and  $\beta$ -alanine) other studies, such as the stabilities of the radiocomplexes in cysteine and the stability in front of the dilution were performed in order evaluate if the compounds are degraded by these changes, these results showed that the metal core is stable enough for radiopharmaceuticals applications.

As a summary of this previous work, until the work here presented, the transmetallation reaction was performed with technetium-99m and rhenium using two molecule models (glycine and  $\beta$ -alanine) and other two biomolecules with potential biological activity (glucosamine and piperazine). All compounds were synthesized using  $\text{PPh}_3$  as a proof of concept of the whole system despite it is not being the best monodentate  $\pi$ -acceptor ligand for radiopharmaceutical purposes. All these studies paved the way for the use of other biomolecules and for the evaluation of *in vivo* or *in vitro* studies with similar compounds.

## 1.2. Liposomes

Liposomes, or less known as lipid nanoparticles, are supramolecular structures composed of phospholipids, a class of lipids with amphiphilic character because their structure contains a polar head and lipophilic chain<sup>[35]</sup>. Due to the contrast in the polarity of the whole molecule, when phospholipids are in water solution they are reorganized in a process of self-assembly where the polar heads stick together pointing to the aqueous media which surrounds the liposomes, and the aqueous core which is encapsulated inside the liposome itself. On contrary, the lipophilic chains of the molecule, which avoid the polar water molecules, are located between the layers (Figure 10).

Initially, liposomes were used as membranes models in biology, however, their applications in medicine have grown during the last few decades because they are biocompatible, stable in physiological conditions, not expensive and easy to prepare<sup>[36]</sup>. Due to their amphiphilic properties, liposomes can encapsulate drugs, genetic material, etc. which can be unstable without the carrier due to physiological pH, light or enzymes<sup>[37]</sup>. In addition, they can be especially useful for water insoluble drugs because liposomes can solubilize them in the lipophilic part<sup>[38]</sup>.



**Figure 10.** The structure of DPPC phospholipid and a representation of a liposome.

On the other hand, the use of nanoparticles in medicine can improve the circulating lifetimes (pharmacokinetics) compared with the free drug<sup>[39]</sup>. As a clear example of this potential improvement, is the discovery of EPR (enhanced permeability and retention effect) which theorizes that nanoparticles with a size between 10-100 nm have a clear preference toward tumours rather than healthy cells due to the high level of vascularization of tumours<sup>[40,41]</sup>. Consequently, for targeting, nanoparticles, such as liposomes, can be a very interesting platform to deliver cargo for medical applications.

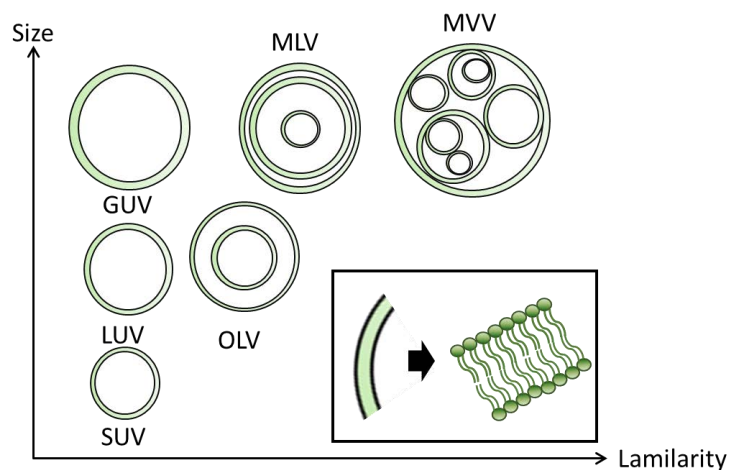
### **1.2.1. Liposomes classification**

Liposomes are considered soft matter features because of their fluidity, transitions of curvature fluctuation of shapes, insolubility and incompressibility<sup>[42]</sup>. Since they are dynamic structures, they can adopt different forms and sizes.

There are many types of liposomes which can be classified depending on their number of phospholipid bilayers (lamellarity). The smallest vesicles are those with one bilayer (unilamellar vesicles), depending of the size they have a different denomination: SUV (small unilamellar vesicles) radius from 4 to 20 nm, LUV (large unilamellar vesicles) from 50 nm to 10  $\mu\text{m}$  or GUV (giant unilamellar vesicles) with a size larger than 10  $\mu\text{m}$ <sup>[43]</sup>, the larger the unilamellar vesicle the larger the water cavity, consequently, they can load higher amounts of water soluble compounds.

In addition to unilamellar ones, there are three more types; oligovesicular vesicles (OVV), when small vesicles remain inside a bigger one, multivesicular vesicles (MVV) and multilamellar vesicles (MLV) with many layers, one layer inside the other (see **Figure 11**).

In general, the common preparation of liposomes ends up with the formation of MLV. To transform them into unilamellar ones they must be broken into smaller ones. This can be achieved by sonication or passing the MLV through a membrane with nanometric porous<sup>[44]</sup>.



**Figure 11.** Liposomes classification by size and lamilarity.

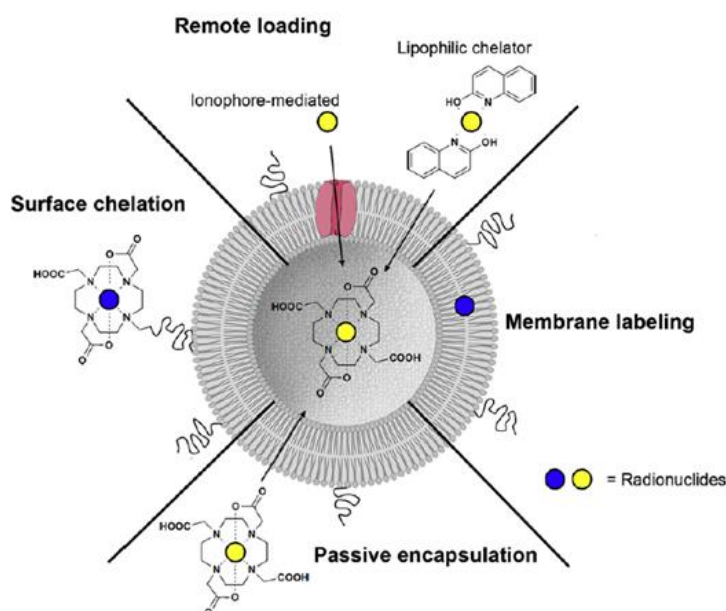
Depending on the applications some of them can be more useful than others. For instance, GUVs are interesting as cell membrane model, while it is believed that LUVs are the most interesting for medical purposes since they have the proper size to promote the EPR effect.

### 1.2.2. Liposomes labelling strategies

For all reasons mentioned above, the use of liposomes in nuclear medicine has been widely studied. Different strategies to radiolabel liposomes have been developed and all of them should fulfil the following characteristics for radiopharmaceutical purposes; 1) high labelling efficiency, 2) soft reaction conditions and short reaction times, 3) *in vitro* and *in vivo* stability and 4) applicability of the labelling technique for different types of liposomes<sup>[45]</sup>.

Between the different strategies, it can be distinguished in two main procedures. The first one consists of an initial mixture of the radioisotope and phospholipid in the organic solvent, after the solvent evaporation and the following hydration, the radioisotope is encapsulated in the liposome, in the lipid layers or in the aqueous core depending on its features. In the case of the other strategy, by means of

different techniques, the radioisotopes are incorporated in the carrier after the formation of the liposomes (after loading method)<sup>[46]</sup>. In the following scheme different procedures to achieve these two main strategies are described in more detail.



**Figure 12.** The image shows different strategies for liposome radiolabelling<sup>[47]</sup>.

### 1- Passive Encapsulation

Probably the easiest way for radiolabelling because the radionuclide is added in the water buffer in the hydration step, then it is incorporated in the water core of the vesicle at the end of the process.

### 2- Surface chelation

A chelator agent is added before manufacturing the vesicles, this molecule should be able to be anchored in the layers with the chelator moiety staying out of the membrane. Afterwards, when they are formed, the radionuclide is bound by means of chelator reaction. For this reason, since the chelator moiety should be polar to remain

in the aqueous phase, DOTA is one of the most used chelate rings, which can be used for different metals in nuclear medicine such as;  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , etc<sup>[47]</sup>.

### 3- Remote loading

For this type of loading the liposomes are already formed and the radionuclide goes through the membrane by passive diffusion. Thus, this strategy requires that radiocompound should be lipophilic enough. Remote loading can also be achieved by means of an ionophore previously incubated with the phospholipids and anchored in the lipid bilayer, the channel of the ionophore facilitates the radiotracer to go through the membrane.

### 4- Membrane labelling

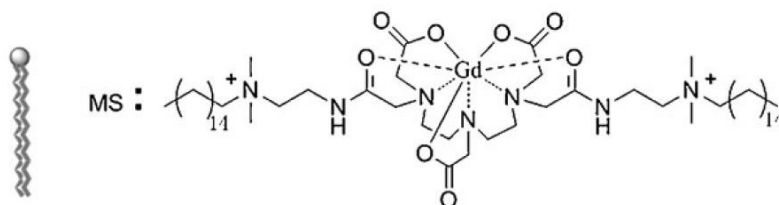
For this case, the radiocompound stays inside the lipid membrane, thus, the compound has a hydrophobic character. Consequently, it would prefer to remain in a lipophilic environment during the formation of liposomes.

## 1.2.3. Metallosurfactants

A popular new topic in the field between liposomes and inorganic chemistry is called metallosomes which are vesicles that contain metallosurfactants (MTs) as building blocks. Thus, it is so recent that only 200 references were found searching “metallosurfactant” in the browser of Scifinder. Since MTs combines the properties of amphiphilic compounds (selfagregation, biocompatibility, etc...) and the organometallic transition metals complexes (coordination chemistry, redox, magnetism, etc...) they are rising as an attractive topic in many areas such as; homogeneous catalysis, mesoporous materials, medicine and other fields<sup>[48]</sup>.



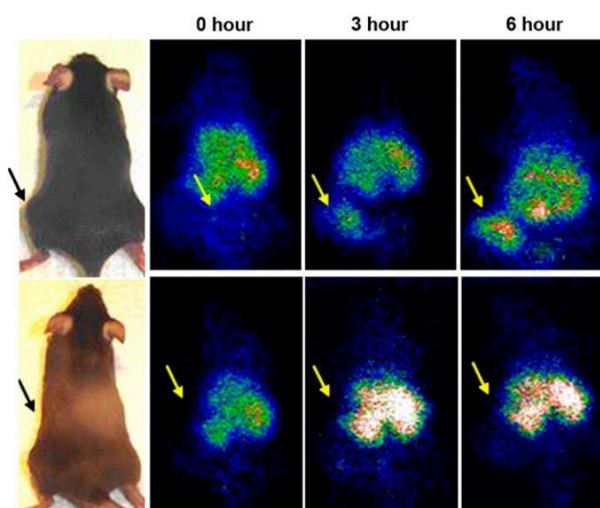
A nice example in the literature of MTs in medicinal application was reported by Chen, Y., *et al*<sup>[49]</sup>. Gadolinium metal has been widely studied as a contrast agent for NMR, with this aim, they prepared a lipophilic ligand with a highly polar chelator head and two lipophilic chains (**Figure 13**).



**Figure 13.** Structure of a Gadolinium MT for NMR applications

#### 1.2.4. Liposomes in nuclear medicine

Although there is not any commercial kit for nuclear imaging with liposomes in the market, there are many interesting research in preclinical cancer studies. As an example, a compound with  $^{111}\text{In}$ , a radioisotope used for SPECT, was linked to an antibody in order to get specificity. Both compounds were linked to a liposome system. The image sequence on the top of **Figure 14** corresponds to the system with liposomes, while the bottom sequence belongs to the radiotracer and the unencapsulated antibody. The main difference is seen after 6 hours post injection, where in the case of the uses of liposomes the tumour can be clearly seen, whereas when the radiotracer is unencapsulated, it is not so clearly accumulated in the tumour<sup>[50,51]</sup>.



**Figure 14.** SPECT images of two mice with a lung tumour, both animals have been administrated an antibody labelled with  $^{111}\text{In}$ . Upper row, the radiotracer is administrate with liposomes. Bottom row, it is administrated without carrier.

## 2. OBJECTIVES

The present work can be seen as a continuation of a previous reported methodology in our research group based in a [2+1] transmetallation reaction for the preparation of radiopharmaceuticals using the widespread precursor  $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ , a bioconjugated zinc complex and a monodentate  $\pi$ -acceptor ligand. In this previous work some preliminary studies with technetium-99m showed that the reaction takes place with the metal. However, more studies should be performed in order to evaluate its feasibility in potential applications for radiopharmacy. Thus, the first part of the thesis is devoted to develop new radiotracers by means of the transmetallation reaction and to improve the potential radiopharmaceuticals previously described by changing the auxiliary ligand. On the other hand, the same reaction will be used to establish a new approach for liposome radiolabelling.

### 1. Second generation radiopharmaceuticals:

1.1. To study the use of two new monodentate  $\pi$ -acceptor ligands, sodium triphenylphosphine trisulfonate and *tert*-butyl isocyanide (TPPTS and ISO respectively), for the preparation of rhenium and technetium-99m metals with the previously reported zinc dithiocarbamate complexes, Zn(DtGlu) and Zn(DtPip). These new ligands may confer more interesting properties of to the potential radiopharmaceutical and, using them, it will be possible to find out if the [2+1] strategy can be useful for a wider number of  $\pi$ -acceptor ligands. Thus, the complexes **Re(DtGlu)TPPTS** and **Re(DtPip)ISO** will be synthesized and characterized by common spectroscopic and spectrometric tools. Finally, if the rhenium complexes are successfully synthesized, the [2+1] transmetallation reaction will be performed with each monodentate ligand, the corresponding zinc dithiocarbamate complex and the precursor  $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3\}^+$  for the obtainment of the final technetium-99m complexes;  **$^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$**  and  **$^{99m}\text{Tc}(\text{DtPip})\text{ISO}$** .

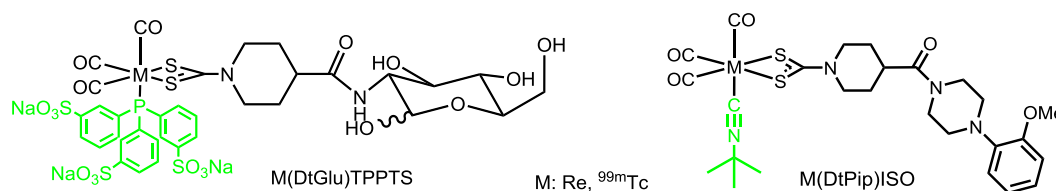
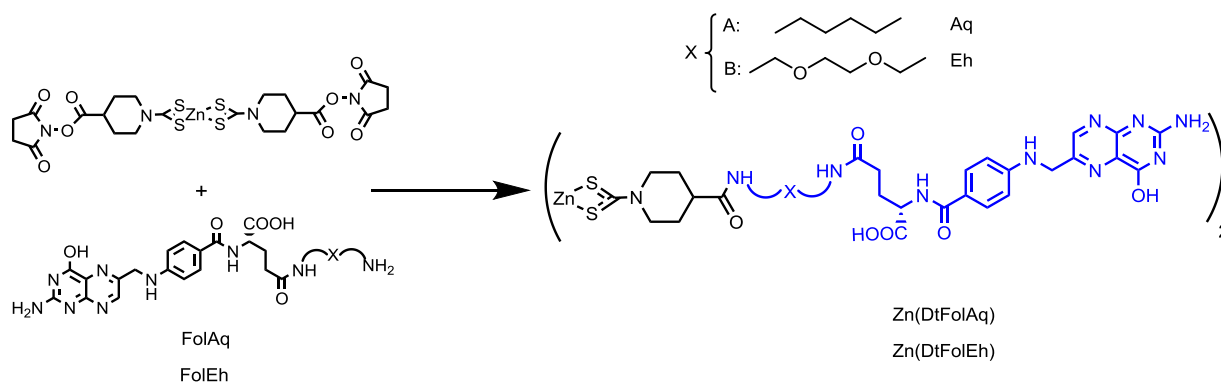


Figure 15. Molecules M(DtGlu)TPPTS and M(DtPip)ISO (M; Re or  $^{99m}\text{Tc}$ )

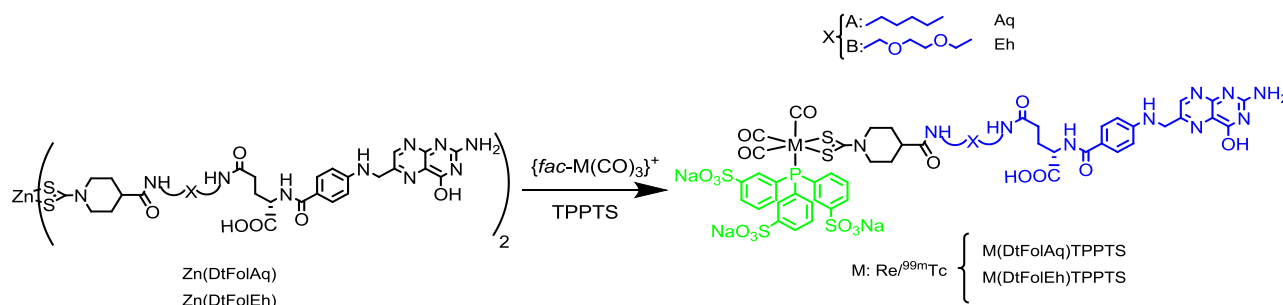
1.2. Since folic acid has been widely studied for cancer diagnosis, this molecule will be derivatized to prepare two reported molecules (**FolAlk** and **FolEth**) with a terminal amine. The difference between them relies on the linker between the amine and the folic acid part. For FolEth the linker is an ether chain of 8 members while FolAlk has an alkyl chain of 6 members. Next, the terminal amine of each folic derivative will react with a zinc complex with an activated ester group for the preparation of two new zinc complexes **Zn(DtFolAlk)** and **Zn(FolEth)** which can be used in [2+1] transmetallation reaction.



Scheme 6. Coupling reaction to obtain two zinc complexes bioconjugated with folic acid: Zn(DtFolAq) and Zn(DtFolEh).

1.3. The zinc complexes Zn(DtFolAlk) and Zn(FolEth) should be used for the preparation of two new rhenium complexes bioconjugated with acid folic (**Re(DtFolAq)TPPTS** and **Re(DtFolEh)TPPTS**) by means of the [2+1] transmetallation reaction. For the molecular design of these complexes TPPTS will be used as  $\pi$ -acceptor ligand for their hydrophilic properties. Secondly, if the rhenium compounds can be properly prepared, the radiosynthesis of the

homologues technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ ) will be performed.



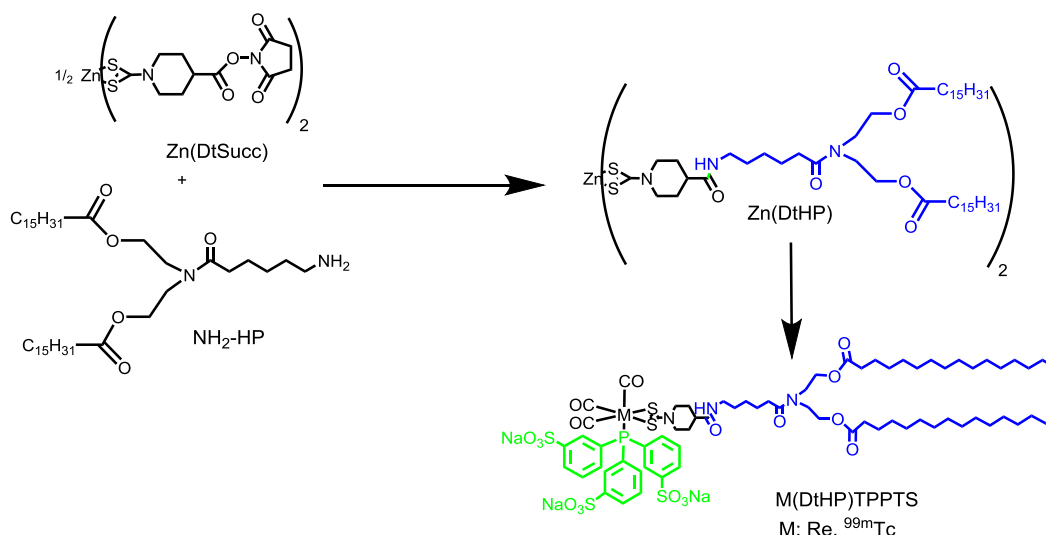
**Scheme 7.** [2+1] transmetallation reaction to obtain  $\text{M}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and  $\text{M}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  (M; Re or  $^{99m}\text{Tc}$ ).

1.4. For all the technetium-99m compounds stability studies will be performed.

And for the potential radiopharmaceuticals with cancer application, ***in vivo*** and ***in vitro*** studies will be carried out in order to evaluate the biological activity of the compounds. Moreover, the studies will be also useful to know if the potential radiopharmaceuticals prepared by means of [2+1] transmetallation reaction are highly specific enough to show this biological activity. For the radiotracer  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  the effect of the different linker will be evaluated in the biological studies.

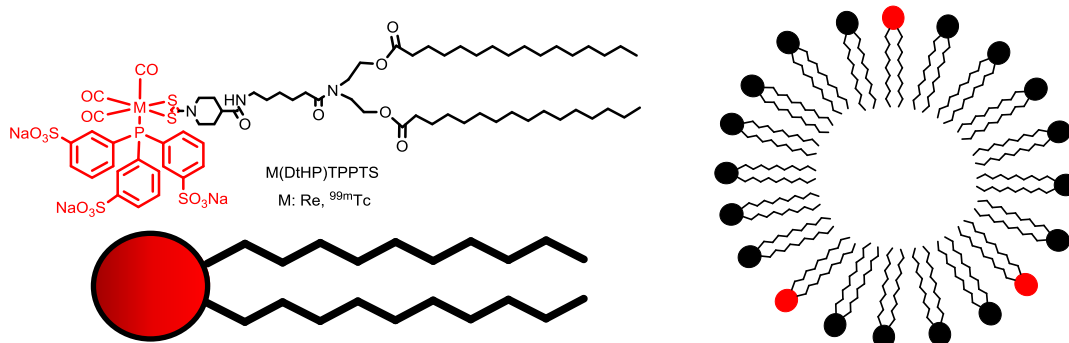
## 2. New strategy for liposomes radiolabelling

2.1. A new lipophilic compound **NH<sub>2</sub>-HP** will be synthesized, which will react with the zinc complex with an activated ester group for the obtention of **Zn(DtHP)**. The zinc complex will be used in the transmetallation reaction for the preparation of a new amphiphilic compounds **Re(DtHP)TPPTS** and the technetium-99m homologue:  **$^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$** .



**Scheme 8.** Synthetic pathway of the lipophilic molecule Zn(DtHP) and the amphiphilic molecules M(DtHP)TPPTS (M; Re or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )

**2.2. Aggregation studies** will be performed for all the synthesized zinc and rhenium complexes. Firstly, incorporation and characterization studies of Zn(DtHP) and Re(DtHP)TPPTS complexes will be done with vesicles formed by SPC phospholipid (SPC= soybean phosphatidylcholine). Finally, the strategy will be performed with [ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ] $^+$  in order to **develop a simple method for liposome radiolabelling with technetium-99m** by means of the transmetallation reaction.

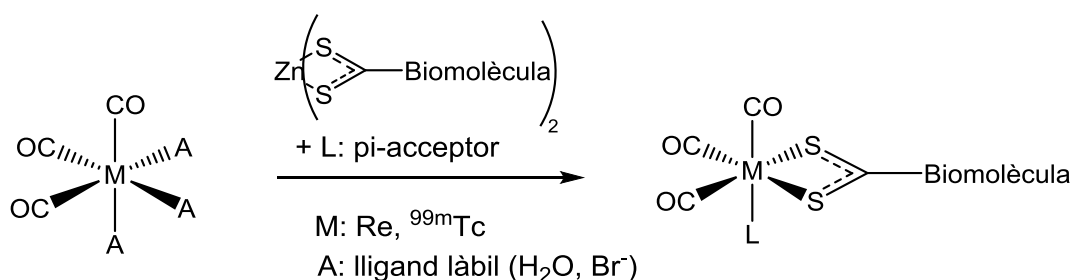


**Figure 16.** The molecule M(DtHP)TPPTS (M; Re or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) with the representation of its amphiphilic behaviour as a building block of an aggregate (micelle).

### 3. COMPLEXOS DE ZINC I RENI BIOCONJUGATS PER A APLICACIONS EN RADIOFARMÀCIA

Per entendre aquest capítol s'ha de tenir present, tal com s'ha mencionat en l'apartat 1.1.5. de la introducció, que una metodologia habitual de treball en la radioquímica del tecneci és mitjançant els complexos homòlegs de reni, donat que les concentracions de tecneci-99m són molt baixes ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$ M) no és possible fer una caracterització estructural amb tècniques espectromètriques i espectroscòpiques clàssiques com IR, NMR, espectre de masses, etc... D'aquesta manera, per poder assegurar l'obtenció del potencial radiofàrmac primer es dur a terme la síntesi amb el reni com a metall al laboratori, es caracteritza aquest compost de reni pels mètodes habituals (NMR, IR, HRMS, etc...) i finalment s'analitza per RP-HPLC. Un cop s'han obtingut els complexos homòlegs de reni, es procedeix a fer la radiosíntesi amb el tecneci-99m, injectar la solució resultant al HPLC amb detector radiomètric, i mesurar-ne el temps de retenció. Finalment si els complexos de reni i tecneci presenten temps de retenció molt similars es considera que es tracten de complexos homòlegs. Seguint aquesta lògica, la primera part dels resultats experimentals està dedicada a l'obtenció i caracterització dels compostos de reni.

Com també s'ha descrit en la introducció (1.1.6.), durant els últims anys en el nostre grup s'ha treballat en el desenvolupament d'una estratègia per a la síntesi de radiofàrmacs amb alta activitat específica. Aquesta es basa en una reacció de transmetal·lació entre un complex de zinc bioconjugat, el tricarbonil de tecneci o reni i un lligand monodentat  $\pi$ -acceptor.



**Esquema 9.** Reacció general de la transmetal·lació [2+1] entre el compost bioconjugat de zinc i el precursor de reni o tecneci-99m.

Aquest capítol consta principalment de dues parts, la primera consisteix en sintetitzar dos compostos de reni emprant precursors de zinc prèviament obtinguts pel Dr. Joan Lecina. Com ha novetat s'introduiran dos lligands  $\pi$ -acceptors nous, els quals, presumiblement, haurien de tenir unes característiques més interessants des d'un punt de vista radiofarmacèutic que la  $\text{PPh}_3$ , que és el lligand monodentat que es va fer servir com a model en el treball anterior. A més, el fet de provar nous lligands permetrà avaluar la versatilitat del nostre mètode, en altres paraules, si és possible emprar diferents lligands monodentats en la reacció de transmetal·lació [2+1].

En la segona part del capítol es funcionalitzarà una molècula d'àcid fòlic per tal de ser implementada per primer cop en la nostra metodologia, seguidament es sintetitzarà el complex bioconjugat de zinc i, finalment, es farà reaccionar aquest últim complex amb el precursor reni per obtenir el complex model de reni.

### 3.1. Síntesi del complex $\text{Re}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$

Molècules estructuralment similars a la glucosa poden ser interessants en el camp de la diagnòs nuclear (introducció, 1.1.3.2.). La majoria de cèl·lules de mamífers contenen una família de receptors de glucosa anomenats GLUT que s'encarreguen del transport actiu de carbohidrats a través de la membrana cel·lular. Aquest carbohidrats són necessaris perquè la cèl·lula obtingui energia pel seu correcte funcionament. Donat que les cèl·lules cancerígenes tenen un consum energètic més elevat que les sanes requereixen d'un nombre de receptors GLUT molt major, en particular del GLUT-1. Per aquesta raó és habitual bioconjugar radioisòtops amb compostos similars a la glucosa perquè acostumen a dirigir el radiofàrmac de manera específica en cèl·lules tumorals<sup>[53]</sup>.

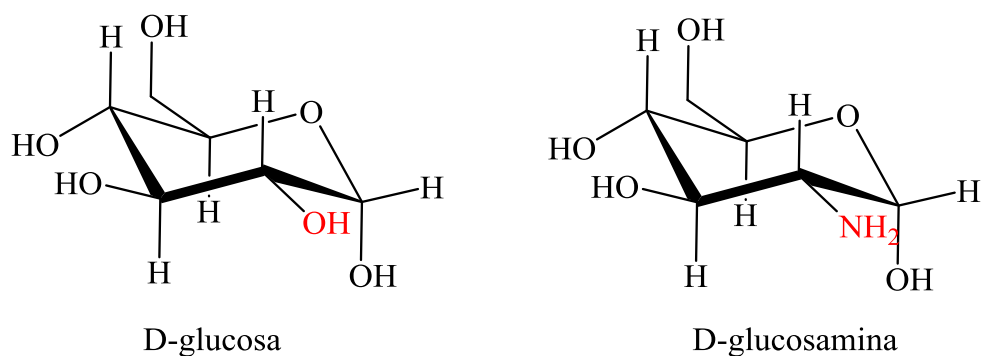


Figura 17. D'esquerra a dreta les molècules D-glucosa i D-glucosamina.

En aquest apartat es sintetitzarà un complex de reni que conté la glucosamina, molècula semblant a la glucosa (**Figura 17**) amb la diferència que l'hidroxil del carboni 2 ha estat substituït per una amina primària.

En la literatura ja s'han descrit alguns compostos de tecneci-99m per a diagnòs bioconjugats amb aquesta biomolècula, un exemple d'aquests és el radiocomplex de segona generació [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-DTPA-DG del grup de Da Lian<sup>[54]</sup>.

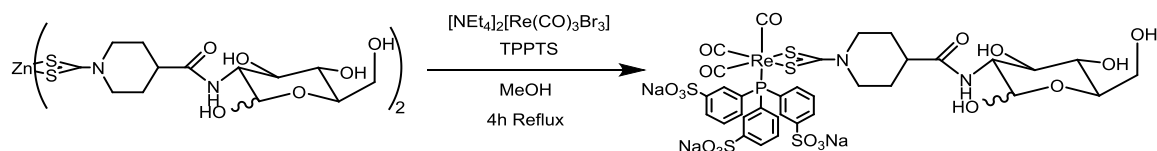
Amb la idea de millorar les propietats del radiocomplex, i sabent que la reacció de transmetal·lació [2+1] funciona amb fosfines, es va introduir el lligand monodentat trifenilfosfina trisulfonada (TPPTS) perquè en la literatura s'empra sovint en radiofàrmacs per diagnòs de tumors<sup>[55,56]</sup>. Els tres grups sulfonats provoquen que es tracti d'una fosfina molt soluble en aigua fet que ajudi a tenir alts rendiments radiosintètics<sup>[55,56]</sup>. A més, aquestes tres càrregues dels sulfonats li confereixen un caràcter molt hidrofílic responsable de que radiofàrmacs amb la TPPTS interaccionin molt poc amb les proteïnes presents a la sang, millorant la farmacocinètica del radiofàrmac<sup>[57]</sup>. Així doncs en aquest apartat es sintetitzarà el complex [Re(DtGlu)TPPTS] (Dt = Ditiocarbamat, Glu = Glucosamina) basat en el tricarbonil de reni amb la TPPTS i el lligand bidentat ditiocarbamat de zinc bioconjugat amb la glucosamina.

Tot i que en les síntesis dels complexos de tecneci es fa servir [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ]<sup>+</sup> com a precursor, en la química del reni fred és habitual treballar amb el precursor [ $\text{NEt}_4$ ]<sub>2</sub>[Re(CO)<sub>3</sub>Br<sub>3</sub>] perquè és més fàcil d'obtenir que el compost de reni amb tres lligands aquo. Atès que el que interessa és el producte final



[Re(DtGlu)TPPTS], que és l'homòleg del de tecneci, tenir un precursor diferent no afecta de cap manera la metodologia de treball.

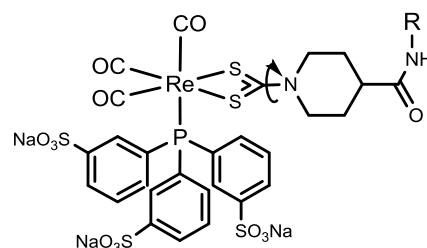
La sal de reni  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  es va fer reaccionar amb el complex de zinc biofuncionalitzat amb la glucosamina (Zn(DtGlu)), prèviament sintetitzat pel Dr. Joan Lecina, i la TPPPTS (**Esquema 10**)<sup>[32]</sup>.



**Esquema 10.** Reacció de transmetal·lació [2+1] del complex Zn(DtGlu), el  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  i la TPPPTS.

La reacció es duu a terme en un schlenk amb atmosfera de nitrogen per evitar l'oxidació de la fòsina, es dissol la sal de tricarbonil de reni en metanol desgasat, s'afegeix el complex Zn(DtGlu) i la suspensió es porta a reflux. Després d'una hora s'addiciona la fòsina i es deixa avançar la reacció durant tres hores més. Un cop es refreda la solució a temperatura ambient, s'observa la presència d'un precipitat, el qual correspon al precursor de zinc que no ha reaccionat, que es treu filtrant la solució. Aquesta última s'evapora a sequedat i el sòlid blanc resultant es renta amb cloroform per dissoldre la sal  $[\text{NEt}_4][\text{Br}]$ . El producte final s'obté amb un rendiment moderat del 55%.

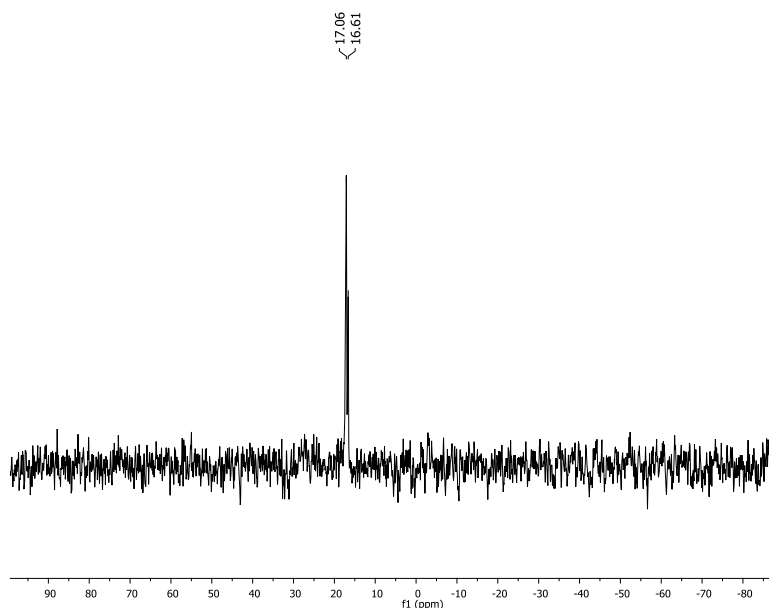
Els compostos metàl·lics tricarbonílics que contenen una fòsina són especialment fàcils de caracteritzar perquè les tècniques d'IR i  $^{31}\text{P}$ -NMR són de gran ajuda. En primer lloc en l'espectre de  $^{31}\text{P}$ -NMR (**Figura 19**) es poden observar dos pics de fòsfor molt propers entre si a 17,18 i 16,1 ppm que corresponen a dos isòmers de



**Figura 18.** Estructura on es mostra la rotació de l'enllaç C-N que dóna lloc als dos isòmers.

l'estructura. Tal com ja es va observar amb compostos similars<sup>[32]</sup>, la formació dels dos isòmers s'ha assignat a la restricció en rotació de l'enllaç C-N del ditiocarbamat les

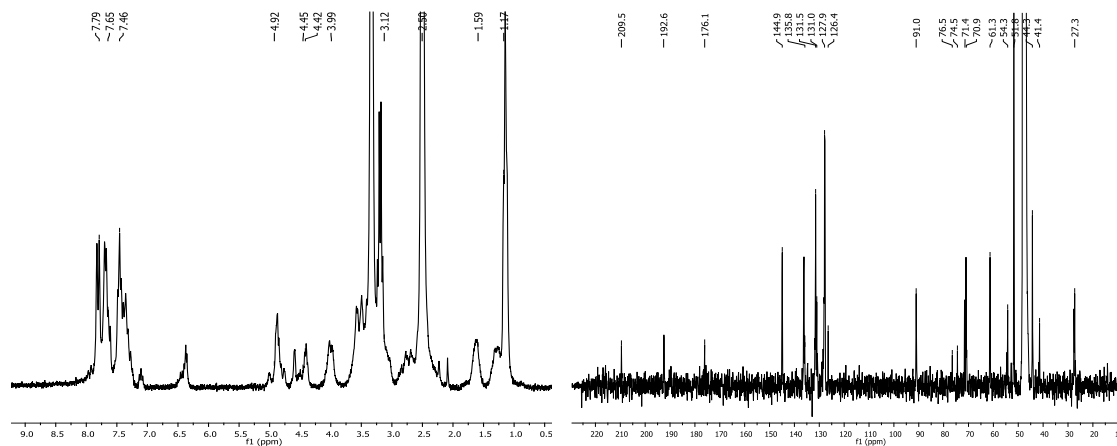
molècules estan en solució. El fet que apareguin dos isòmers és una prova més de l'obtenció de l'estructura desitjada.



**Figura 19.** Espectre de  $^{31}\text{P}$ -NMR en  $d_6$ -DMSO dels complexos  $\text{Re}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ .

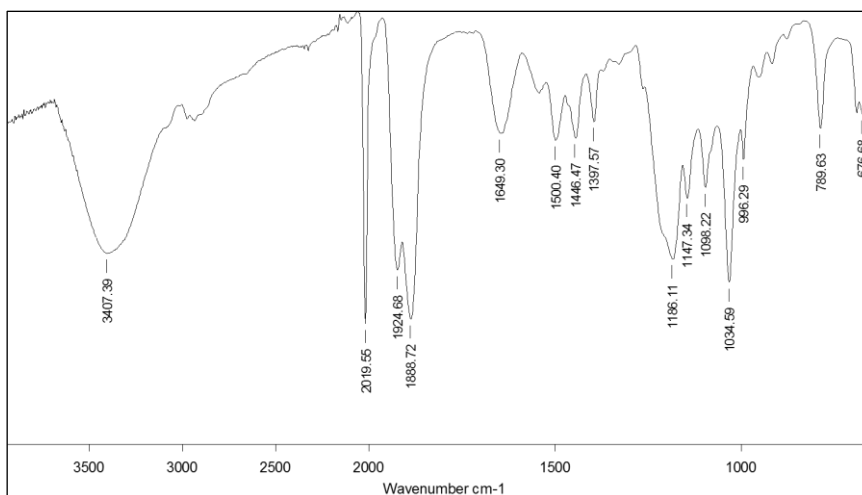
En l'espectre de  $^1\text{H}$ -NMR (**Figura 20**) el pic 3,99 ppm correspon als hidrògens en posició equatorials més propers al grup ditiocarbamat de l'anell isonipecòtic que, tal com ja s'havia observat<sup>[32]</sup>, després de la transmetal·lació amb el reni es desplacen aproximadament 0,7 ppm respecte el complex de  $\text{Zn}(\text{DtGlu})$  que es troben a 4,7 ppm. D'altra banda, els pics de 1,17 ppm i 3,12 ppm corresponen al subproducte  $[\text{NEt}_4][\text{Br}]$  que es difícil d'eliminar totalment amb els rentats ja que és un producte que presenta una solubilitat similar en la majoria de dissolvents a les del complex de reni. Malgrat les clares impureses, no es va purificar el producte amb altres tècniques perquè en l'RP-HPLC el pic del complex de reni era fàcil d'identificar donat que la sal  $[\text{NEt}_4][\text{Br}]$  elueix a temps molt diferents. Les impureses de la salt van quedar reflectides en la determinació de l'anàlisi elemental on es van obtenir els percentatges següents; %C: 32,7 %H: 3,36 %N: 2,59 i %S 11,2 en cas que el producte fos totalment pur s'haurien d'haver obtingut els valors; %C: 33,9 %H: 2,76 %N: 2,33 i %S: 13,31. Aquests valors només són coherents si, a part de  $[\text{NEt}_4][\text{Br}]$ , es té en conte que el producte final també conté la sal de zinc ( $\text{ZnBr}_2$ ).

Per acabar, de l'anàlisi dels espectres de  $^{13}\text{C}$ -NMR en podem destacar el pic a 209 ppm assignat al carboni del ditiocarbamat i els carbonis hidroxílics de la glucosamina que van des de 91 a 60 ppm.



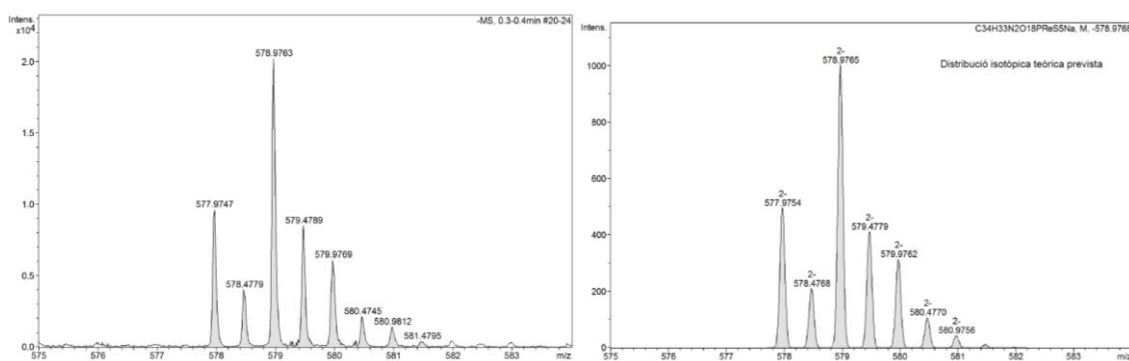
**Figura 20.** A l'esquerra espectre de  $^1\text{H}$ -NMR a la dreta el de  $^{13}\text{C}$ -NMR en  $d_6$ -DMSO del complex  $[\text{Re}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}]$ .

L'espectrometria d'infraroig és especialment útil per complexos carbonílics perquè les bandes de vibració dels carbonils són molt intenses en un rang de longituds d'ona molt característic. De fet, tant és així que en alguns casos es poden deduir informació estructural del complex. En l'espectre d'IR del  $\text{Re}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  (**Figura 21**) aquestes apareixen a 2020, 1925 i 1889  $\text{cm}^{-1}$ , valors molt semblants als observats en els complexos sintetitzats pel Dr. Joan Lecina. D'altra banda, els carbonils de la sal de reni  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  apareixen a 1996 i 1846  $\text{cm}^{-1}$ , al no ser observades en l'espectre del nostre producte és coherent en que els lligands  $\text{Br}^-$  han estat substituïts per la TPPTS i el grup ditiocarbamat.



**Figura 21.** Espectres de IR-ATR del complex Re(DtGlu)TPPTS.

Per acabar la caracterització del primer compost de reni, el valor obtingut en l'ESI-HRMS en polaritat negativa és de 578,9763 m/z, que coincideix amb el valor i l'estequiometria de l'estructura esperada perdent dos àtoms de sodi [ $C_{34}H_{33}O_{18}N_2PNaReS_5^{-2}$ ]. D'aquest anàlisi també es pot concloure que el complex de reni és un monòmer perquè la distribució isotòpica obtinguda coincideix amb la teòrica.



**Figura 22.** Espectres en polaritat negativa de ESI-HRMS del Re(DtGlu)TPPTS.

### 3.2. Síntesi del complex Re(DtPip)ISO

El segon compost de reni sintetitzat que es presenta a continuació ha estat bioconjugat amb la molècula 1-(2-metoxifenil)piperazina perquè aquesta presenta gran afinitat amb el receptor de serotonina 5-HT que està relacionat amb trastorns mentals com; depressió, esquizofrènia, epilèpsia, depressió, etc...<sup>[58,59]</sup> És per això que un potencial radiofàrmac que incorpori la 1-(2-metoxifenil)piperazina en l'estructura podria ser interessant per visualitzar malalties mentals.

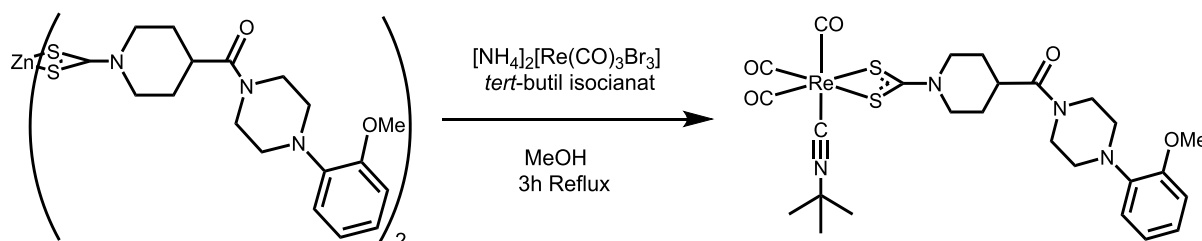
La reacció consisteix en la mencionada transmetal·lació entre  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  i el precursor de zinc bioconjugat amb la 1-(2-metoxifenil)piperazina (Zn(DtPip)), aquest últim prèviament sintetitzat i caracteritzat al nostre grup. Com ha novetat experimental, s'introduirà un *tert*-butilisocianat (ISO) com a lligand monodentat, amb l'objectiu de comprovar la versatilitat del mètode, ja que per primer cop es durà a terme la nostra reacció [2+1] usant un altre lligand enlloc d'una fosfina, el producte final s'anomena Re(DtPip)ISO. Si s'aconsegueix fer la reacció de transmetal·lació [2+1] amb altres lligands l'estratègia seria més atractiva perquè ens permetria ampliar el rang de lligands monodentats podent modular d'una manera fàcil les propietats de tot el radiocomplex, com la càrrega, lipofilitat, mida, etc.

Com que el potencial radiofàrmac hauria d'arribar als receptors que es troben a les neurones, aquest hauria de ser capaç de travessar la *blood brain barrier* (BBB). De forma general, els compostos que la passen acostumen a complir tres característiques: 1) càrrega total neutra 2) lipofílics i 3) baix pes molecular<sup>[24]</sup>. És per aquest motiu que al fer servir el *tert*-butil isocianat (petit i lipofílic) podria facilitar que el radiocomplex traspassi la barrera hematoencefàlica.

L'ús d'aquest lligand ja ha estat emprat en potencials radiofàrmacs com en el descrit pel grup de Gorskov<sup>[60]</sup>, ells van emprar el *tert*-butil isocianat amb el precursor de reni  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  obtenint un compost amb el mateix entorn de coordinació que el nostre i alhora demostrant que pot aplicar-se en reaccions [2+1] obtenint bons resultats radiosintètics, la diferència és que en el seu treball bioconjuguen el lligand

ditiocarbamat amb altres biomolècules com l'histidina o petits pèptids derivats de la glicina.

El procediment d'obtenció del complex de reni és molt similar a la reacciona descrita en l'apartat anterior:



**Esquema 11.** Reacció de transmetal·lació [2+1] del complex Zn(DtPip), el [NEt<sub>4</sub>]<sub>2</sub>[Re(CO)<sub>3</sub>Br<sub>3</sub>] i el *tert*-butil isocianat.

En una suspensió de metanol i Zn(DtPip) s'hi afegeix l'isocianur de *tert*-butil, la sal de reni [NEt<sub>4</sub>]<sub>2</sub>[Re(CO)<sub>3</sub>Br<sub>3</sub>] i es porta a reflux durant 3 hores. Passat aquest temps, i deixant refredar la suspensió final, el producte precipita, s'aïlla per filtració i es renta amb etanol fred. Seguint aquest procés experimental, el producte s'obté amb un rendiment del 60%.

Pel que fa la caracterització del compost de Re(DtPip)ISO, cal destacar que l'espectroscòpia d'infraroig (**Figura 23**) no només és útil per les tres bandes que corresponen als carbonils a 2008, 1919 i 1897 cm<sup>-1</sup>, sinó també per la senyal del grup isocianur que s'observa a 2186 cm<sup>-1</sup>, aquest valor coincideix amb l'obtingut pel grup del Gorskov<sup>[60]</sup> (2187 cm<sup>-1</sup>).

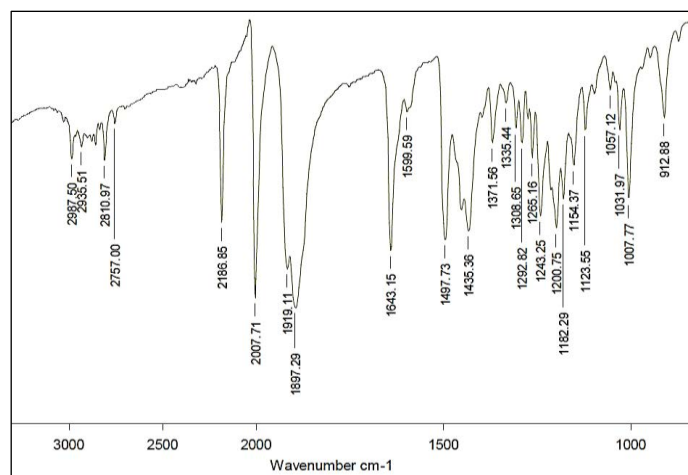


Figura 23. Espectres de IR-ATR del complex Re(DtPip)ISO.

L'espectroscòpia  $^1\text{H-NMR}$  també confirma l'obtenció del producte desitjat. En primer lloc perquè pel desplaçament de 0,6 ppm dels protons en la posició equatorial més propers al grup ditiocarbamat de l'anell isonipecòtic, com s'ha explicat amb el Re(DtGlu)TPPTS. D'altra banda, els tres grups metil del lligand *tert*-butil isocianat són fàcilment reconeixibles en un singlet a 1,5 ppm. L'espectre  $^{13}\text{C-NMR}$  també és coherent amb la formació del complex [2+1], observant-se la presència d'un pic a 213 ppm correspon al carboni del ditiocarbamat, els pics dels carbonils metàl·lics 195-190 ppm i el pic intens de 30 ppm dels metils del isocianat de *tert*-butil.

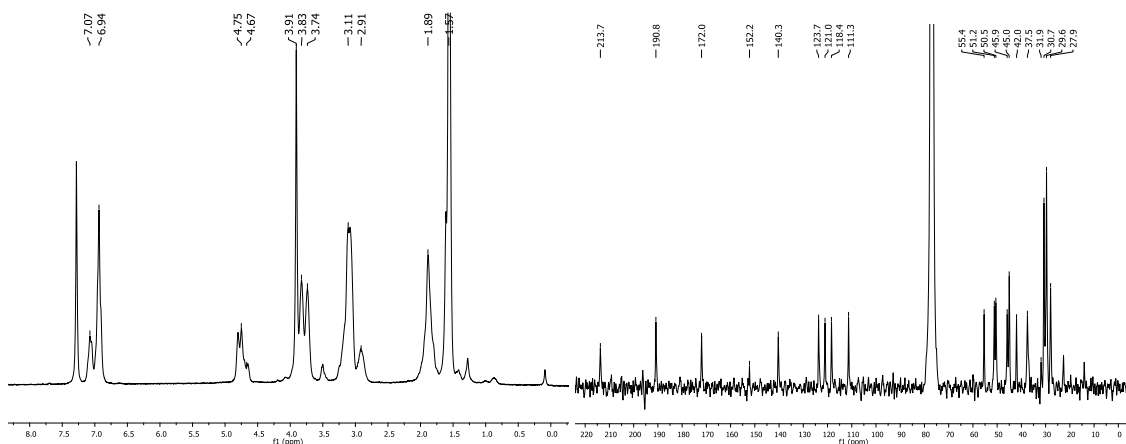


Figura 24. D'esquerra a dreta, espectre de  $^1\text{H-NMR}$   $^{13}\text{C-NMR}$  en  $\text{CDCl}_3$  del complex Re(DtPip)ISO.

Per acabar la caracterització, la massa exacte obtinguda en el ESI-HRMS en polaritat positiva és de 733,1527 m/z que coincideix amb l'estequiometria de

l'estructura esperada més un protó:  $C_{26}H_{32}O_5N_4S_2Re+H^+$ . A més, es va determinar que el producte s'ha obtingut amb una puresa suficient mitjançant l'anàlisi elemental.

### 3.3. Complexos de zinc i reni derivatitzats amb l'àcid fòlic

L'àcid fòlic, també coneguda com a vitamina B<sub>9</sub>, és un cofactor enzimàtic necessari per la síntesi dels nucleòtids purina i timina o de l'aminoàcid metionina a partir de la homocisteïna, la seva funció principal és com a donador de grups metil [61,62].

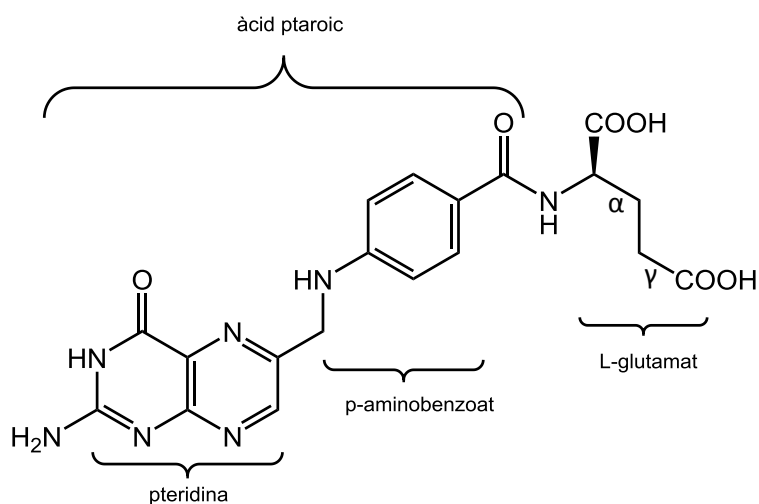


Figura 25. Estructura de l'àcid fòlic.

Aquesta vitamina té una gran afinitat amb els tres tipus de receptors de folat diferents presents en les cèl·lules; FR $\alpha$ , FR $\beta$  i FR $\gamma$ , tots tres glicoproteïnes de membrana. Prova d'aquesta elevada afinitat és el valor baix de la constant de dissociació ( $K_d$ ) aproximadament de 0,1-1 nmol/L<sup>[63]</sup>.

Com a conseqüència de l'elevada velocitat de replicació i proliferació de les cèl·lules cancerígenes, aquestes requereixen alts consums d'àcid fòlic. Per satisfer aquesta gran demanda molts tipus de càncer (pit, ovaris, colon, nasofaringe, etc...<sup>[64]</sup>) tenen els receptors de folat més sobreexpressats si es compara amb cèl·lules sanes<sup>[65]</sup>.



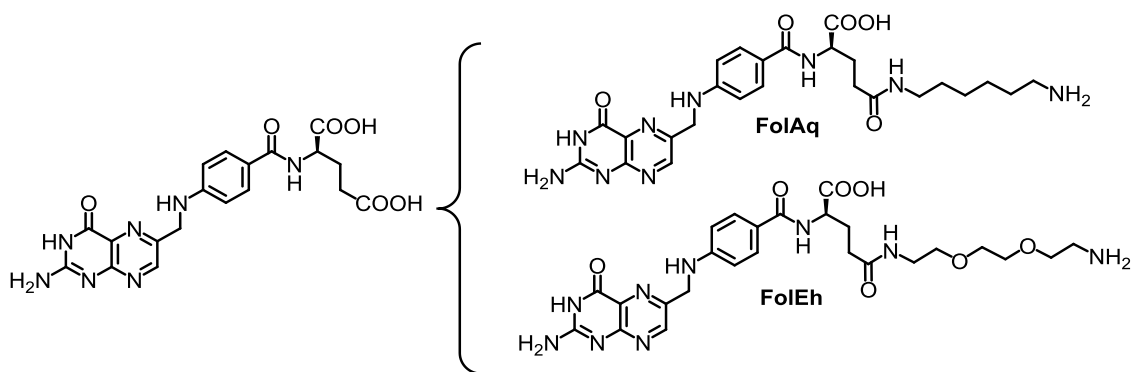
Per aquesta raó aquests receptors són una interessant diana per molts tipus de càncer, fet que ha provocat que l'àcid fòlic hagi despertat un gran interès en aplicacions per diagnòs i teràpia. A més a més, aquesta vitamina presenta també avantatges des d'un punt de vista més estrictament químic, la molècula és relativament petita, comparant-la amb anticossos o pèptids, és estable en un bon rang de temperatures i de pH, és barata i, a través dels grups àcids, és fàcilment funcionalitzable sense pràcticament afectar l'afinitat d'unió amb el receptor, ja que la interacció entre el substrat i la proteïna es dóna lloc a la part aromàtica (pteridina) de la molècula<sup>[66,67]</sup>.

Per totes aquestes raons, s'han descrit molts fàrmacs o nanopartícules que incorporen l'àcid fòlic en la seva estructura amb l'objectiu d'arribar específicament a aquelles cèl·lules canceroses. Un cop el lligand s'uneix al receptor, es desencadena un ràpid procés d'internalització cel·lular anomenat endocitosi, d'alguna manera podríem entendre que l'àcid fòlic actua com a cavall de Troia.

Un dels primers casos en medicina nuclear que es va conjugar la vitamina B<sub>9</sub> amb un radionucli va ser mitjançant un agent quelant anomenat deferoxamina útil per complexar el metall <sup>67</sup>Ga<sup>[68]</sup>. En aquest treball, a més de comprovar que el complex s'internalitzava exitosament dins les cèl·lules, es va descobrir que si la bioconjugació entre el lligand i l'àcid fòlic es dóna lloc a través de l'àcid carboxílic α el radiocomplex final no presenta activitat biològica, mentre que si es dóna pel grup carboxílic en posició γ aquest sí que interacciona amb el receptor folat i, consegüentment, el complex és internalitzat.

### 3.3.1. Funcionalització de l'àcid fòlic

Per poder aplicar la reacció de transmetal·lació amb la biomolècula d'àcid fòlic, primerament aquesta s'ha de derivatitzar amb l'objectiu de tenir una amina terminal perquè sigui possible dur a terme l'acoblament peptídic amb el grup succinimidil èster del precursor de zinc (Zn(Succ)).



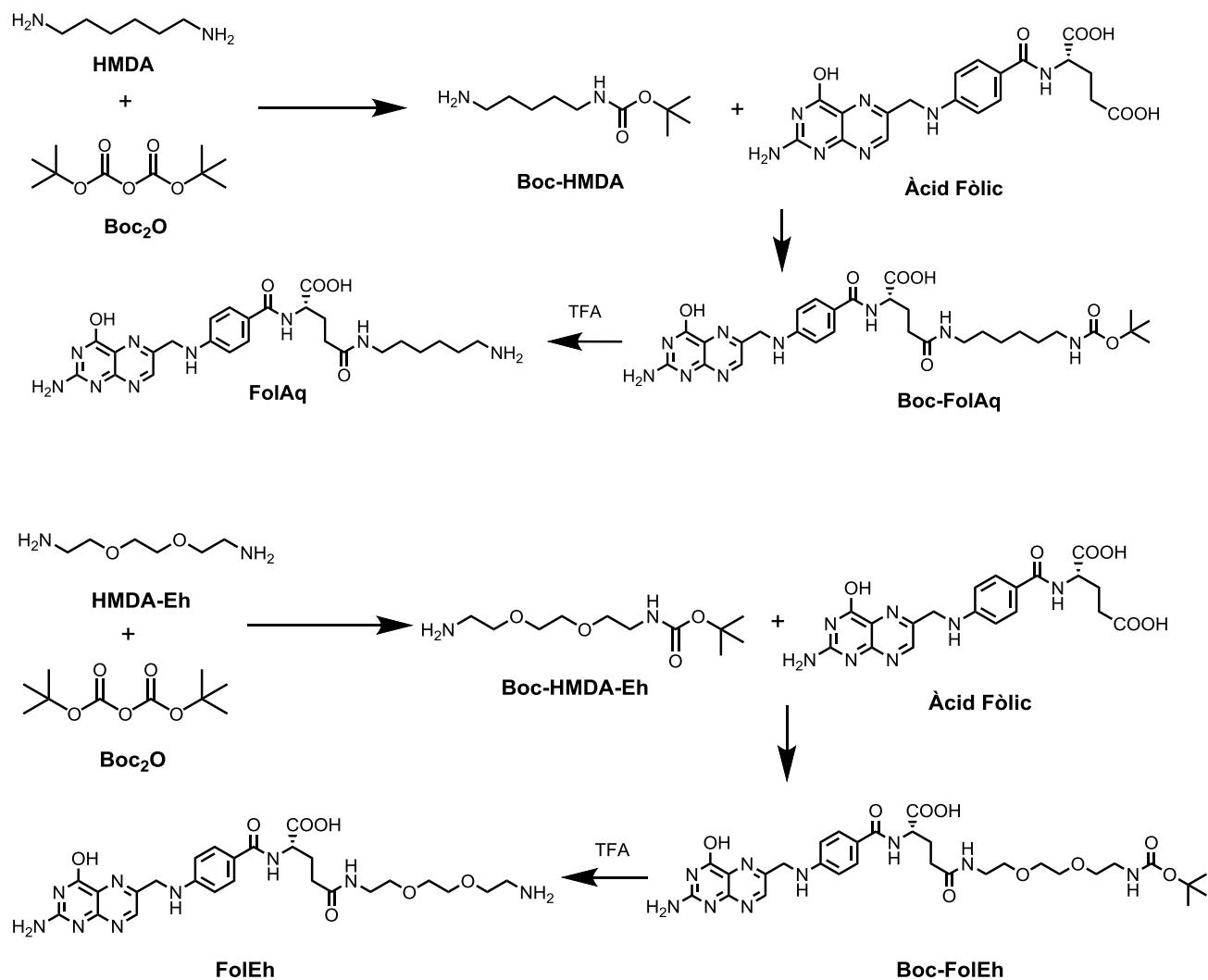
**Figura 26.** Estructures dels dos derivats de l'àcid fòlic, el primer amb una cadena alquíllica i el segon amb una cadena amb dos grups èters.

En la literatura hi ha diverses alternatives per tal de funcionalitzar l'àcid fòlic, en aquest treball es van escollir dues rutes pràcticament iguals, la única diferència és la naturalesa química dels connectors (*linkers*). En el primer cas es fa servir una cadena alquíllica (FolAq) (Fol = Fòlic, Aq = Alquíllica) de sis carbonis, en l'altre també es disposa d'una cadena de sis carbonis però amb dos grups èters que separen els grups CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (FolEh) (Eh= ethoxy (en anglès))(Figura 26).

La idea de provar dos connectors diferents, un més polar i llarg que l'altre, ha de permetre veure si aquestes diferències afecten d'alguna manera a l'activitat final del potencial radiofàrmac. Per exemple, és conegut que aquells compostos més polars interaccionen menys amb les proteïnes de la sang, fet que podria canviar els temps de circulació del compost, a part de també influir en la seva ruta d'excreció<sup>[57,69,70]</sup>. A més, al ser una cadena més llarga que l'altre, també pot ser interessant per comprovar si afecta en la capacitat d'unió de la biomolècula amb el receptor, a priori, com més lluny estiguin la biomolècula i del radionucli, l'impediment estèric hauria de ser menor afavorint així la unió<sup>[71]</sup>.

Per la funcionalització de l'àcid fòlic es van seguir principalment dos estratègies descrites en dos treballs diferents, el de Raphaël Schneider *et al* i l'altre de Grit Baier *et al*<sup>[72,73]</sup>. Bàsicament, pels dos compostos es comença amb la monoprotecció d'una de les dos amines de cada cadena amb l'agent Boc<sub>2</sub>O. Seguidament es fa reaccionar regioselectivament la amina terminal restant amb el grup γ carboxílic de l'àcid fòlic per donar la amida corresponent. Probablement, la reacció es dona selectivament per

aquest grup carboxílic al està menys impedit que l'altre. A més, tot i que en la literatura no s'ha trobat cap explicació, és possible que l'enllaç d'hidrogen entre el carbonil de amida i el protó alfa carboxílic també dificulti la reacció. Per acabar, es duu a terme la desprotecció del grup Boc en condicions àcides obtenint la amina terminal (**Esquema 12**).

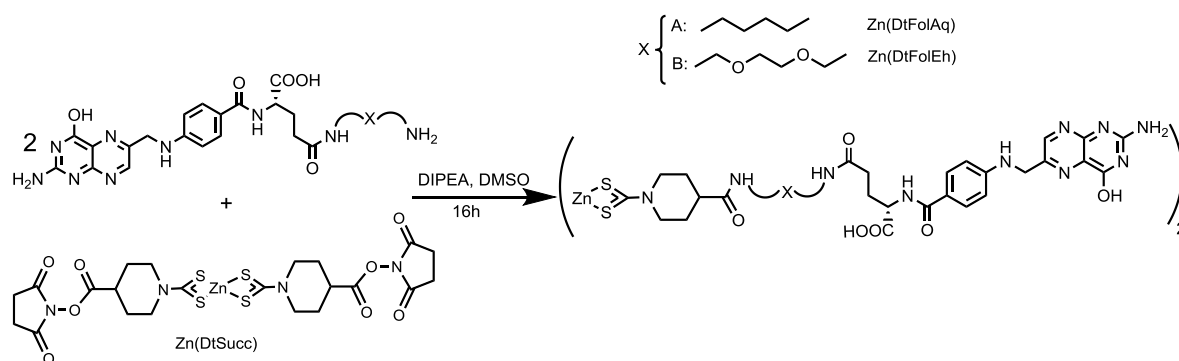


**Esquema 12.** A dalt, la ruta sintètica del lligand FoIAq i a baix la del FoIEh.

Per assegurar-ne la correcta obtenció, tots els productes van ser caracteritzats per  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenint els mateixos resultats que els descrits en la bibliografia<sup>[57,72,73]</sup>, a més d'altres tècniques com l'anàlisi de masses d'alta resolució o l'espectroscòpia d'infraroig.

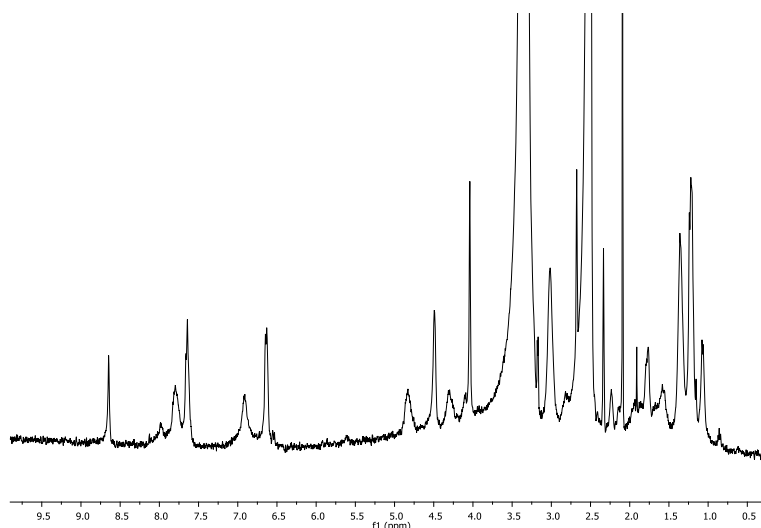
### 3.3.2. Síntesi dels complexos de Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh)

Un cop es van obtenir els dos derivats de l'àcid fòlic funcionalitzats amb la amina terminal es va dur a terme la reacció de bioconjugació amb el complex de zinc-succinimidil èster seguint el procés prèviament descrit<sup>[32]</sup> per obtenir els complexos Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh). L'única diferència en la síntesi és que es va fer servir DMSO com a dissolvent donat que l'àcid fòlic és poc soluble en altres solvents orgànics i els temps de reacció es van incrementar fins a les 16 hores.



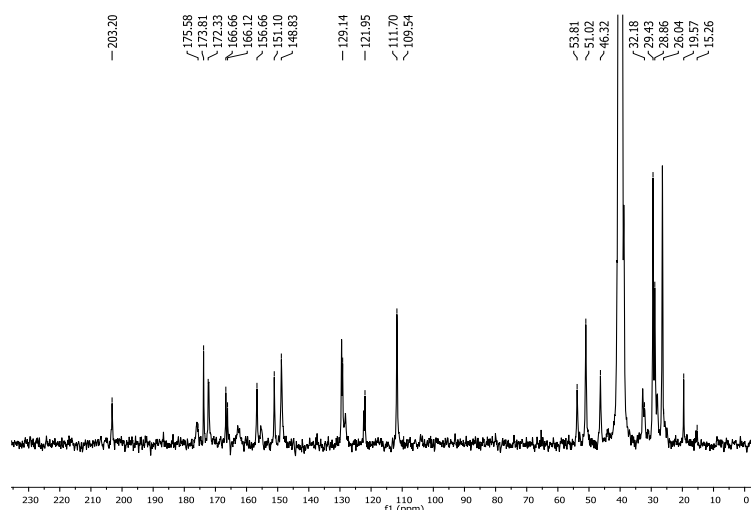
**Esquema 13.** Síntesi dels complexos Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh).

Amb l'objectiu d'aïllar els productes es va forçar la precipitació dels compostos amb THF, seguidament es va rentar el sòlid obtingut amb aigua bàsica (pH=10), aprofitant que amb aquestes condicions és més soluble l'àcid fòlic que no ha reaccionat que el producte final de zinc.



**Figura 27.** Espectre de  $^1\text{H-NMR}$   $d_6$ -DMSO del complex Zn(DtFolAq).

En l'espectre de  $^1\text{H-NMR}$  de la **Figura 27** del  $\text{Zn(DtFolAq)}$  es pot observar un pic a 4,8 ppm que correspon als dos protons en posició equatorial de l'anell isonipecòtic, juntament amb l'absència de pics a 2,7 ppm, els quals correspondrien als quatre protons de l'anell succinimidil del reactiu inicial. Aquestes dades suggereixen que el precursor de zinc ha reaccionat completament. D'altra banda, la presència de tots els pics en la zona aromàtica (6,5-9 ppm) corresponents a la biomolècula i l'absència del pic a 1,44 ppm, que s'assignaria a la amina terminal del fòlic lliure, confirma que no queda àcid fòlic sense reaccionar i, per tant, que s'ha donat la bioconjugació del complex de zinc.



**Figura 28.** Espectre de  $^{13}\text{C-NMR}$   $d_6$ -DMSO del complex  $\text{Zn(DtFolAq)}$ .

Les dades del  $^{13}\text{C-NMR}$  del  $\text{Zn(DtFolAq)}$  mostren un pic a 203,1 ppm corresponent al carboni del ditiocarbamat, però la informació més rellevant del espectre és que permet assegurar que la bioconjugació s'ha donat pel grup carboxílic en posició  $\gamma$  enlloc del que està en posició  $\alpha$ , ja que cal recordar que el potencial radiofàrmac només presentarà activitat biològica si es funcionalitza pel grup  $\gamma$ -carboxílic. D'acord amb el treball de C. Bonechi i el seu grup<sup>[74]</sup>, els àcids carboxílics  $\gamma$  i  $\alpha$  en l'àcid fòlic pur apareixen a 174,55 i 174,36 ppm respectivament. En el producte obtingut solament apareix un pic a 173,42 ppm que demostra que l'àcid fòlic només s'ha derivatitzat per només un grup àcid evitant la mescla d'isòmers estructurals. Per esbrinar per quin dels dos s'ha donat la reacció, cal fixar-se en el pic de 51,2 ppm

perquè en el treball de C. Bonechi assignen aquest pic al carboni més proper del  $\alpha$ -carboxílic. Com que després de la reacció el pic no canvia pràcticament de posició, és una dada que indica que la derivatització s'ha donat per l'altre grup carboxílic ( $\gamma$ ), ja que en cas de formació d'una amida el desplaçament hagués estat important. Per acabar, la resta de pics de carboni coincideixen amb els reportats per la bibliografia<sup>[73]</sup>.

Les mateixes conclusions que es poden treure dels  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ -NMR pel complex  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  són aplicables al  $\text{Zn}(\text{DtFolEh})$ . Els espectres mostren l'obtenció del producte i també permeten afirmar que la bioconjugació ha estat selectiva vers el grup  $\gamma$ -carboxílic assegurant així que no afectarà a la seva activitat biològica.

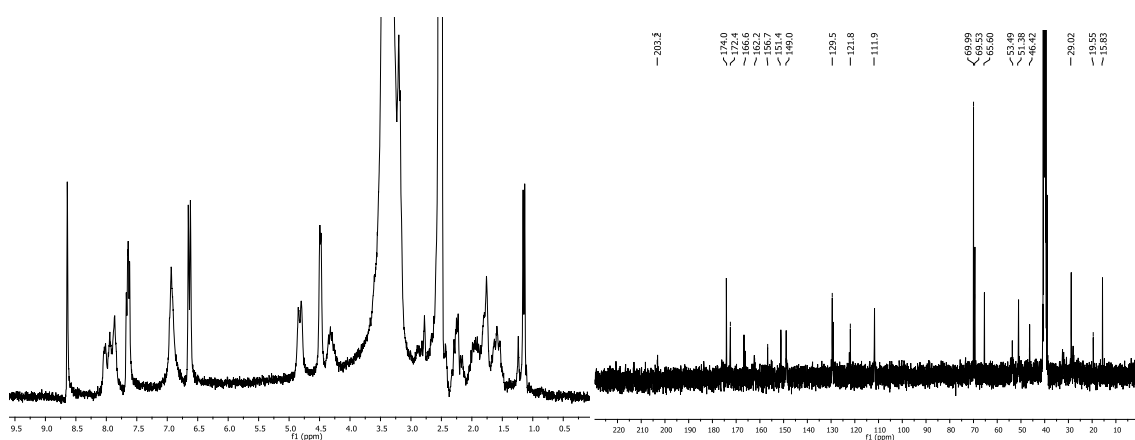


Figura 29. D'esquerra a dreta, espectre de  $^1\text{H}$ -NMR i de  $^{13}\text{C}$ -NMR en  $d_6$ -DMSO del complex  $\text{Zn}(\text{DtFolEh})$ .

Per finalitzar la caracterització dels compostos de zinc es van dur a terme els anàlisis de masses d'alta resolució (ESI-HRMS) per a cada component. La comparació de les masses moleculars exactes teòriques i experimentals concorden amb l'estructura del zinc amb un lligand ditiocarbamat.

Com que els complexos de zinc s'han de fer servir per aplicacions en radiofarmàcia, és important que els productes tinguin una elevada puresa per evitar reaccions secundàries que es puguin donar entre les impureses i el tecneci tricarbònic. Aquest fet és d'especial importància perquè les concentracions de tecneci són tan baixes que impureses que es podria considerar molt minoritàries podrien competir amb la reacció de transmetal·lació [2+1] de manera molt significativa. Per aquest motiu es va avaluar la puresa dels compostos  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  i  $\text{Zn}(\text{DtFolEh})$

mitjançant anàlisi elemental (**Taula 1**). Els valors teòrics i experimentals són coherents quan es té en compte la presència d'aigües d'hidratació.

		%C	%H	%N
<b>Zn(DtFolAq)·3H<sub>2</sub>O</b>	Experimental	48,8	5,82	17,5
	Teòric	48,9	5,65	17,8
<b>Zn(DtFolEh)·2H<sub>2</sub>O</b>	Experimental	47,6	5,54	17,1
	Teòric	47,5	5,36	17,3

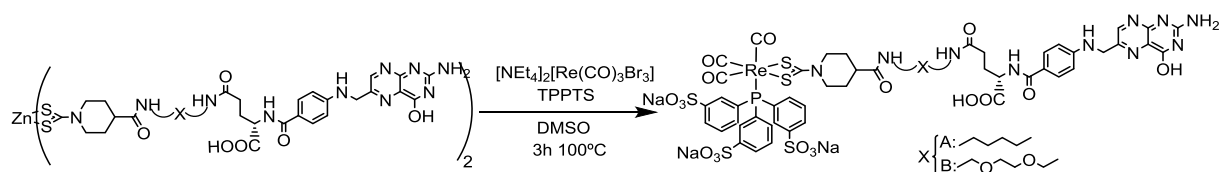
**Taula 1.** Resultats dels anàlisis elementals dels complexos del Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh)

### 3.3.3. Síntesi dels complexos Re(DtFolEh)TPPTS i Re(DtFolAq)TPPTS

Després d'haver obtingut i caracteritzat els precursors de zinc amb l'àcid fòlic satisfactòriament, es va procedir a sintetitzar els respectius complexos de reni (Re(DtFolEh)TPPTS i Re(DtFolAq)TPPTS).

Per les mateixes raons que el complex [Re(DtGlu)TPPTS], es va escollir la TPPTS com a lligand monodentat donat que les dues biomolècules poden ser interessants per l'aplicació en diagnòstic de càncer. A la bibliografia ja s'han descrit complexos per a radiofarmàcia que combinen l'àcid fòlic amb la TPPTS obtenint bons resultats d'internalització en les cèl·lules cancerígenes<sup>[75,76]</sup>.

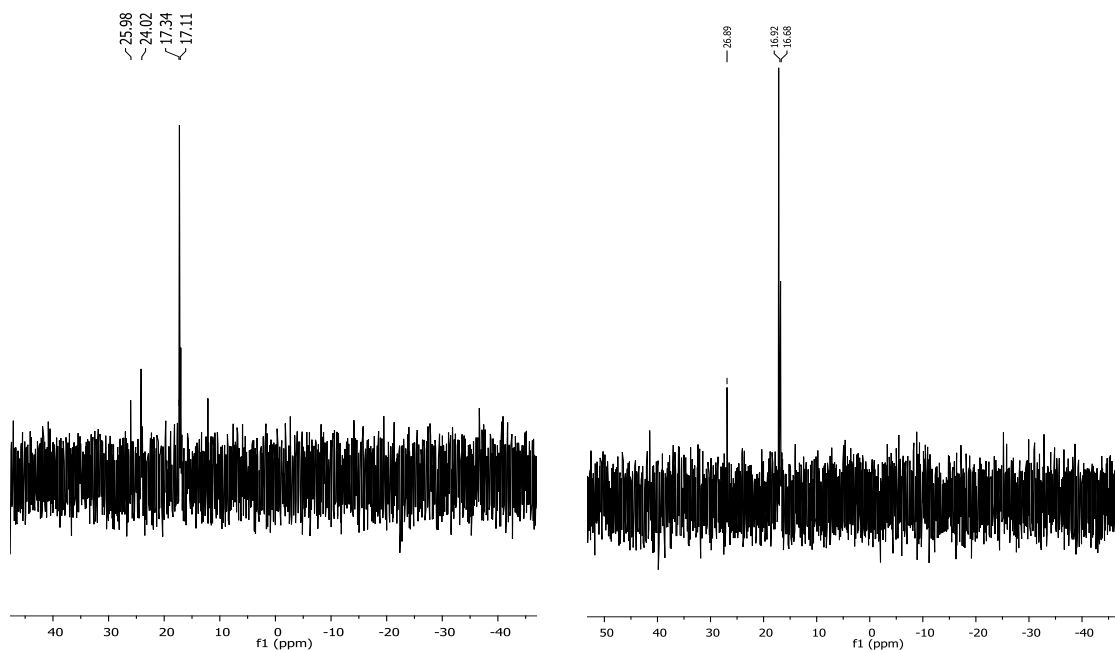
La reacció de transmetal·lació és similar a les descrites en aquest capítol (3.1.1.), l'únic canvi és el dissolvent, es va emprar DMSO per tal de dissoldre els precursors de zinc.



**Equema 14.** Reacció de transmetal·lació [2+1] dels complexos de zinc, Zn(DtFolAq) i Zn(DtFolEh), el complex  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  i la TPPTS.

El procediment experimental consisteix en dissoldre en DMSO el complex de zinc bioconjugat amb el fòlic corresponent i la salt de reni en el mínim volum de dissolvent. Seguidament la mescla s'escalfar a 100 °C durant una hora, s'addiciona la TPPTS i es va deixa reaccionar durant 3 hores addicionals. El producte s'aïlla per filtració després de forçar la precipitació amb una mescla d'etanol i metanol.

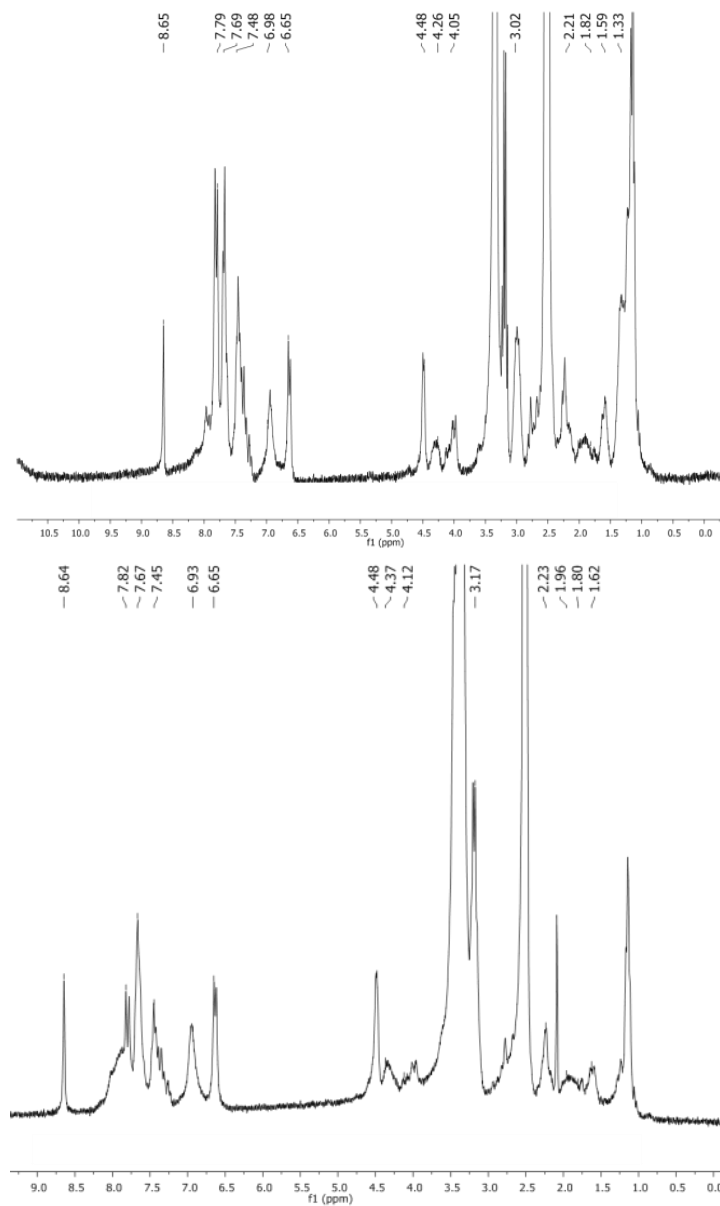
Una vegada més l'espectroscòpia  $^{31}\text{P}$ -NMR és molt útil per analitzar aquesta reacció, ja que ens permet determinar la presència de TPPTS coordinada, sense reaccionar o si està oxidada. En cada espectre s'observen els dos isòmers de l'estructura a valors propers als 17 ppm (veure apartat 3.1.1.). En el mateix espectre també apareix un altre pic a 26,7 ppm que correspon a la fosfina oxidada. Com passava amb el complex de reni amb la glucosamina, tenir una impuresa no suposarà un problema important sempre i quan sigui possible determinar el temps de retenció de cada complex de reni. D'altra banda, en l'espectre del  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  també s'observa un pic a 24 ppm que s'associa a un subproducte que no conté el lligand ditiocarbamat i que és el resultat de la reacció directa entre el tricarbonil de reni amb la TPPTS.



**Figura 30.** Espectre de  $^{31}\text{P}$ -NMR en  $d_6$ -DMSO dels complexos  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  (esquerra) i  $\text{Re}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  (dreta).

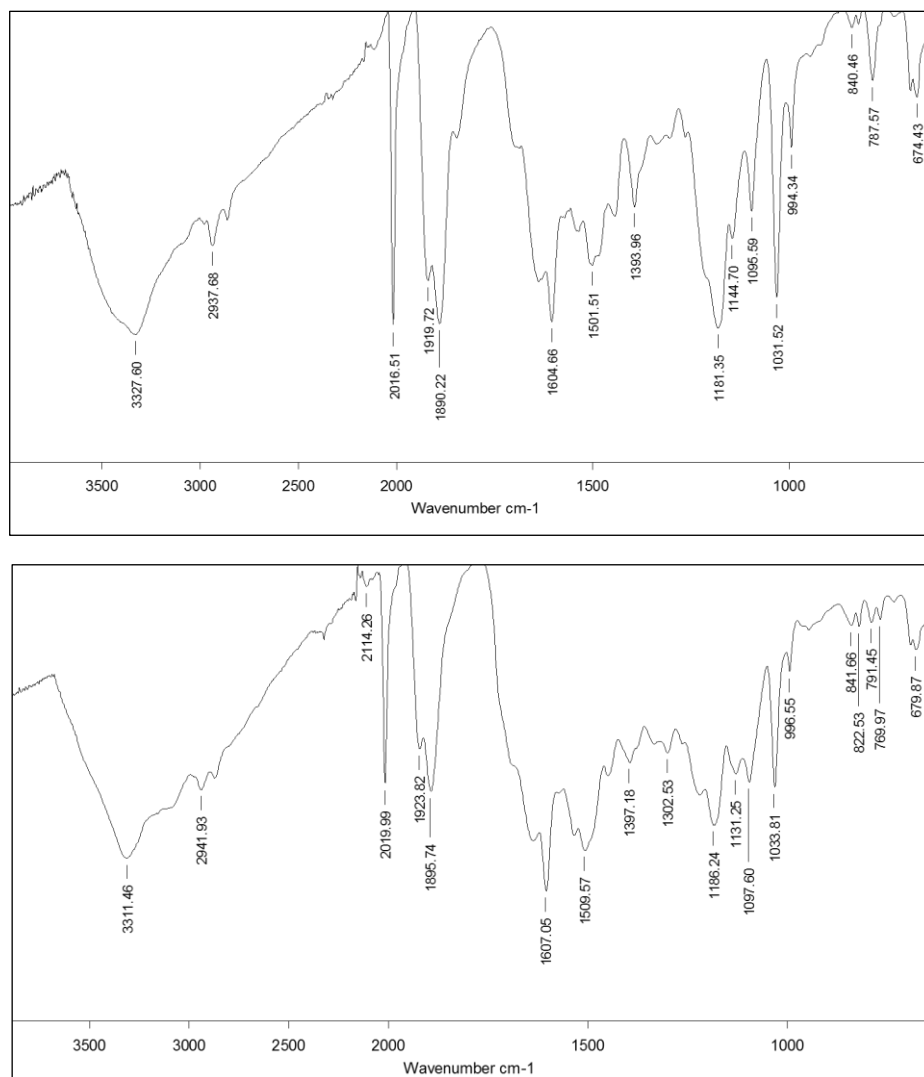


L'espectre  $^1\text{H-NMR}$  també és coherent amb la formació del complex ja que s'observa el desplaçament d'uns 0,7 ppm característics de la transmetal·lació ( 3.1.3.).



**Figura 31.** De d'alt a baix, espectre de  $^1\text{H-NMR}$  en  $d_6\text{-DMSO}$  dels complexos  $\text{Re}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  i  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ .

En l'espectre de infraroig (**Figura 32**) s'observen altre cop les bandes de vibració dels carbonils a  $2016\text{-}2019\text{ cm}^{-1}$ ,  $1923\text{-}1980\text{ cm}^{-1}$  per cada complex i l'absència dels pics corresponents al precursor  $[\text{NEt}_4][\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  a  $1846\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 32.** Espectres de IR-ATR dels complexos Re(DtFolEh)TPPTS (superior) i Re(DtFolAq)TPPTS (inferior).

Tot i que es desconeixen els motius, en els espectres de  $^{13}\text{C}$ -NMR dels productes de reni bioconjugats amb el folic (veure *Support Information*) moltes bandes no s'observen, això podria ser degut a les característiques de la molècula o al viscositat del dissolvent, que d'alguna manera afecten als temps de relaxació dels nuclis de carboni dificultant la seva detecció. No obstant, si que es detecten pics prou representatius per indicar la correcta bioconjugació del metall.

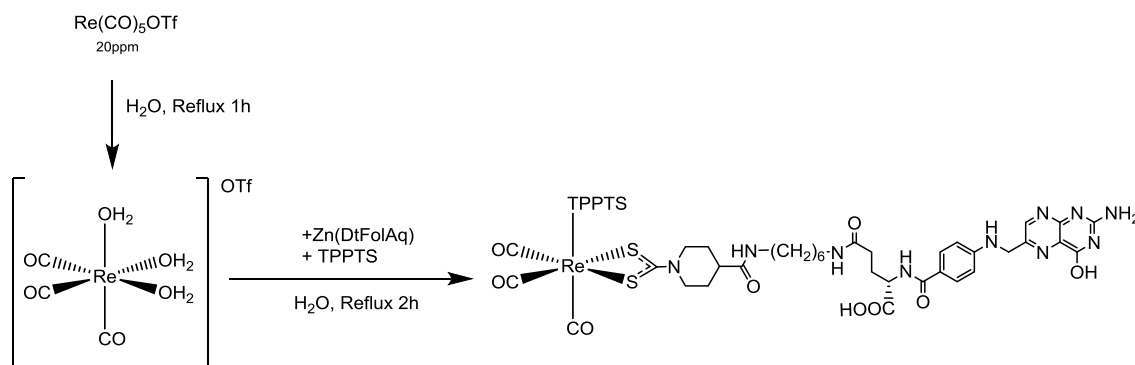
Per finalitzar la caracterització el complex de Re(DtFolAq)TPPTS es va analitzar per ESI-HRMS en polaritat negativa, els resultats van mostrar dos pics majoritaris a 995,2196 m/z i 1541,1226 m/z. El primer es va assignar a l'estructura esperada sense

el lligand TPPTS i el segon és la massa exacte del  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  en acord de amb l'estequiometria proposada amb un àtom de sodi menys:  $[\text{ReC}_{53}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{S}_5\text{Na}_2\text{P}]^-$ .

### 3.3.4. Reacció de transmetal·lació en pseudocondicions de radiofarmàcia

Tot i que la reacció de transmetal·lació entre el  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  i el  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  funciona perfectament en medis orgànics, es va estudiar si aquest també era viable en condicions similars a les de radiofarmàcia: 1) baixes concentracions del precursor de reni  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  i 2) reacció en medi aquós.

Per aconseguir unes condicions similars que la reacció amb tecneci, enlloc de fer reaccionar el  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  com a les reaccions anteriors, es va generar *in situ* el precursor  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  en dissolució aquosa a una concentració aproximada de 20 ppm ( $\sim 10^{-5}\text{M}$ ).



**Esquema 15.** Reacció de transmetal·lació en pseudoconcentracions radiofarmacèutiques per l'obtenció de  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ .

Per obtenir el complex de reni homòleg de tecneci  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  es va seguir el procediment descrit pel grup de Luigi Marzilli<sup>[77]</sup>. Es comença amb un suspensió de concentració coneguda del complex  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{OTf}$  ( $\text{OTf} = \text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) en medi aquós, es dur a reflux durant una hora, transcorregut aquest temps s'obté una solució nítida que conté el  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ . Seguidament, s'hi va afegir una suspensió de  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  i es mantenen una hora addicional de reflux moment en que s'hi va afegir la TPPTS durant una hora més.

La suspensió resultant es va centrifugar i una alíquota del sobrenedant es va portar al Servei d'Anàlisi Químic per ser analitzada amb ESI-HRMS en polaritat negativa. Tot i treballar a una concentració molt baixa de reni, es va poder observar clarament un pic a 1541,1186 m/z amb una distribució isotòpica concordant amb l'estequiometria  $[\text{ReC}_{53}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{S}_5\text{Na}_2\text{P}]^-$  del complex  $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  amb la pèrdua d'un àtom de sodi. Aquest resultat reforça la idea de que el  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  podria ser apropiat per l'obtenció del respectiu homòleg de tecneci, a més a més cal afegir que, donat que els compostos de reni són cinèticament més inerts que els de tecneci, aquesta reacció hauria de ser encara més favorable amb el precursor  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .



## 4. ESTUDIS AMB TECNECI-99m

Després de sintetitzar satisfactòriament els complexos de reni es va procedir a realitzar les síntesis per obtenir els corresponents homòlegs de tecneci-99m. En aquest capítol es mostren els resultats més rellevants relacionats amb els estudis radiosintètics dels potencial radiofàrmacs, els experiments d'estabilitat i estudis *in vivo* i *in vitro*. Aquests últims es van dur a terme al BARTS Cancer Institute, centre associat a la Queen Mary University of London (QMUL), sota la supervisió de la Dra. Jane Sosabowski.

### 4.1. Estudis de solubilitat dels compostos de zinc

Com s'ha mencionat en la introducció (1.1.6.), l'activitat específica de la nostra metodologia depèn de la concentració de complex de zinc bioconjugat en solució aquosa, com més baixa sigui aquesta, menor la concentració de biomolècules sense marcar afavorint que el complex de tecneci-99m arribi al receptor diana. Seguint aquesta lògica, a continuació es determina la solubilitat en aigua de cada complex de zinc per poder calcular la concentració de biomolècules dissoltes en la reacció, valor que servirà per poder quantitzar l'activitat específica final del potencial radiofàrmac en el moment de ser injectat.

La solubilitat de cada complex de zinc es va determinar mesurant la concentració del metall mitjançant espectroscòpia de emissió atòmica de plasma acoblat inductivament (ICP-OES) al Servei d'Anàlisi Química de la UAB. Seguint el procediment descrit en l'article del Dr. Joan Lecina<sup>[32]</sup>, es preparen solucions saturades dels complexos de zinc a 40 °C, escalfant una dispersió dels sòlids en aigua amb agitació durant 1 hora. Després de deixar refredar la solució,

Complex	Solubilitat (ppm)
Zn(DtGlu)	11
Zn(DtPip)	0,98
Zn(DtFolAq)	0,61
Zn(DtFolEth)	<0,2

**Taula 2.** Solubilitat de tots els complexos de zinc bioconjugats. Determinació obtinguda mitjançant ICP-OES.

es centrifuga la mostra i seguidament la solució es filtra per tal d'assegurar que no hi hagi cap micropartícula sòlida en la mostra per l'anàlisi. Després d'una digestió amb  $\text{HNO}_3$  la mostra és analitzada al ICP-OES. A la **Taula 2** es mostren els resultats obtinguts que són coherents amb les solubilitats previsibles segons la polaritat de la funcionalització dels complexos de zinc. La solubilitat en medi aquós més alta la presenta el complex  $\text{Zn}(\text{DtGlu})$  que, al tenir molts grups hidroxílics, és aproximadament d'un ordre de magnitud major que en els altres tres compostos. Mentre que és d'esperar la baixa solubilitat del complex amb la piperazina perquè és una molècula relativament apolar, no són tant previsibles els valors baixos obtinguts pels derivats de fòlic que tenen diversos grups polars en l'estructura, tan és així que inclús pel  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  està per sota del límit de detecció del ICP-OES. Una possible explicació podria ser que al tractar-se de molècules relativament grans són difícils de solvatar. Sempre i quan la reacció de transmetal·lació amb tecneci-99m sigui possible, cal recordar que aquests valors baixos són un clar avantatge per l'activitat específica del potencial radiofàrmac. A més a més, com que l'activitat específica ve determinada per la radioactivitat en funció del número de molècules sense marcar, aquesta també es pot augmentar si es treballa amb altes activitats de tecneci-99m en el moment de la radiosíntesi.

## 4.2. Compostos de tecneci-99m

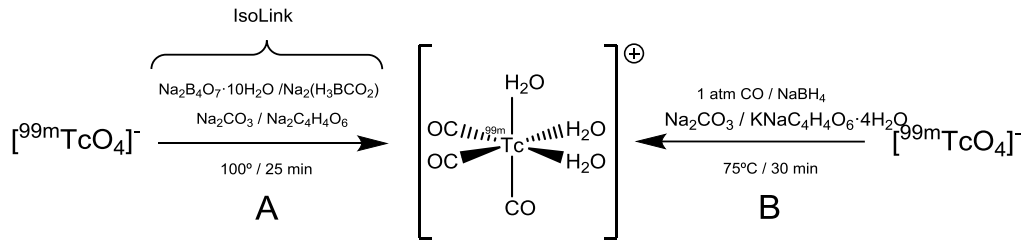
Com s'ha comentat en altres apartats (Introduction, 1.1.6.), no és possible caracteritzar els compostos de tecneci-99m mitjançant les tècniques habituals com RMN o IR degut a les baixes concentracions del tecneci en aplicacions en medicina nuclear. Per aquest motiu la manera més habitual de treball és mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució de fase reversa acoblat a un radiodetector (en anglès RP-HPLC). Breument, la metodologia consisteix en injectar la mostra en el radiocromatograf, i analitzar el temps de retenció del complex de Tc-99m i seguidament es compara amb l'obtingut en el compost homòleg de reni, la senyal del qual s'ha obtingut amb un detector UV-Vis. Tot i la simplicitat del mètode, quan es

treballa amb compostos a una concentració tant baixa ( $\approx 10^{-7}$ - $10^{-8}$  M) s'ha de tenir en compte certs aspectes que sovint no es tenen presents quan es treballa amb quantitats i concentracions més comunes en química. Per exemple, a concentracions tan baixes fenòmens com els de l'adsorció superficial es poden posar de manifest, en alguns casos els productes es poden quedar retinguts en el material de plàstic com els tubs del RP-HPLC. Per altra banda, en tot moment s'ha de tenir cura de tenir una activitat prou alta perquè els complexos puguin ser detectats en el RP-HPLC.

#### 4.2.1. Síntesi de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Les síntesis dels potencials radiofàrmacs es duen a terme amb el tricarbonil de tecneci ( $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ) com a precursor. Per obtenir-lo es poden seguir dues estratègies diferents descrites en l'**Esquema 16**. La primera (A) consisteix en emprar el kit anomenat IsoLink desenvolupat pels descobridors del mateix tricarbonil de tecneci<sup>[27]</sup>, que conté una pastilla amb  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2(\text{H}_3\text{BCO}_2)$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  (tartrat de sodi)<sup>[78]</sup>. El procediment de preparació consisteix en afegir a aquest vial la solució de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  i escalfar durant 25 min a 100 °C. El segon mètode (B), més econòmic perquè no cal adquirir els kits, consisteix en dur a terme la reacció sota atmosfera de monòxid de carboni entre la solució de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , el reductor  $\text{NaBH}_4$ , la base  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i l'àcid tartàric com a agent quelant<sup>[79]</sup>. El  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  s'obté després d'escalfar a 75 °C durant 30 minuts. Pels dos casos la solució final és bàsica motiu pel qual el pH s'ha d'ajustar a pH neutre per poder dur a terme la reacció de transmetal·lació. La diferència més destacable entre els dos mètodes és que en el cas del IsoLink els carbonils es formen *in situ* per la descomposició del  $\text{Na}_2(\text{H}_3\text{BCO}_2)$ . Els resultats són molt similars fent servir ambdues estratègies tot i que és una mica més reproducible la A perquè no cal treballar en una atmosfera de monòxid de carboni.





Esquema 16. Dues possibles estratègies per l'obtenció del  $[{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .

#### 4.2.2. Procediment general per la síntesi de complexos de Tc-99m

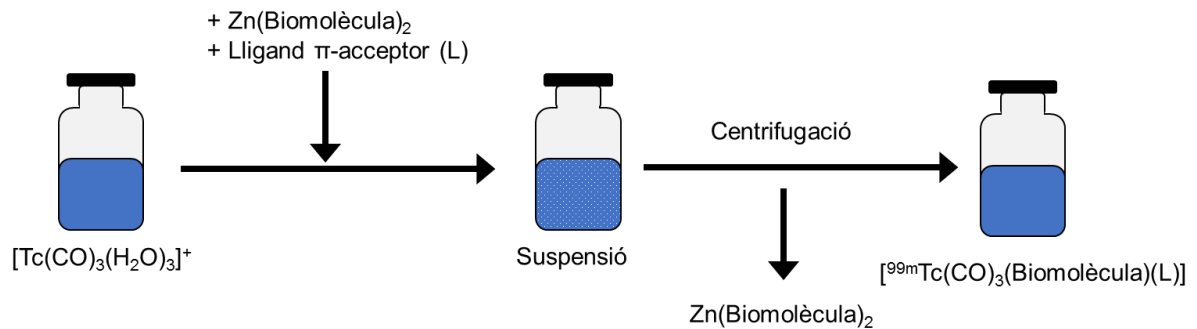


Figura 33. Esquema del procediment general per l'obtenció del complexos de tecneci-99m.

La metodologia es representa esquemàticament en la **Figura 33** i consisteix en primerament sonicar durant un mínim deu minuts una suspensió del corresponent complex de zinc per disminuir la mida de partícula, a fi d'augmentar la superfície de zinc sòlid i afavorir la reacció de transmetal·lació. En una solució de  $[{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  s'hi afegeix la suspensió de complex de zinc i una dissolució de concentració coneguda del lligand monodentat. Només en el cas del *tert*-butil isocianat es va haver d'afegir en una solució d'etanol, perquè, al ser tan poc soluble en aigua, no era possible preparar una solució de concentració perfectament coneguda. És important destacar que en la preparació de radiofàrmacs de tecneci, es pot fer servir etanol com a dissolvent sempre i quan la concentració en solució aquosa final sigui inferior al 5%.

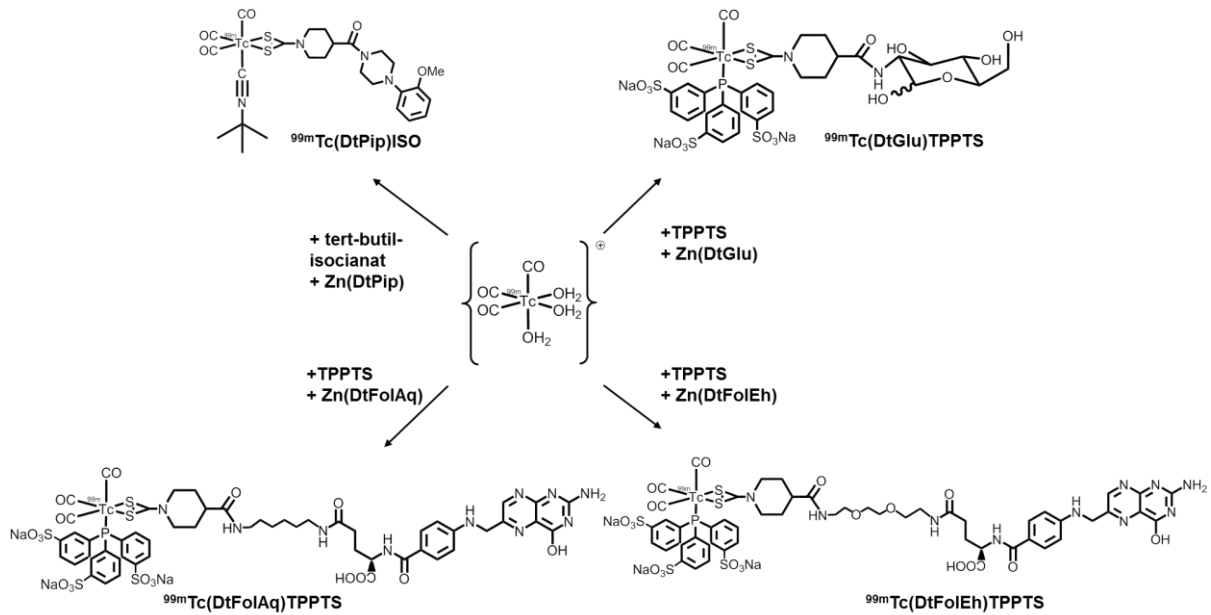
La reacció té lloc en un rang de temperatures entre 40-60 °C, després de refredar la suspensió resultant a temperatura ambient, es centrifuga per separar el

complex de zinc sòlid del sobrenedant. Finalment, aquest últim s'injecta a l'RP-HPLC i es compara els temps de retenció amb del complex homòleg de reni.

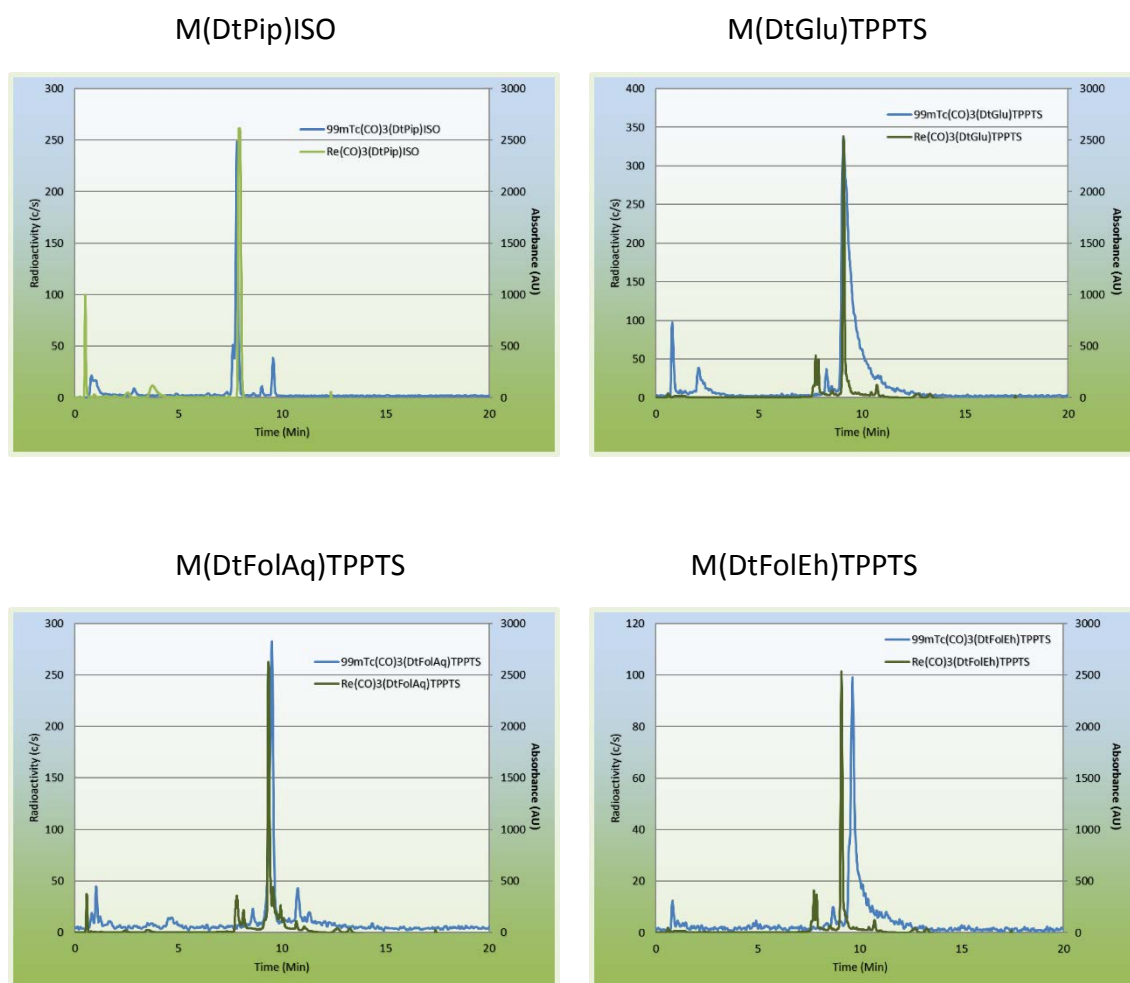
Com es pot constatar en aquesta descripció, el procediment experimental permet l'obtenció del potencial radiofàrmac d'una manera senzilla i sense la necessitat de purificar-lo en acabar la reacció, avantatges importants si es pensa en fer un *kit* per radiofarmàcia. A més, el fet que les temperatures de reacció siguin suaus permet emprar aquest mètode en biomolècules que poden ser inestables a temperatures més elevades.

Un punt clau és la monitorització de la reacció mitjançant l'RP-HPLC. Per a compostos similars als estudiats és habitual treballar amb un columna de fase reversa. Aquesta consisteix en una columna apolar formada per cadenes de 18 carbonis que provoca que les primeres espècies en eluir siguin les més polars com el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  o el  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ . D'altra banda, també és típic emprar un gradient amb dos fases diferents, una aquosa amb trifluoroacètic (TFA) ( $\approx 0,1\%$ ) i l'altre orgànica, típicament acetonitril (ACN) o metanol (MeOH) amb TFA ( $\approx 0,05\%$ ). A l'inici de la cromatografia la fase és majoritàriament aquosa, a mesura que avança el temps d'anàlisi, es va augmentant la proporció de fase orgànica per aconseguir l'elució d'aquelles molècules que interaccionen més fortament amb la columna, és a dir, les més lipofíliques com els radiocomplexos bioconjugats. Aquesta forma de treball permet una bona separació entre els pics dels precursors de Tc-99m i els productes de tecneci bioconjugats.

Les reaccions es van fer per totes les quatre biomolècules disponibles (**Esquema 17**) amb presència del corresponent complex de zinc i el lligand monodentat.



Els següents gràfics es mostren els temps de retenció de cada un dels compostos de reni i el seu homòleg de tecneci. En l'eix d'ordenades esquerra apareixen la lectura de l'activitat (comptes per segon o c/s), és a dir la radioactivitat que prové de tots els derivats del tecneci-99m, mentre que en l'eix de la dreta l'absorbància atòmica per detectar els compostos de reni. El RP-HPLC permet d'una forma ràpida i senzilla saber si tenim el producte esperat, a més, si es fan reaccionar les molècules implicades en la reacció per separat, també permet identificar els subproductes de la reacció. Per exemple, si fem la reacció sense presència del ditiocarbamat de zinc, els pics que apareixen en el cromatograma correspondran a complexos entre el tricarbonyl de tecneci i el lligand monodentat. Aquesta pràctica és molt habitual i senzilla alhora d'optimitzar les condicions com ara les concentracions dels lligands.



**Figura 34.** Cromatogrames obtinguts de tots els compostos de  $^{99m}\text{Tc}$  i  $\text{Re}$ . L'ordre de dalt a baix i d'esquerra a dreta corresponen als complexos;  $\text{M}(\text{DtPip})\text{ISO}$ ;  $\text{M}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ;  $\text{M}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ ;  $\text{M}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ , on  $\text{M}=\text{Re}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ .

Es pot observar com en els quatre casos els temps de retenció entre el complex de tecneci-99m i l'homòleg de reni són pràcticament iguals permetent concloure que, malgrat que les concentracions dels precursors de zinc són molt baixes, per a tots els complexos de zinc la reacció de transmetal·lació [2+1] ha permès biconjugar el ditiocarbamat funcionalitzat al fragment  $\text{fac-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ .

Quan es tracte de productes radiosintètics és important calcular la radiopuresa dels compostos obtinguts, aquesta es defineix com a percentatge de la relació entre l'àrea del pic de tecneci bioconjugat i l'àrea total de tots els pics del cromatograma. Aquest valor en tots els compostos sintetitzats ha estat molt elevat, el més baix es va obtenir per la piperazina, aproximadament d'un 85%, mentre que les més altes van ser

al voltant del 98% per a la resta de compostos, valors excel·lents per aplicacions en radiofarmàcia perquè garanteixen que tot el tecneci sigui bioconjugat després de la reacció i, per tant, assegura que tota l'activitat tingui un vector per ser acumulat específicament al teixit o òrgan objectiu.

Tot i que els resultats que es mostren són molt bons, quan es va començar a treballar amb tots aquests radiocompostos es van tenir molts problemes de reproductibilitat. Com que el fragment  $fac\text{-}\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  té cert caràcter lipofílic i, els resultats més reproduïbles s'obtenien pel producte més polar (el de la glucosamina), primer es va pensar que els productes es podien quedar retinguts en els plàstics on es duïen a terme les reaccions. Per aquesta raó, la primera mesura que es va adoptar va ser evitar treballar amb material de plàstic substituint-lo tot per vidre. Malgrat que el canvi va suposar una millora dels resultats, encara no es va aconseguir una alta reproductibilitat. Finalment, aquest problema es va poder resoldre quan es va canviar la fase mòbil d'acetonitril amb trifluoroacètic per una que conté el *buffer* TEAP<sup>[80]</sup> (fosfat de trietilamoni), després d'aquest subtil canvi els resultats van esdevenir totalment reproduïbles i la reacció es va controlar perfectament. Amb la influència del TEAP es va deduir que el problema estava en que els productes es quedaven fortament retinguts en la columna del RP-HPLC o en els tubs d'aquest. Tot i que no és del tot clar perquè els productes interaccionen menys amb la fase estacionària sota aquestes noves condicions, la nostra hipòtesis és que les altes concentracions de sals en la nova fase mòbil provoquen una elevada força iònica que, d'alguna manera ajuden en l'elució dels radiocompostos. Totes els protocols de les fases mòbils emprades per a cada compost es poden veure a *Support Information*.

### 4.3. Estabilitat dels radiocomplexos

Hi ha un ampli ventall de protocols que permeten fer una estimació de com es comportaran els potencials radiofàrmacs en condicions *in vivo*<sup>[81,82]</sup>. Els que es van escollir van ser l'estudi d'estabilitat dels compostos bioconjugats de tecneci en

presència d'aminoàcids i els estudis en sèrum de sang de ratolí, per simular les proteïnes que es troben presents a la sang i avaluar així la interacció entre aquestes i els radiocompostos. Si aquests resultats són favorables, és raonable pensar que el potencial radiofàrmac probablement sigui estable dins de l'organisme.

#### 4.3.1. Estabilitat del sistema *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(SS)(P)] en cisteïna

És molt comú començar amb la cisteïna com a aminoàcid per les proves d'estabilitat ja que al tenir un grup tiol a l'estructura és un dels aminoàcids que tenen una gran capacitat de provocar reaccions de substitució dels lligands amb els nostres complexos de Tc-99m<sup>[83,84]</sup>. Per avaluar l'estabilitat del sistema *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(SS)(P)], s'han fet les proves pel radio complex [<sup>99m</sup>Tc(DtGlu)TPPTS] i els dos complexos [<sup>99m</sup>Tc(DtGly)PPh<sub>3</sub>] i [<sup>99m</sup>Tc(DtAla)PPh<sub>3</sub>] descrits en un treball anterior<sup>[32]</sup> i que també es van voler sotmetre a aquest estudi (Introduction, 1.1.6.).

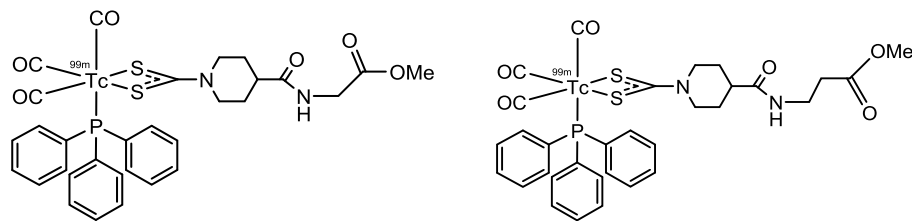


Figura 35. D'esquerra a dreta els compostos [<sup>99m</sup>Tc(DtGly)PPh<sub>3</sub>] i [<sup>99m</sup>Tc(DtAla)PPh<sub>3</sub>].

La metodologia experimental consisteix en sintetitzar els respectius compostos i afegir-los a una dissolució de cisteïna 5mM en PBS. Aquesta solució s'incuba a 37°C i, a cada hora, fins a un total de 4, s'extreu una alíquota que és analitzada per RP-HPLC. Amb cada radiocromatograma obtingut es calcula quin percentatge del radiocompost roman inalterat.

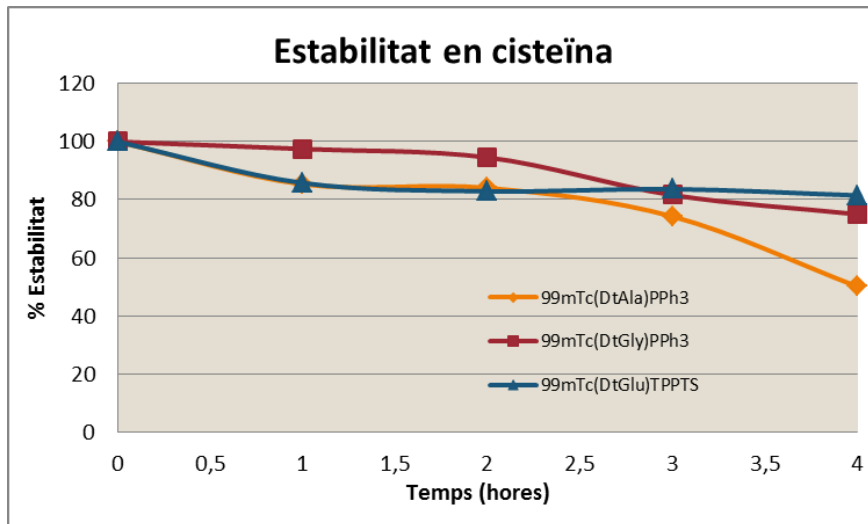


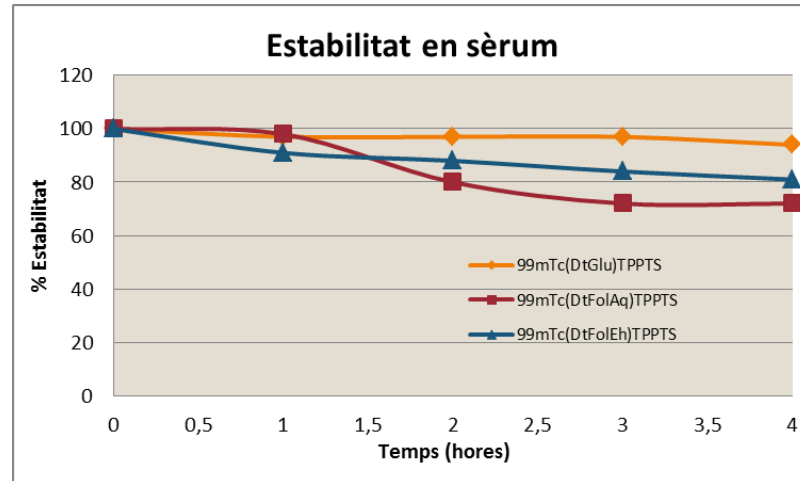
Figura 36. Gràfic de l'estabilitat de  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGly})\text{PPh}_3$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtAla})\text{PPh}_3$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ .

Tal com s'observa en la gràfica els tres compostos són molt estables fins a 2 hores, passat aquest temps l'estabilitat disminueix una mica, essent més pronunciat el canvi amb el complex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtAla})\text{PPh}_3$ . D'aquest estudi se'n conclou que l'entorn de coordinació *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})$  és tan estable que resta gairebé inalterat en presència d'un dels aminoàcids més coordinants que es troben a la natura com és la cisteïna ja que la coordinació del metall no s'altera significativament en els complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGly})\text{PPh}_3$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtAla})\text{PPh}_3$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ .

#### 4.3.2. Estabilitat dels compostos de Tc-99m en sèrum de ratolí

Seguint la mateixa idea d'avaluar l'estabilitat dels compostos usant sistemes models dels organismes, en aquest apartat es mostren els estudis en sèrum de ratolí. Aquests experiments també ens donen informació addicional per esbrinar la quantitat de compost que queda retingut en les proteïnes presents en la sang<sup>[85]</sup>. Aquest valor és de rellevant importància perquè està relacionat amb la biodistribució del potencial radiofàrmac. Si la interacció amb les proteïnes de la sang és elevada, els radiocompostos no arribaran al teixits diana i acabaran se'n destruïts en el fetge de l'organisme<sup>[86]</sup>. L'estudi es va dur a terme per aquells complexos amb potencial aplicació en diagnòstic de càncer ( $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i

$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  ) ja que, com es veurà més endavant, seran estudiat *in vivo*, i per tant, la seva interacció amb el sèrum es d'espacial importància. Els resultats que es mostren a continuació estan expressats com a percentatge de complex que resta inalterat en funció del temps.



**Figura 37.** Gràfic on es mostra l'estabilitat dels compostos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  en sèrum de ratolí.

Els resultats obtinguts (**Figura 37**) demostren que els complexos amb de tecneci amb la TPPTS i el lligand ditiocarbamat són molt estables almenys durant un període de 4 hores. Aquest estudi suggereix que els potencials radiofàrmacs seran suficientment estables dins del torrent sanguini d'un organisme. Aquests resultats tan favorables, obren la porta a poder realitzar els experiments *in vivo* amb garanties de que els radiocomplexos no seran desestabilitzats, i per tant, de que tota l'activitat acumulada en els òrgans provingui exclusivament dels nostres potencials radiofàrmacs, i no de derivats de tecneci-99m que es puguin formar després de ser degradats dins l'organisme.

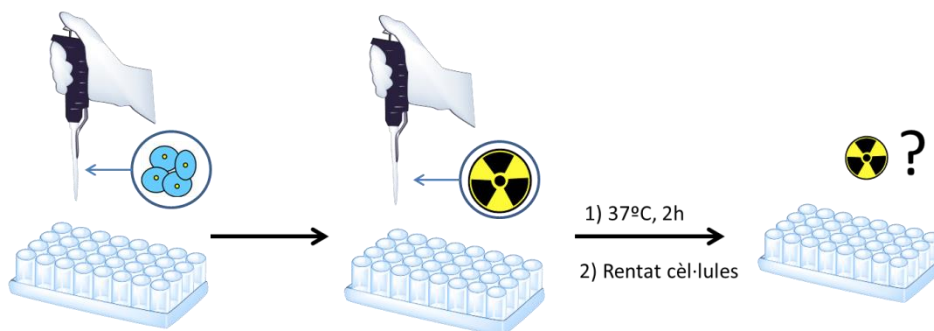
D'altra banda, l'altre informació important d'aquests estudis és l'avaluació de la interacció entre les proteïnes de la sang i els complexos. Quan es mesurava l'activitat total de complex en presència de proteïnes i l'activitat després de centrifugar i extreure el sobrenedant, en el pèl·let proteic quedava un 25% de l'activitat respecte la inicial, és a dir la major part de complex no es quedava retingut en la fracció proteica.



#### 4.4. Experiments *in vivo*

Per tenir una estimació de l'activitat biològica dels radiocomplexos es van portar a terme els assajos d'unió amb cèl·lules (*cell binding assays*). Primerament s'ha d'escollir la línia cel·lular més adient per estudiar el radiocompost en qüestió, per tant s'ha d'emprar una línia que contingui els receptors dianes clarament sobreexpressats.

Per a tots els radiocomplexos estudiats la manera de treball és la mateixa, la **Figura 38** mostra un esquema general d'aquests experiments.



**Figura 38.** Resum esquemàtic dels experiments d'unió cel·lular.

En primer lloc s'han cultivat la pertinent línia cel·lular per a cada experiment. Quan es disposa d'un cultiu on la confluència (percentatge de superfície ocupat per les cèl·lules) és aproximadament del 80% es procedeix a treure les cèl·lules del flascó de cultiu amb tripsina. El següent pas és determinar la viabilitat cel·lular (nombre de cèl·lules vivies per mil·lilitre) que consisteix en comptar quantes cèl·lules resten vivies amb el microscopi. Això es duu a terme amb un tint especial que dona color a aquelles cèl·lules que estan mortes, mitjançant un càlcul simple es quantifica el número de cèl·lules vivies per mil·lilitre. Abans de començar els assajos d'unió es van incubar les cèl·lules amb els compostos de tecneci-99m a diferents temps per saber quin era el temps d'incubació òptim, els millors resultats per totes les línies va ser de dues hores aproximadament.

Per a treure el màxim d'informació de l'activitat biològica l'assaig d'unió es divideix en tres grups experimentals, cada una de les mostres es va fer per triplicat:

- 1- Activitat en funció de la concentració de cèl·lules: en 5 pous amb diferents concentracions de cèl·lules s'addiciona la mateixa quantitat del radiocomplex corresponent i es deixen incubar durant un temps determinat. Seguidament es renta el pèl·let de cèl·lules per arrossegar el tecneci-99m que no s'ha unit i es mesura l'activitat final restant en el pèl·let amb el comptador gamma.
- 2- Assaig de bloqueig: aquest experiment serveix per saber si l'activitat que resta en les cèl·lules ha estat deguda a la unió directe entre el radiocomplex i els receptors diana, i no pas a un procés inespecífic com podria ser una interacció entre el radiocomplex i la membrana cel·lular.

Breument, a una quantitat coneguda de cèl·lules, s'addiciona una solució de biomolècula freda per saturar els receptors, glucosa per  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  o àcid fòlic pels complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ . Tot seguit s'addiciona el corresponent complex de tecneci-99m, es renta el pèl·let i es comptabilitza l'activitat final. Si el potencial radiofàrmac s'uneix de manera específica al receptor, l'activitat final hauria de ser més baixa en absència de molècula freda perquè tots els receptors han estat bloquejats impedit que el radiocompost interaccionés específicament amb els receptors.

- 3- Control: en una solució de PBS s'afegeix la mateixa quantitat de Tc-99m que l'afegida en tots els altres experiments i, sense cap altre tractament, es llegeix l'activitat al comptador gamma. El valor obtingut correspon a l'activitat inicial de radiocomplex afegida en totes les altres mostres d'aquest assaig, d'aquesta manera, els resultats de consum cel·lular es podran expressar com a percentatge de l'activitat final en cada mostra respecte l'activitat inicial afegida.

Al treballar amb cèl·lules és típic fer servir el *buffer* PBS, però en aquests experiments també es va afegir la proteïna BSA (*bovine serum albumine*) per disminuir

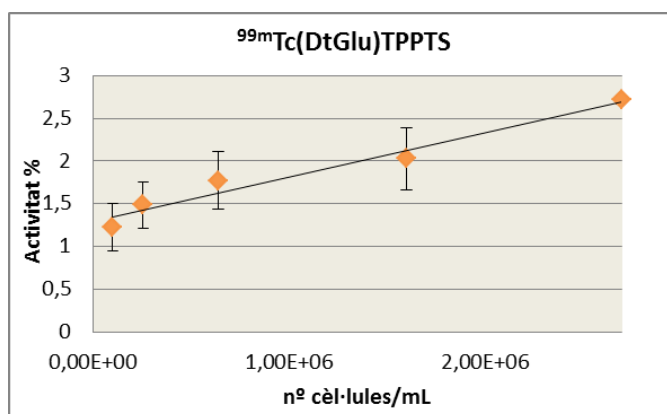
la interacció inespecífica. En altres paraules, per evitar que els radiocompostos siguin adherits a la membrana cel·lular ja que la presència de la proteïna afavoreix que els radiocomplexos es quedin retinguts en la BSA en lloc de la membrana de les cèl·lules (veure procediment experimental a *materials and methods*).

Com en el cas dels estudis d'estabilitat en sèrum, els experiments *in vitro* es van realitzar per a aquells compostos amb potencial aplicació en diagnòstic de càncer i que, en el final del capítol, seran estudiats en experiments de biodistribució *in vivo*.

#### 4.4.1. Assajos d'unió cel·lular del complex $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$

El primer complex estudiat va ser el bioconjugat amb la glucosamina, al ser una biomolècula similar a la glucosa, la línia cel·lular que es va escollir havia de contenir els receptors GLU-1 sobreexpressats. Després d'una cerca bibliogràfica, es va comprovar que la A431, carcinoma d'epidermis, és una de les línies més estudiades per experiments semblants<sup>[84,85]</sup>. A part de la clara sobreexpressió dels receptors d'interès, també va ser un avantatge el fet que es tracti d'una línia resistent i fàcil de manipular.

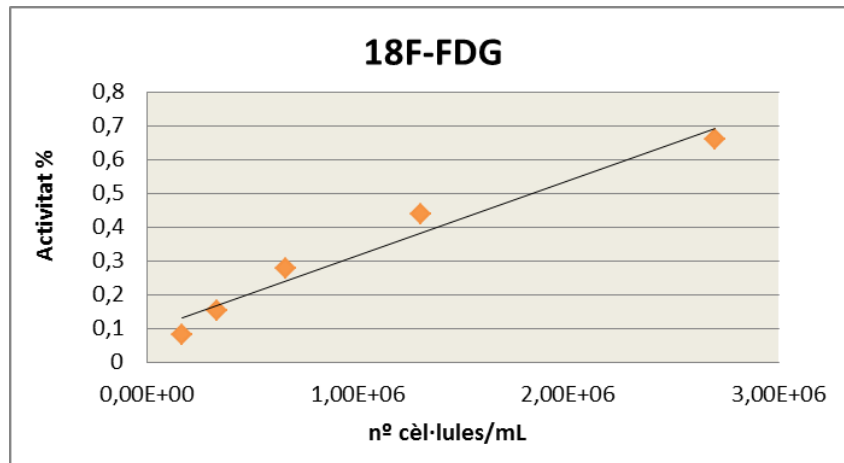
En el primer gràfic es mostra el percentatge d'activitat que ha estat retingut en el pèl·let en front el nombre de cèl·lules per mil·lilitre. Tal com era d'esperar, a major nombre de cèl·lules, major és l'activitat final seguint una correlació quasi lineal.



**Figura 39.** Gràfic de l'activitat en funció del nombre de cèl·lules pel compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$

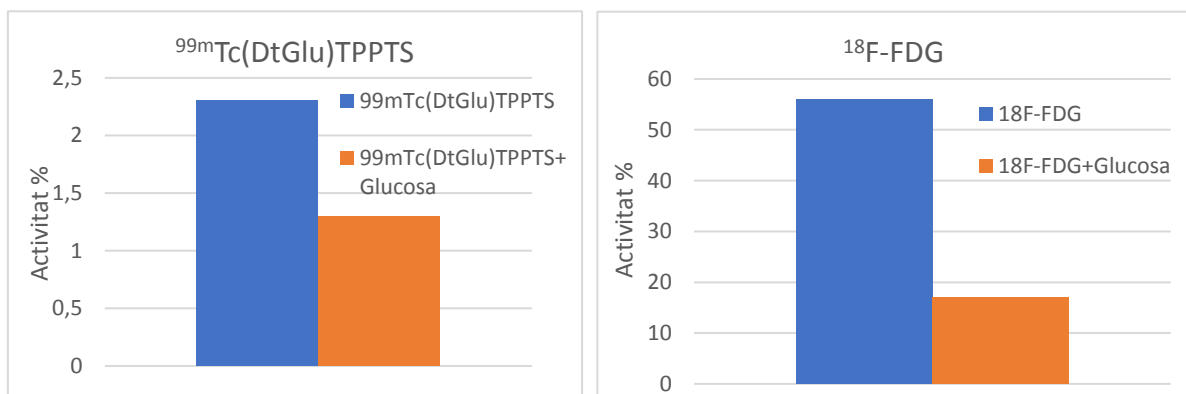
Per poder tenir una idea de l'eficiència del nostre potencial radiofàrmac es va fer el mateix experiment pel compost de referència  $^{18}\text{F}$ FDG, ja que, tot i ser un objectiu ambiciós, trobar un complex que el pugui substituir per un de tecneci seria molt interessant perquè aquest

metall és més fàcil d'obtenir i té un temps de semivida més apropiat per aplicacions en radiofarmàcia. No obstant, si es comparen els resultats d'unió cel·lular obtinguts per a cada compost, es pot comprovar perquè el  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  és un dels radiofàrmacs més emprats i difícil de ser substituït, en la **Figura 40** els valors d'activitat acumulada per aquest són d'un ordre de magnitud més elevats que els obtinguts en el derivat de glucosamina.



**Figura 40.** Gràfic de l'activitat en funció del número de cèl·lules per  $^{18}\text{F}$ -FDG.

En el següent histograma (**Figura 41**) es mostra el percentatge d'activitat final pel complex  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  i el  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$  quan els receptors estan bloquejats amb glucosa i en absència d'aquesta.



**Figura 41.** Assajos de bloqueig dels compostos  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  i  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  (dreta).

Com ja s'ha comentat el percentatge d'activitat retinguda és molt major pel compost de referència, però s'ha de posar en relleu que quan el complex de tecneci ha estat incubat en presència de glucosa, l'activitat és considerablement menor, aproximadament la mitat. En el cas del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG aquesta disminució és d'un 70%. Aquesta dada ens permet afirmar que existeix una interacció específica del radiocomplex amb el receptors GLU.

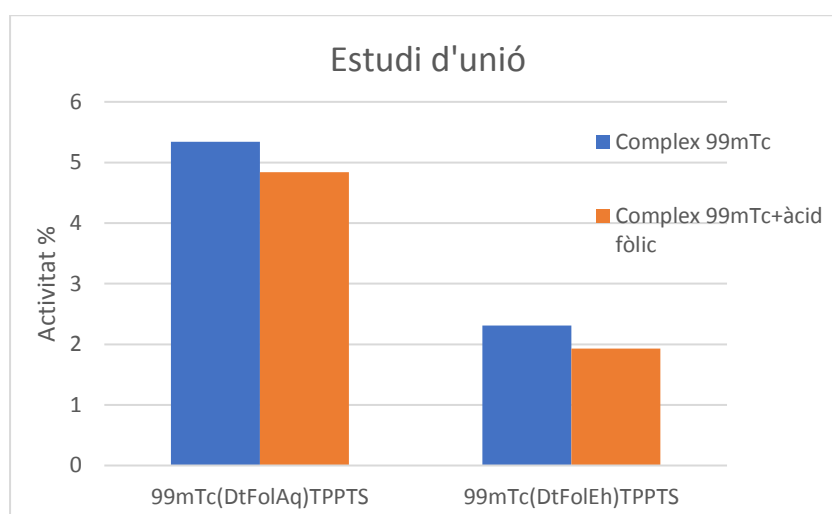
Malgrat que comparant amb la molècula de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG els resultats no són espectaculars, si que són positius si es comparen amb compostos similars de tecneci bioconjugats amb la glucosamina que es poden trobar en la literatura. En el treball del grup de Chris Orvig<sup>[87]</sup>, on estudien compostos de tecneci-99m amb la glucosamina emprant *linkers* de diferent llargada, obtenen una activitat en les cèl·lules entre 0,1% i 0,3% en el millor dels casos, és a dir, un ordre de magnitud menors que els obtinguts amb el nostre complex. A més, en el seu treball no troben diferència significant quan es duen a terme els experiments de bloqueig. En un altre estudi de Roger Schlibli<sup>[53]</sup> els resultats estan en la mateixa línia, tot i que arriben a una acumulació del 1%, tampoc es veu un clar efecte quan les cèl·lules són incubades en presència de glucosa per bloquejar els receptors. És important posar en relleu que aquests bons resultats comparats amb els de la bibliografia han estat obtinguts, a diferència del treball de C. Orvig, sense necessitat de purificar per HPLC el compost de tecneci. Així doncs, el compost  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  s'obté després de la reacció de transmetal·lació amb una activitat específica suficient per unir-se en els receptors de glucosa de les cèl·lules. També es pot afirmar que els valors d'unió cel·lular són millors que altres compostos amb la glucosamina descrits en la literatura.

#### 4.4.2. Assajos d'unió cel·lular dels complexos $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ i $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$

Pels derivats del fòlic es va procedir de la mateixa manera que l'apartat anterior, fent primer estudis *in vitro*. Per dur a terme els assajos amb derivats de l'àcid

fòlic les cèl·lules han de tenir sobreexpressats els receptors de folat, és per això que es van realitzar els experiments amb una línia cel·lular de càncer d'ovari anomenada SKOV3<sup>[90,91]</sup>. A diferència del compost de glucosamina, es va veure que en la bibliografia es feia servir un medi especial per fer créixer la créixer les cèl·lules en absència d'àcid fòlic per tal de no saturar els receptors de les cèl·lules, i per tant, facilitar l'estudi dels assajos sense bloqueig. Fins que no es va aplicar aquest canvi no es van començar obtenir resultats reproduïbles.

El procediment experimental és idèntic que el descrit en l'apartat anterior, a continuació es mostren directament els resultats dels assajos de bloqueig.



**Figura 42.** Assajos de bloqueig del complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ .

El percentatge d'activitat final en les cèl·lules és de 5% i 2% pels complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  respectivament. Aquests resultats són moderadament bons, malgrat que la diferència d'activitat quan els receptors estan saturats en l'assaig de bloqueig és petita, el descens és aproximadament un 10 % pels dos compostos. Aquest lleu descens indica que en gran mesura la interacció és inespecífica.

A priori, en el complex amb la cadena d'èters el fragment metàl·lic està més separat de l'àcid fòlic i hauria de donar millors resultats d'unió perquè el radionúclid està més lluny del centre actiu del receptor, i, per tant, hauria d'afectar en menor mesura en l'afinitat entre receptor i molècula. No obstant, aquesta idea no es veu reflectida en els resultats obtinguts. Per justificar la diferència es creu que, com que el

complex precursor de Zn(FoIAq) és més insoluble que el Zn(FoIEh) el primer hauria de tenir un valor d'activitat específica més gran al tenir menys molècules dissoltes sense marcar radioactivament en el medi.

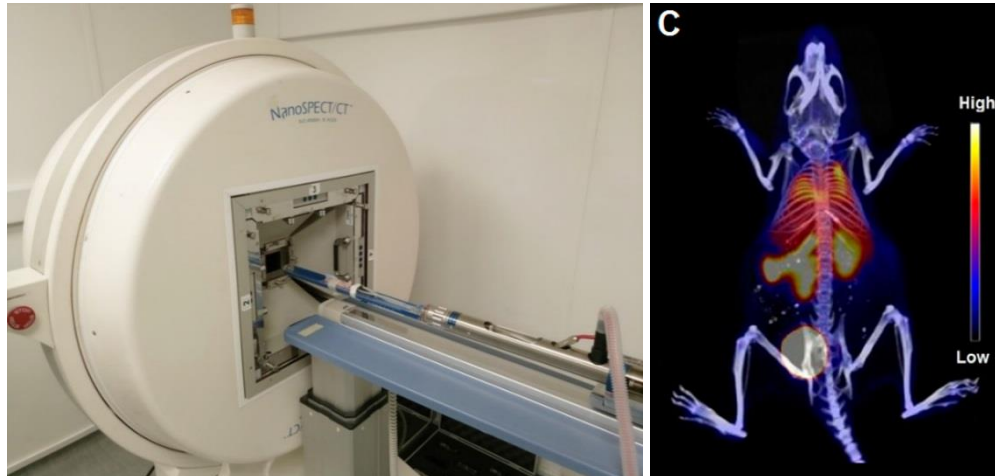
Comparant amb la bibliografia sembla que aquests compostos tenen una interacció menys específica amb la cèl·lula que els prèviament publicats a la bibliografia. En el grup de Roger Schibli<sup>[92]</sup>, i fent servir un complex de Tc-99m bioconjugat amb fòlic, obtenen en els experiments de bloqueig una disminució molt més pronunciada, amb uns valors de fins el 50%, tot i que empren una línia cel·lular diferent. S'ha de destacar que sorprenen els valors baixos observats en el nostre treball perquè, si es compara les estructures dels compostos, en el seu treball també bioconjuguen l'àcid fòlic amb el tricarbonil de tecneci però amb un *linker* més curt que el nostre, que a priori hauria d'anar en contra de la internalització. Per aquest motiu es va pensar que el problema podria ser el lligand TPPTS del radiocomplex, però aquesta hipòtesi va en contra del treball del grup de Zhang<sup>[76]</sup> que fan servir la mateixa fosfina amb l'àcid fòlic i també assoleixen uns majors valors en els experiments de bloqueig, aproximadament d'un 25-30%.

Coneixent tota aquesta informació, una possibles explicació de la baixa internalització dels complexos podria ser degut a un problema en el disseny experimental. L'origen del problema podria estar associat en el canvi del medi cel·lular que no conté àcid fòlic, és possible que això es fes massa tard quedant encara receptors bloquejats. Com s'ha comentat, com que aquests es van dur a terme a Londres, per raons de temps no es van poder fer més replicats per poder confirmar aquesta hipòtesis.

#### **4.5. Estudis *in vivo***

La última part del treball dedicada a l'estudi dels compostos des d'un punt de vista biològic, van ser els experiments *in vivo* que consisteixen en injectar els radiofàrmacs a ratolins. Aquesta prova permet determinar-ne la biodistribució dels

potencials radiofàrmacs en l'organisme, és a dir, a quines parts del individu aquests es dirigeixen. Per detectar la quantitat acumulada a cada teixit o òrgan es pot fer mitjançant 1) màquina nanoSPECT/CT (**Figura 43**) o 2) *cut and count* (en anglès; tallar i comptar).



**Figura 43.** A l'esquerra màquina nanoSPECT/CT del BARTS Cancer Insitute, i a la dreta imatge nanoSPECT/CT d'un ratolí.

La màquina nanoSPECT/CT és molt usada en estudis preclínic perquè combina la tecnologia SPECT, per detectar on s'ha acumulat radioactivitat, i la tomografia computeritzada (CT) que permet visualitzar la morfologia de l'interior del organisme mitjançant la suma de diferents seccions del cos generades a partir d'una font externa de raigs X. D'aquesta manera s'obtenen dos imatges superposades, la que prové directament de la senyal radioactiva d'on s'ha acumulat el radiofàrmac i la CT que proveeix informació estructural.

D'altra banda, la tècnica "*cut and count*" és molt més senzilla, es basa en sacrificar l'animal després d'un temps d'espera suficient perquè el radiocomplex arribi als teixits. Un cop l'animal és mort, es procedeix a la dissecció dels òrgans que es volen estudiar; tumor, pàncrees, intestins, cor, múscul, sang, etc... Es pesen cada una de les mostres i la radiació acumulada es determina amb un comptador gamma. Finalment, coneixent la quantitat de radioactivitat injectada i l'activitat final de cada òrgan, es pot saber quin es el percentatge d'activitat radioactiva acumulat a cada òrgan respecte la radiació total en funció del pes d'aquest (%ID/g).



La diferència més rellevant entre les dues tècniques és que el *cut and count* requereix del sacrifici del animal, mentre que amb la nanoSPECT/CT, al no ser necessari el seu sacrifici, permet analitzar la biodistribució en funció del temps (farmacocinètica) quan l'animal està viu. A més, mitjançant el programa informàtic també és possible quantificar la radioactivitat acumulada en un volum determinat del cos de l'animal, per exemple, si som capaços de definir el volum del tumor el programa ens calcularà quanta radioactivitat s'ha acumulat en aquest espai.

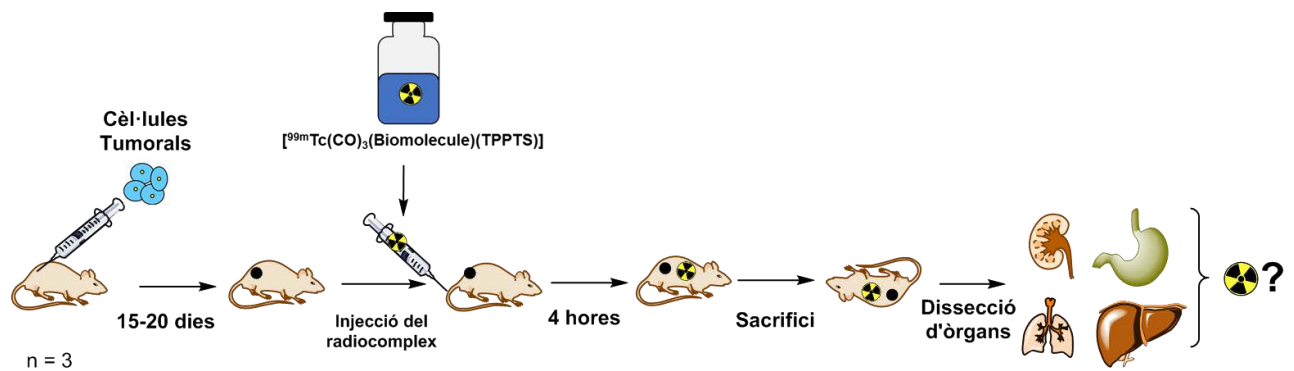


Figura 44. Esquema general del *cut and count*.

Es van disposar d'un total de 9 ratolins, tres ratolins per a cada compost estudiat;  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ . Primer de tot se'ls hi injecten un número determinat de cèl·lules cancerígenes a la part inferior de l'esquena del ratolí, aquestes són les mateixes que les emprades pels estudis *in vitro* previs, SKOV3 pels derivats de l'àcid fòlic i A-431 pel complex de glucosamina<sup>[89,93,94]</sup>. Seguint la bibliografia, la mida òptima del tumor s'aconsegueix en un període aproximat de 15-20 dies, moment en el qual ja es pot dur a terme els experiments de biodistribució. S'ha de puntualitzar que els ratolins que van servir pels estudis de derivats de l'àcid fòlic van ser alimentats amb una dieta especial que no contenia àcid fòlic.

Quan es va procedir al experiment de biodistribució, primer de tot es va portar a terme la reacció de transmetal·lació per a cada component. Aquest és un punt clau perquè la reacció de preparació del  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  i el corresponent complex de tecneci bioconjugat han de ser molt quantitatives per assegurar que tota la radioactivitat detectada provingui exclusivament dels compostos en estudi. En acabar

la radiosíntesi, cada radiocomplex va ser injectat a la cua dels ratolins. Es va agafar un dels ratolins de cada grup i va ser analitzat a la màquina nanoSPECT/CT a dos intervals de temps, 1 i 4 hores. Finalment, aquests ratolins juntament amb els altres dos de cada grup, van ser sacrificats 4 hores més tard de la injecció per ser disseccionats i poder-ne analitzar la biodistribució mitjançant el procediment “*cut and count*”.

Per calcular l'activitat específica de cada compost s'ha de saber la quantitat dissolta de precursor de zinc i l'activitat de tecneci-99m. A continuació es dóna un exemple del càlcul d'aquest valor pel compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  quan va ser sintetitzat per dur a terme les proves de biodistribució. Tenint en compte que el volum de reacció va ser de 240  $\mu\text{L}$ , la solubilitat del complex és de 0,61 ppm, cada molècula d'aquest complex conté dos biomolècules de fòlic i que l'activitat total va ser de 130 MBq, els càlculs són els següents:

$$240 \mu\text{L Zn(DtFolEh)} \times \frac{1 \text{ L}}{10^6 \mu\text{L}} \times \frac{0,61 \text{ mg Zn(DtFolEh)}}{1 \text{ L Zn(DtFolEh)}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^3 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol Zn(DtFolEh)}}{1.581 \text{ g Zn(DtFolEh)}} \times \frac{2 \text{ mol Folic}}{1 \text{ mol Zn(DtFolEh)}} \times \frac{10^9 \text{ nmol}}{1 \text{ mol}} = 0,185 \text{ nmol Folic}$$

$$\text{Activitat específica: } \frac{130 \text{ MBq}}{0,185 \text{ nmol Folic}} = 701 \text{ MBq/nmol Folic} \longrightarrow 18,2 \text{ Ci}/\mu\text{mol Folic}$$

En aquest càlculs no s'ha tingut en compte el rendiment radioquímica perquè per totes les síntesis dels compostos va ser superior al 97%. Així doncs, mitjançant els càlculs pels compostos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  es van obtenir uns valors aproximats de 18,2 Ci/ $\mu\text{mol}$  i mínim 55,5 Ci/ $\mu\text{mol}$  respectivament, aquests haurien de ser suficient per dur a terme els experiments *in vivo*, ja que són superiors a 10 Ci/ $\mu\text{mol}$ , que es el mínim per poder considerar condicions d'alta activitat específica<sup>[95]</sup>.

Com que per la glucosamina la solubilitat és més d'un ordre superior que els altres compostos, per tenir un bon valor d'activitat específica, es va decidir afegir el complex de zinc com a solució, és a dir, després de sonicar, es va centrifugar la suspensió, i es van afegir directament només el sobrenedant a la solució de

[ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ] a part de la de TPPTS. Per tant, fent els mateixos càlculs, pel  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  en el moment de la injecció l'activitat va ser 18,4 Ci/nmol, un valor molt més proper al que tenim pels derivats del fòlic.

#### 4.5.1. Biodistribució *cut and count*

Quan es van obtenir els òrgans, es van pesar i se'n va calcular el nivell de radioactivitat amb el comptador gamma per calcular el percentatge d'activitat respecte l'activitat total injectada per gram d'òrgan.

	$^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$	$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$	$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$
	%ID/g	%ID/g	%ID/g
<b>Tumour</b>	0,074±0,022	0,58±0,07	0,46±0,11
<b>Intestine</b>	20,8±2,9	52,1±5,2	42,1±7,5
<b>Pancreas</b>	0,024±0,005	0,13±0,4	0,12±0,02
<b>Spleen</b>	0,036±0,006	0,17±0,02	0,15±0,03
<b>Stomach</b>	5,57±8,93	1,28±0,62	1,2±0,6
<b>Kidney</b>	0,78±0,11	10,5±2,1	13,4±3,7
<b>Liver</b>	0,58±0,34	4,04±2,04	2,63±0,55
<b>Heart</b>	0,039±0,003	0,31±0,06	0,35±1,9
<b>Lung</b>	0,090±0,018	0,62±0,16	0,76±0,20
<b>Blood</b>	0,097±0,012	1,30±1,5	1,6±1,6
<b>Muscle</b>	0,019±0,006	0,14±0,05	0,24±0,05
<b>Tail</b>	0,15±0,012	1,23±0,44	0,83±0,12

Taula 3. Resultats de la biodistribució pels tres compostos de tecneci-99m estudiats.

El resultat més sorprenent és l'elevada activitat que ha quedat retinguda en els intestins comparat amb els altres òrgans, no obstant, a la bibliografia es poden trobar resultats similars que són justificats pel caràcter lipofílic del radiocomplex<sup>[69,96]</sup>. Malgrat aquest alt consum, l'acumulació en els tumors si es compara amb altres teixits considerats *blanc* com el múscul, la relació és entre 2 i 3 vegades superior resultat que desvela que els potencials radiofàrmacs presenten una clara especificitat en front els tumors.

D'altra banda, els experiments *in vitro* (4.4.1 i 4.4.2.) semblaven demostrat una major activitat biològica del complex de glucosamina respecte els de fòlic, donat que la unió cel·lular específica era major pel primer. En contraposició, en els assajos *in vivo* l'activitat final retinguda en el tumor és casi un ordre de magnitud major pels derivats de fòlic que pel de glucosamina, segurament degut a raons farmacocinètiques, és a dir que la biodistribució dels derivats de fòlic afavoreix més l'acumulació en el tumor.

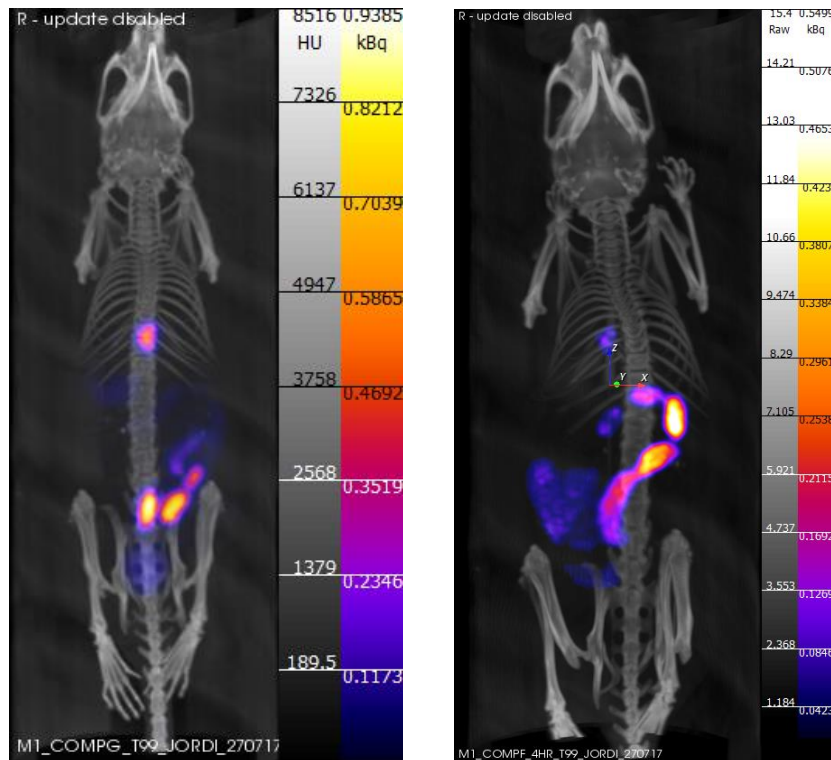
Si s'analitza exclusivament els compostos derivats del fòlic, la retenció en els ronyons es força elevada, aquesta acumulació és coherent amb el fet que les cèl·lules d'aquest òrgan presenten gran quantitat de receptors folat. Existeixen estudis que demostren que abans de la injecció del radiocomplex, si a l'individu se li injecta una molècula similar a l'àcid fòlic anomenada pemetrexed (PMX) la retenció del radiocomplex als ronyons disminueix considerablement afavorint que aquest s'acumuli més al tumor<sup>[97,98]</sup>.

#### 4.5.2. Imatges nanoSPECT/CT

Tal com s'ha mencionat, la màquina de nanoSPECT/CT ha permès tenir una idea de la farmacocinètica en un ratolí per a cada radiocompost estudiat. Després d'obtenir cada imatge 3D de la radioactivitat acumulada i sobreposada en una imatge de tomografia computada, aquestes han estat tractades amb el *Software InVivo Quant*, el qual permet, entre altres opcions, dibuixar un volum virtual determinat dins de l'organisme i després calcular-ne la radioactivitat dins d'aquest espai. Si es dibuixa el volum del tumor a diferents temps, i es compara amb el volum d'un altre teixit o òrgan també a diferents temps, aquesta mètode permet tenir una idea de la farmacocinètica del radiocompost entre el tumor i l'òrgan en estudi. D'alguna manera, la tècnica és equivalent al *cut and count* amb l'avantatge que permet analitzar la biodistribució en funció del temps.

#### 4.5.2.1. Biodistribució de $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$

Les imatges que es mostren a continuació (**Figura 45**) corresponen a les imatges obtingudes després d'injectar el complex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  a un dels ratolins a dos intervals de temps diferents, 1 i 4 hores posteriors a l'administració del radiocomplex.

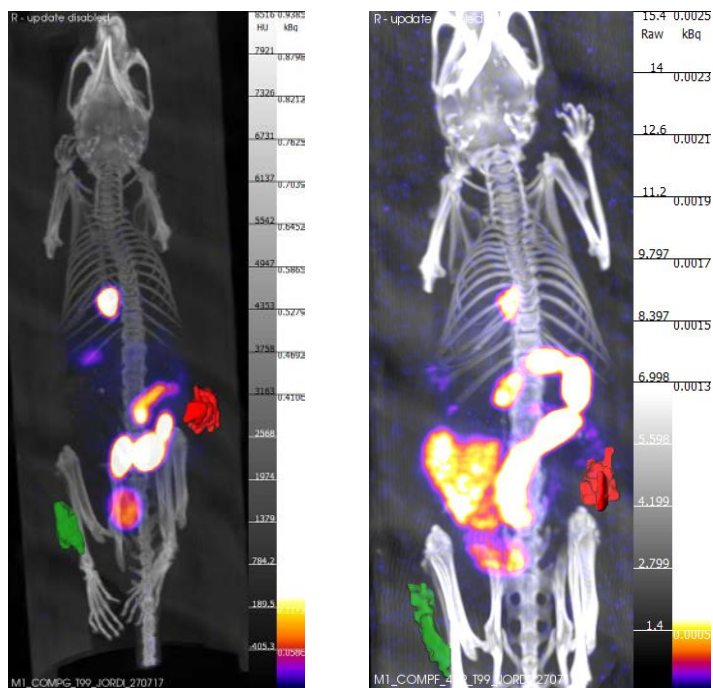


**Figura 46.** Imatges SPECT i CT superposades per un ratolí que se li ha administrat el radiocomplex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  a dos temps diferents, 1 hora (esquerra) i 4 hores (dreta) després de la injecció.

Les imatges obtingudes són coherents amb els valors de biodistribució obtinguts mitjançant la tècnica *cut and count*. A les imatges s'aprecia clarament que el radiocomplex s'ha acumulat amb gran mesura als intestins del animal. Tot i que si es comparen la distribució d'activitat entre els dos intervals de temps no s'observen clares diferències, en la imatge a 1 hora post injecció s'observa que el radiocomplex s'acumula a la bufeta, i, després de 3 hores l'activitat en aquest òrgan és molt més baixa. Aquesta diferència pot fer pensar que part del radiocomplex és excretat mitjançant el sistema renal, de ser així, suposaria un avantatge perquè sempre es desitjable que el radiofàrmac sigui eliminat per aquesta via per tal d'eliminar-lo el més

ràpid possible del cos i evitar la sobreexposició del pacient a la radioactivitat<sup>[99]</sup>, de fet aquest efecte podria ser degut a la presència de la TPPTS en l'estructura del compost<sup>[55,56]</sup>.

La **Figura 46** es va obtenir mitjanant el *software* de tractament d'imatges, amb aquest es va dibuixar virtualment un volum que correspon al tumor (en vermell) i un altre d'una part és de múscul (en verd).



**Figura 46.** Imatges SPECT/ CT del radiocomplex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  on s'ha pintat de vermell la zona del tumor i en verd una zona de múscul a dos temps diferents, 1 hora (esquerra) i 4 hores després de la injecció (dreta).

En la **Taula 4** es mostren la radioactivitat en funció del volum dibuixat pel tumor i pel múscul. Els valors d'activitat dins del tumor i del múscul són coherents amb els obtinguts amb el mètode de *cut and count*, ja que ambdós mètodes l'acumulació del complex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  és entre 2 i 3 vegades major en el tumor que en el múscul després de 4 hores. En la mateixa taula també s'observa que l'activitat, tant en el tumor com en el múscul, disminueix al cap de 4 hores, però s'ha de destacar que la relació d'activitat tumor/múscul augmenta en funció del temps. Atès que el múscul es considera un teixit blanc, aquest valor és positiu perquè demostra que el radiocomplex presenta una clara activitat específica vers el tumor.

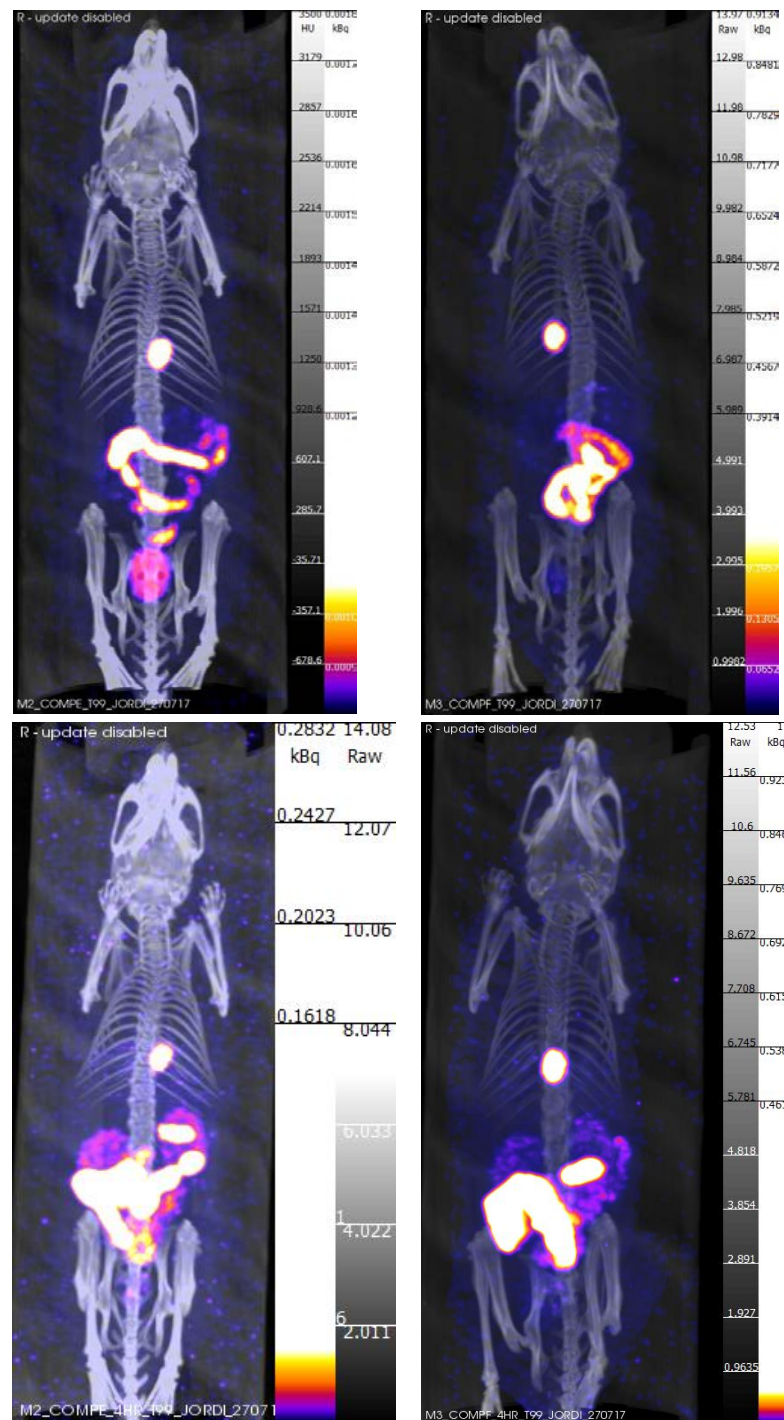
	1 hora (Bq/mm <sup>3</sup> )	4 hores (Bq/mm <sup>3</sup> )
<b>Múscul</b>	16	2,8
<b>Tumor</b>	28	6,8
<b>Relació tumor/múscul</b>	1,8	2,4

**Taula 4.** Activitats en funció del volum en el múscul i tumor en funció del temps, també es mostra la relació entre l'activitat en tumor i en el múscul pel complex <sup>99m</sup>Tc(DtGlu)TPPTS.

#### 4.5.2.2. Biodistribució de <sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS i <sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS

Pels derivats del fòlic es va procedir de la mateixa manera que l'apartat anterior. A la **Figura 47** es mostren les imatges de dos ratolins els quals se'ls hi ha injectat el primer el compost <sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS i l'altre el <sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS, aquestes s'han enregistrat a 1 i 4 hores post injecció. De la mateixa manera que en el compost de glucosamina, els resultats són coherents amb els valors obtinguts en els experiments *cut and count*, on la major de l'activitat acumulada prové dels intestins. No obstant, en les imatges nanoSPECT/CT pels derivats de fòlic obtingudes 4 hores més tard de l'administració del complex, també s'observa una important activitat en els ronyons, com ha s'ha mencionat, segurament degut a que les cèl·lules d'aquest òrgan tenen els receptors folats sobreexpressats i, per tant, el radiocomplex s'hi acumula activament. A més, si es comparen les imatges entre els dos compostos, s'aprecia que pel complex <sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS s'acumula en més mesura a les parts involucrades en el sistema renal; ronyons i bufeta. Aquest fet seria coherent amb la naturalesa del *linker* de la molècula, ja que per la molècula <sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS al tenir una cadena amb dos grups èters, i per tant més polar, redueix la interacció amb les proteïnes de la sang i afavorint l'excreció renal enlloc d'altres vies com la hepàtica<sup>[100]</sup>, que és menys recomanable per ser més lenta i podria obstaculitzar la visualització de tumors en la zona abdominal. Aquesta important conclusió queda reforçada si també es compara l'activitat que prové dels intestins per a cada compost. El radiocomplex <sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS, al ser més lipofílic, s'acumula més en els intestins i menys en els ronyons, fet que queda demostrat tan en les imatges

nanoSPECT/CT com en els valors obtinguts en el *cut and count*. Així doncs, es pot afirmar que el complex que té el *linker* més polar afavoreix clarament la via d'excreció renal.



**Figura 47.** Imatges nanoSPECT/CT. A i B corresponen a imatges 1 hora derprés de l'administració dels radiocomplexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  respectivament. C i D són els mateixos ratolins passat un temps de 4.



Com s'ha procedit amb el compost de glucosamina, a continuació es mostren les activitats recollides en un volum dibuixat virtualment en la zona del tumor i en una mostra de múscul per a cada radiocomplex i per a cada temps d'anàlisi (**Taula 5**).

	$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$		$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$	
	<u>1 hora</u> (Bq/mm <sup>3</sup> )	<u>4 hores</u> (Bq/mm <sup>3</sup> )	<u>1 hora</u> (Bq/mm <sup>3</sup> )	<u>4 hores</u> (Bq/mm <sup>3</sup> )
<b>Múscul</b>	43	16	46	18
<b>Tumor</b>	90	43	58	26
<b>Relació tumor/múscul</b>	2,1	2,7	1,3	1,4

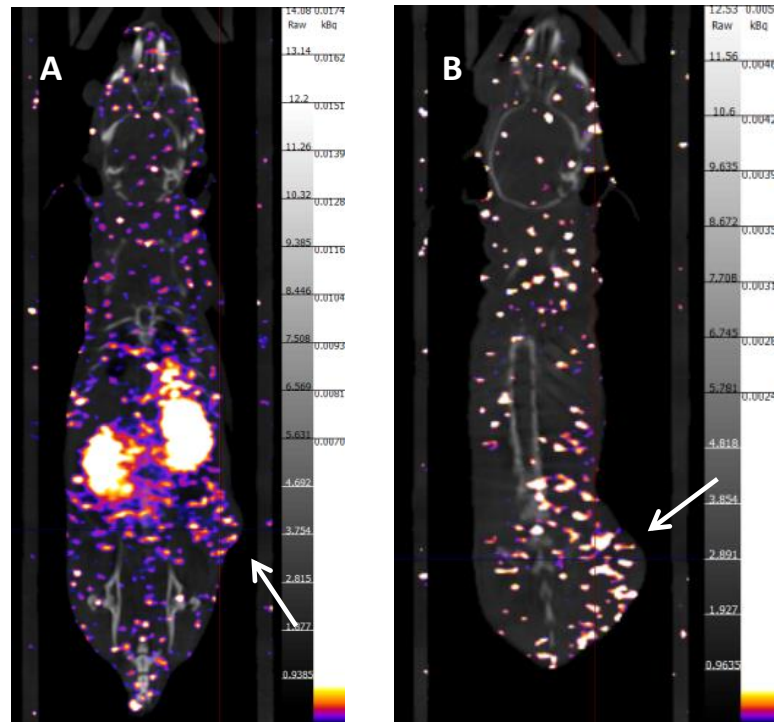
**Taula 5.** Activitats en funció del volum en el múscul i tumor en funció del temps per als compostos derivats del fòlic

Les dades de la taula són molt positives perquè mostren com els dos compostos s'acumulen selectivament en les cèl·lules cancerígenes donat que la relació tumor/múscul augmenta en funció del temps, essent un creixement més pronunciat en el cas del complex que té el *linker* més polar. De fet, aquest complex també aconsegueix uns valors absoluts d'activitat dos vegades majors que l'altre. Així doncs, torna a ser evident que gràcies al *linker* polar i llarg, el complex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  presenta unes propietats més adients per diagnòstic de tumors que el compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ .

D'acord amb els valors d'activitat recollits en la **Taula 5**, i a diferència dels complexos en glucosamina, la quantitat d'activitat que ha arribat al tumor per aquests radiocomplexos ha estat suficientment elevada (43-26 Bq/mm<sup>3</sup>) al cap de 4 hores per, després d'un tractament amb el *software*, obtenir imatges on s'aprecia una major acumulació en la zona del tumor respecte altres parts de l'organisme.

En la **Figura 48** es mostren imatges en secció coronal dels complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  4 hores després de l'administració. En aquestes s'aprecien una major densitat de punts brillants (activitat) en el flanc dret de cada organisme que corresponen a la zona ocupada pel tumor. Així doncs, tot i que en el cas del  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  els ronyons presenten més activitat, o en la secció del  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  que no apareixen aquests òrgans amb més activitat,

l'administració dels potencials radiofàrmacs  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  i  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  s'acumulen específicament en el tumor permetent-ne la seva visualització.



**Figura 48.** Imatges nanoSPECT/CT en la secció transaxial del compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  (A) i el  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  (B) 4 hores postinjecció on s'aprecia la major acumulació de radioactivitat en el tumor.

Els estudis de biodistribució pels derivats del fòlic han permès concloure que els dos complexos presenten una activitat biològica que permet l'acumulació selectiva als tumors, o com a conseqüència, permeten la visualització dels tumors, malgrat la important acumulació en altres òrgans com l'intestí o el ronyó. A més a més, comparant els dos radicomplexos entre si, s'ha demostrat que la major naturalesa hidrofílica del compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  té un marcat efecte en la farmacocinètica, afavorint clarament les característiques del potencial radiofàrmac perquè fomenta la seva excreció pel sistema renal, i millorant l'acumulació en el tumor al llarg del temps.

Com s'ha comentat anteriorment, si l'administració dels compostos s'hagués fet posterior a la d'un agent de bloqueig com el PMX<sup>[97,98]</sup>, els resultats encara haguessin estat més prometedors al reduir el consum per part dels ronyons.



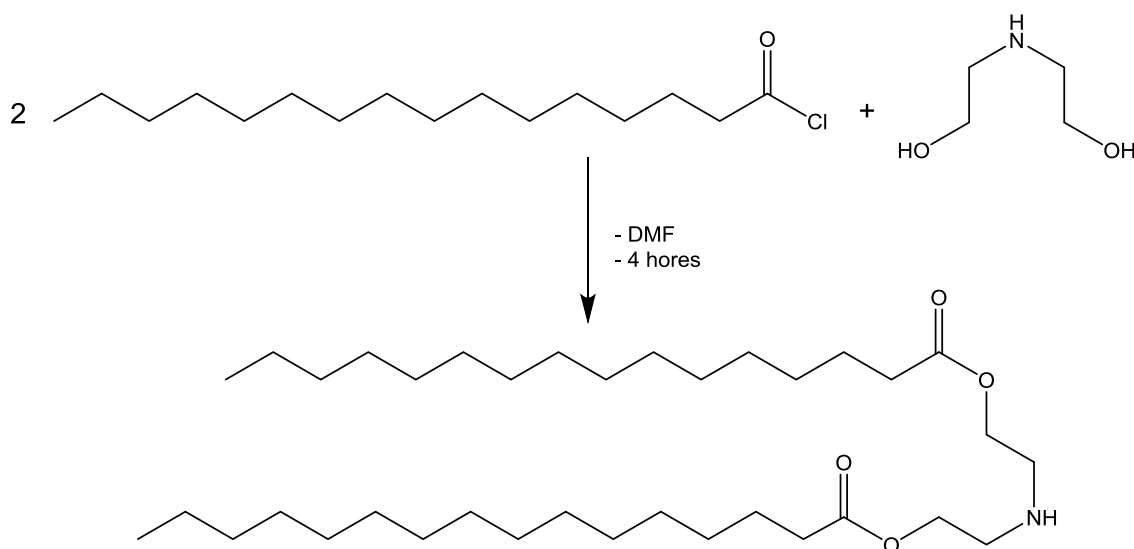
## 5. TRANSMETAL·LACIÓ [2+1] PER MARCATGE DE LIPOSOMES

En la introducció (1.2.) s'ha comentat que els liposomes poden ser vehicles molt interessants per transportar fàrmacs o radionuclis dins d'un organisme, perquè són estables en condicions fisiològiques, biocompatibles i poden reduir els efectes secundaris de les molècules que transporten si es compara quan aquestes es troben lliures en l'organisme. D'altra banda, en aplicacions específiques de diagnosi o tractament de tumors, si les vesícules són d'una mida adient, poden retenir-se selectivament en les cèl·lules cancerígenes degut a l'anomenat efecte EPR (*Enhanced Permeability and Retention*)<sup>[40,41]</sup>.

Si es pensa en desenvolupar una estratègia per funcionalitzar liposomes amb radioisòtops per aplicacions en radiofarmàcia, el mètode ha de ser ràpid i eficient donada la curta vida dels radioisòtops. Com s'ha vist en la primera part d'aquesta tesi, la reacció de transmetal·lació [2+1] entre el tricarbonil de tecneci-99m, el ditiocarbamat de zinc i un lligand monodentat és termodinàmicament molt favorable tot i les baixes concentracions dels reactius implicats. L'altre avantatge que presenta és que la reacció es realitza en temps de reacció curts i temperatures suaus. Per aquestes raons es va pensar que podria ser interessant dissenyar una metodologia basada en la reacció de transmetal·lació per incorporar tecneci-99m en vesícules. En aquest capítol es descriu la síntesis d'un complex lipofílic de zinc dissenyat per obtenir un compost de tecneci prou amfifílic perquè sigui capaç d'incorporar-se en vesícules després de la reacció de transmetal·lació, quedant aquestes marcades radioactivament. Tal i com s'ha procedit en altres capítols, abans de dur a terme els experiments amb tecneci-99m es va obtenir i caracteritzar l'homòleg de reni. Els productes finals, al tenir un cap polar i una cua apolar i, simultàniament contenir metalls de transició, es consideren metal·losurfactants (MTs)<sup>[101]</sup>.

## 5.1. Obtenció del precursor lipofílic de zinc

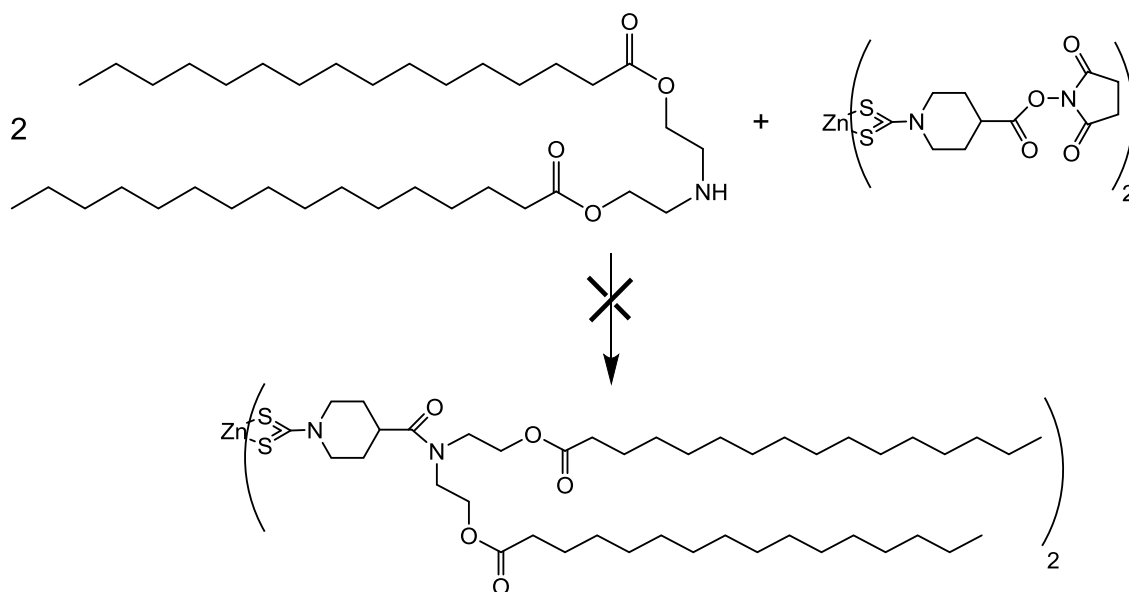
Atès que la intenció és obtenir un complex de zinc amb caràcter lipofílic en primer lloc es va fer una cerca en la literatura de amines terminals de cadena llarga per poder formar l'enllaç peptídic amb el complex de zinc que conté un èster activat. La síntesi més simple i assequible que es va trobar va ser en un treball de Pietro Tundo<sup>[102]</sup> de l'any 1982, on es descriuen i sintetitzen un gran nombre de tensioactius. Entre aquests el que va despertar interès és un intermedi de reacció que consisteix en una amina secundària que conté dues cadenes de 16 carbonis derivades de l'àcid palmític. Així doncs es va escollir la reacció descrita en l'article per obtenir el producte, anomenat PA (P=palmitoil A=amina), a partir d'una substitució nucleofílica entre el clorur de palmitoil i la dietanolamina.



Esquema 18. Reacció per l'obtenció del PA.

A part de ser una síntesi simple, un altre avantatge és que és possible obtenir el producte final en elevades quantitats amb rendiments moderadament bons (60% aproximadament).

Després de l'obtenció del PA, es va provar la reacció directa entre la amina secundària i el complex succinimidil èster de zinc per incorporar les cadenes alifàtiques en el complex ditiocarbamat de zinc.



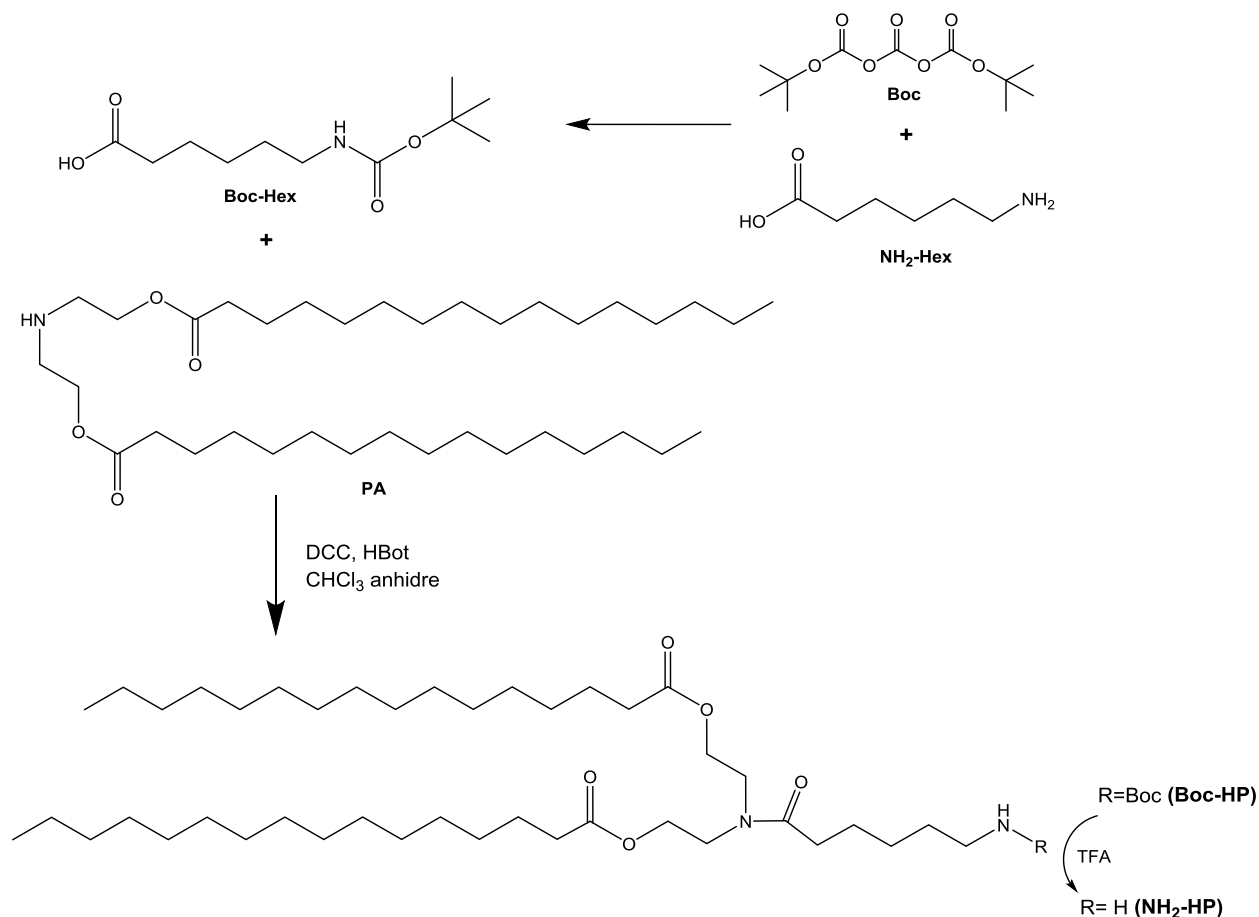
**Esquema 19.** Reacció frustrada per a l'obtenció del Zn(DtPA).

Després de diversos intents els  $^1\text{H}$ -RMN de protó indicaven que la reacció esperada no es donava. El resultat va ser inesperat perquè, a priori, la formació de la amida havia de ser relativament senzilla donat que ja s'havia provat una reacció semblant entre una amina secundària i el precursor de zinc per a la síntesi del compost Zn(DtPip) prèviament sintetitzat pel Dr. Joan Lecina<sup>[32]</sup>. Es va postular que la reacció no funcionava degut a que la amina secundària, a part de ser menys reactiva que les primàries, es troba impedita per les dues cadenes alifàtiques.

### 5.1.1. Síntesi Boc-HP

Continuant amb la hipòtesi que la amina secundària estava impedita estèricament fent inviable l'acoblament peptídic, es va pensar en fer-la reaccionar amb un grup menys voluminós que el succinimidil, com l'àcid d'una molècula que tingués una amina primària a l'altre banda de l'estructura. D'aquesta manera es disposaria d'una amina menys impedita i, al ser primària, la seva reactivitat s'hauria d'incrementar notablement. Buscant en la literatura es va determinar que per reaccions similars una molècula molt emprada i fàcil d'obtenir era l'àcid 6-

aminohexanoic ( $\text{NH}_2\text{-Hex}$ ). El primer que es va fer va ser protegir la amina de la molècula per tal d'evitar la reacció intermolecular entre aquesta i l'àcid carboxílic, després es va duu a terme la reacció entre l'àcid i la PA i, finalment, es va eliminar el grup protector, obtenint d'aquesta manera la amina esperada (**Esquema 20**).



**Esquema 20.** Ruta sintètica per l'obtenció de la molècula  $\text{NH}_2\text{-PA}$

La primera reacció consistia en obtenir el producte Boc-Hex simplement protegint la amina amb l'agent protector Boc seguint l'article Birabonoye, *et al*<sup>[103]</sup> on feien servir  $\text{NaOH}$  1M i dioxà, però els espectres de RMN revelaven que no s'obtenien el producte esperat Boc-Hex. De manera que es va seguir una estratègia alternativa descrita en el treball de Huang *et al*<sup>[104]</sup>, en la qual es feia servir trimetilamina com a base i un medi de reacció de la mescla acetona aigua (1:1). Els valors de  $^1\text{H-NMR}$  del producte final eren concordants amb els de la bibliografia indicant que els nous canvis introduïts van portar a la formació del producte Boc-Hex.

Amb la amina primària protegida, es va procedir a la formació de la amida entre l'àcid i la amina secundària del producte PA. Per a l'obtenció del nou producte, anomenat Boc-HP (Boc-hexapalmitoil), com que no està descrit en la bibliografia, es va seguir el procediment experimental d'una reacció similar publicada en el treball de Alexopoulos, et al<sup>[105]</sup> on empraven els agents activants d'àcids carboxílics DCC (diciclohexil carbadimida) i HOBt (hidroxibenzotriazol) en condicions anhidres. La única diferència és que per la nostra reacció el reactiu en excés va ser l'àcid carboxílic perquè es va pensar que seria més fàcil de purificar mitjançant extraccions. En acabar la reacció, i després de treure per filtració la urea de DCC, es fan un total de tres extraccions. Aprofitant que el producte final no presenta característiques àcid-base, i per tant sempre es troba majoritàriament en la fase orgànica. La primera extracció és a pH bàsic per separar el producte de l'àcid (Boc-Hex) que no ha reaccionat, ja que en aquestes condicions, aquesta molècula es troba en forma de sal i, per tant, roman a la fase aquosa. Seguint la mateixa lògica, la segona extracció es fa a pH àcid per protonar la amina (PA) que pugui quedar lliure, ajudant a desplaçant-la a la fase aquosa mentre el nostre producte queda a la fase orgànica. Finalment es renta aquesta fase orgànica amb una última extracció a pH neutre. El producte final s'obté després d'evaporar la fase orgànica amb un rendiment del 65%.

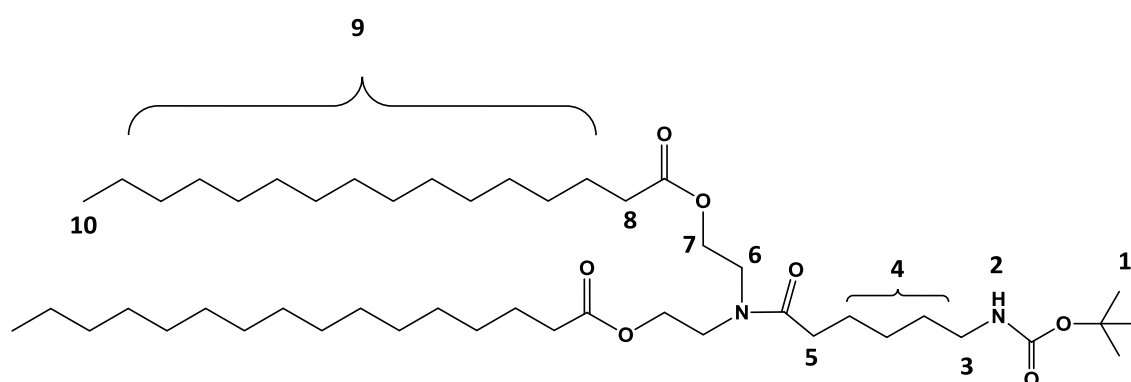


Figura 49. Molècula Boc-HP amb l'assignació de protons i carbonis

En els <sup>1</sup>H-RMN del Boc-HP s'observen els protons dels tres metils (1) del grup protector Boc com un únic singlet a 1,42 ppm. Una prova evident de la formació del d'aquest compost és que apareix un triplet a 3,58 ppm que correspon als protons (6) més propers a la nova amida formada.



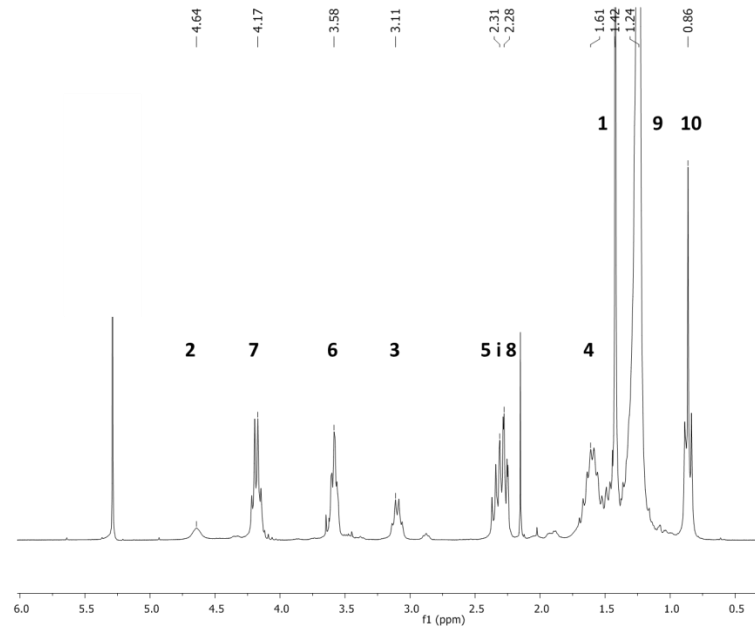


Figura 50. Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN de la molècula Boc-HP en  $\text{CDCl}_3$ .

L'espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN va permetre l'assignació dels carbonis amb l'estructura esperada (veure **Figura 52**), com el pic a 173,3 ppm del carboni de la amida. S'ha de

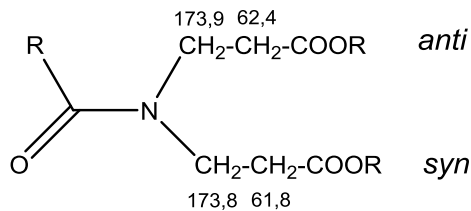


Figura 51. Conformació *anti/syn* de la amida amb l'assignació dels carbonis

destacar que aquest espectre, a diferència del de protó, permet observar que les dues cadenes es troben en conformació *anti* i *syn* si ens fixem en el doble pic de 173,9/173,8 ppm o en el 62,4/61,8 ppm. Aquest resultat és coherent amb el treball de H. Fritz *et al*<sup>[106]</sup> on s'estudia N,N alquilamides per ressonància magnètica i expliquen que en les

dialquilamides, la cadena que es troba en posició *syn* presenta uns menors desplaçaments químics respecte la que està en *anti*.

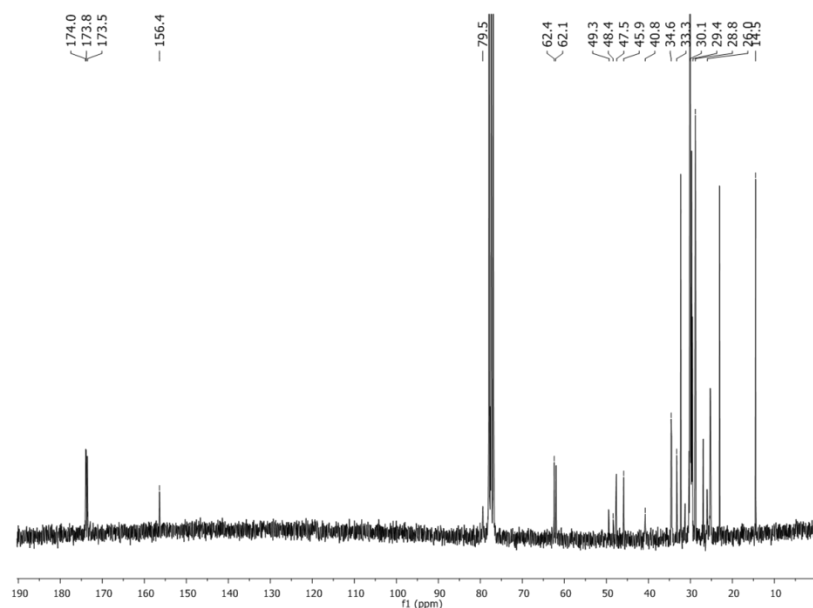


Figura 52. Espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la molècula Boc-HP en  $\text{CDCl}_3$ .

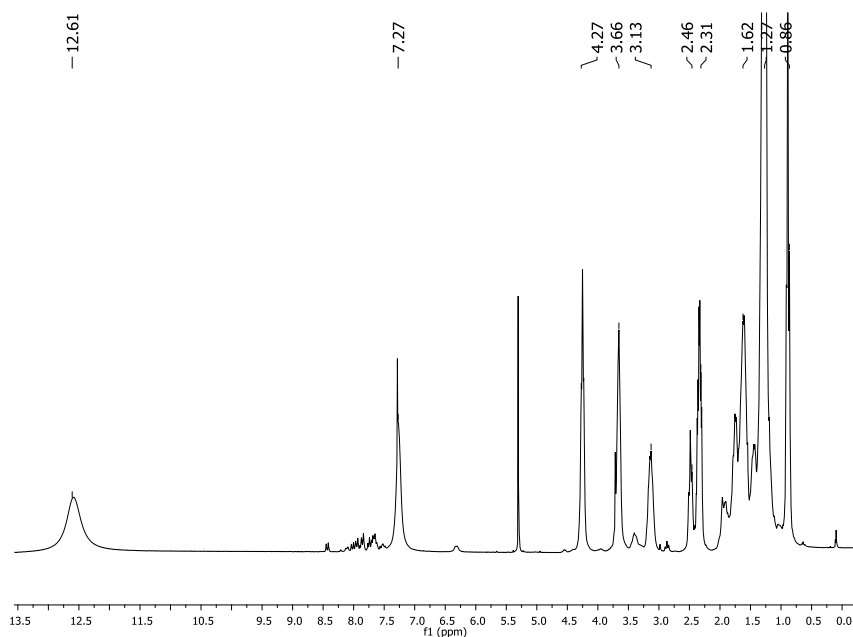
Per acabar la caracterització, també es van fer anàlisis d'infraroig amb ATR, anàlisis elemental i espectroscòpia d'alta resolució en polaritat positiva. Només destacar que en aquest últim es va obtenir un valor  $m/z$  de 817,6618, que coincideix amb l'estequiometria de la molècula proposada Boc-HP amb un àtom de sodi:  $[\text{C}_{47}\text{H}_{90}\text{N}_2\text{NaO}_7]^+$ .

### 5.1.2. Síntesi $\text{NH}_2$ -HP

La reacció de desprotecció àcida del grup Boc va portar a l'obtenció del producte  $\text{NH}_2$ -HP amb la amina terminal i les dues cadenes alifàtiques derivades del palmitoil. La desprotecció del grup Boc sovint és força neta perquè a part d'obtenir la amina, el grup Boc es descompon en diòxid de carboni i *tert*-butanol, al tractar-se d'un gas i un líquid volàtil no suposen un problema en quant a la purificació del  $\text{NH}_2$ -HP. Les condicions de la reacció van ser les mateixes que en l'article ja mencionat del Alexopoulos, et al<sup>[105]</sup> on feien servir TFA en diclorometà durant dues hores, després d'evaporar tot el TFA, es redissol l'oli en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i es fa una extracció en medi bàsic. El

producte NH<sub>2</sub>-HP s'obté amb un rendiment del 89 % després d'evaporar el solvent orgànic.

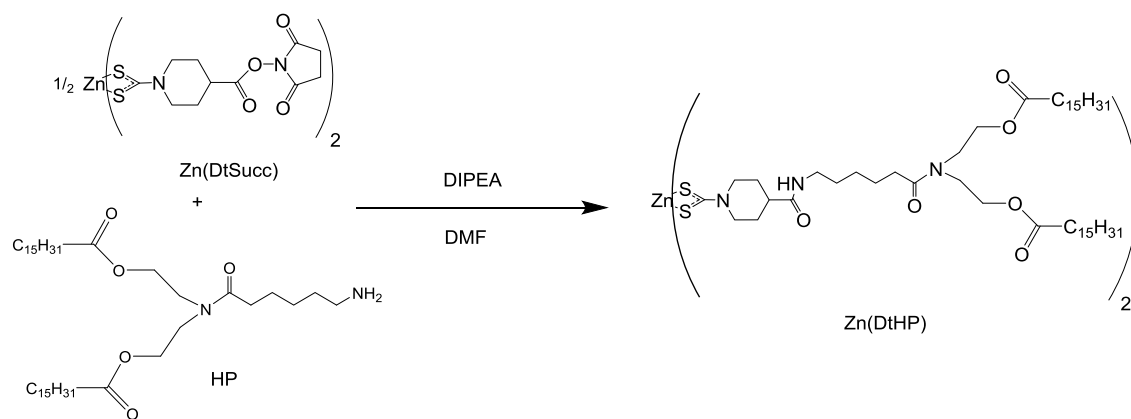
És fàcil justificar que la reacció ha estat un èxit donat que als espectres de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C-NMR desapareixen les senyals que corresponen als metils del Boc a més del pic dels protons de la amina a 12,6 ppm. D'altra banda, les tècniques de HRMS, anàlisi elemental i infraroig també evidencien la formació del producte.



**Figura 53.** Espectre de <sup>1</sup>H-RMN de la molècula NH<sub>2</sub>-HP en CDCl<sub>3</sub>.

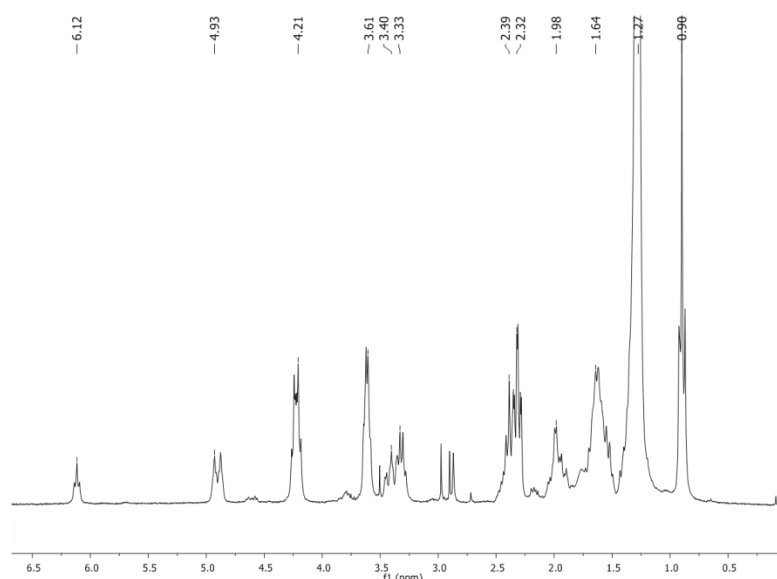
### 5.1.3. Síntesi Zn(DtHP)

Per la preparació del complex ditiocarbamat de zinc Zn(DtHP) amb les cadenes lipofíliques, es va fer reaccionar la amina de les cadenes amb el compost activat de zinc Zn(DtSucc) de manera similar com s'ha descrit pels compostos derivatitzats amb l'àcid fòlic ( 3.3.2.).



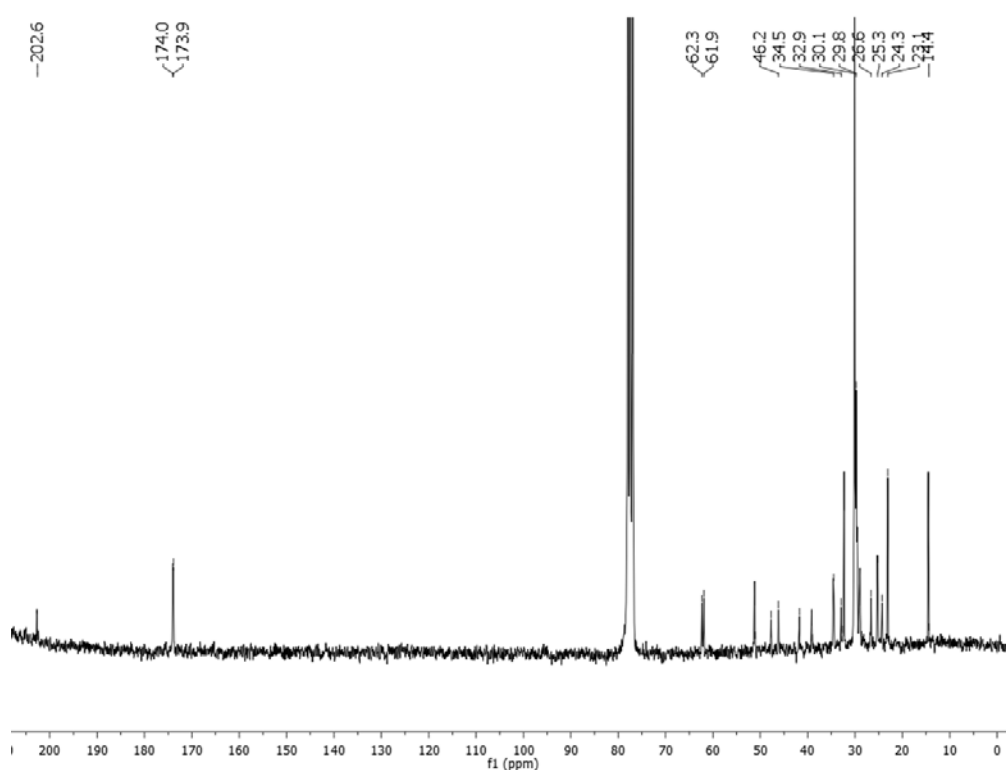
**Esquema 21.** Reacció d'obtenció de la molècula lipofílica Zn(DtHP)

El precursor de zinc, la amina primària i la DIPEA es dissolen en DMF i es deixa avançar la reacció durant 72 hores a temperatura ambient. La solució resultant s'afegeix a una solució etanol:aigua (1:1 v/v) per obtenir un precipitat que s'aïlla per filtració. Com que el precursor de zinc és insoluble en cloroform i es troba en excés, s'afegeix cloroform al sòlid per dissoldre el nostre producte i treure el Zn(DtSucc) per filtració. Després d'evaporar el cloroform, el sòlid de color rosenc es recristal·litza amb acetona.



**Figura 54.** Espectre de  $^1\text{H-NMR}$  del complex de zinc Zn(DtHP) en  $\text{CDCl}_3$ .

El  $^1\text{H}$ -NMR del producte (**Figura 54**) confirma clarament la formació del compost Zn(DtHP) perquè apareix el protó de la amida formada a 6,12 ppm i els protons equatorials de l'anell isonipecòtic a 4,88 ppm que indiquen la presència de zinc. La majoria de protons de la cadena alifàtica continuen apareixent com un sol pic a 1,27 ppm. Pel que fa l'espectre de ressonància de carboni-13 està d'acord amb aquestes conclusions perquè s'observen els pics de la cadena i el carboni característic del grup ditiocarbamat a 202,6 ppm.

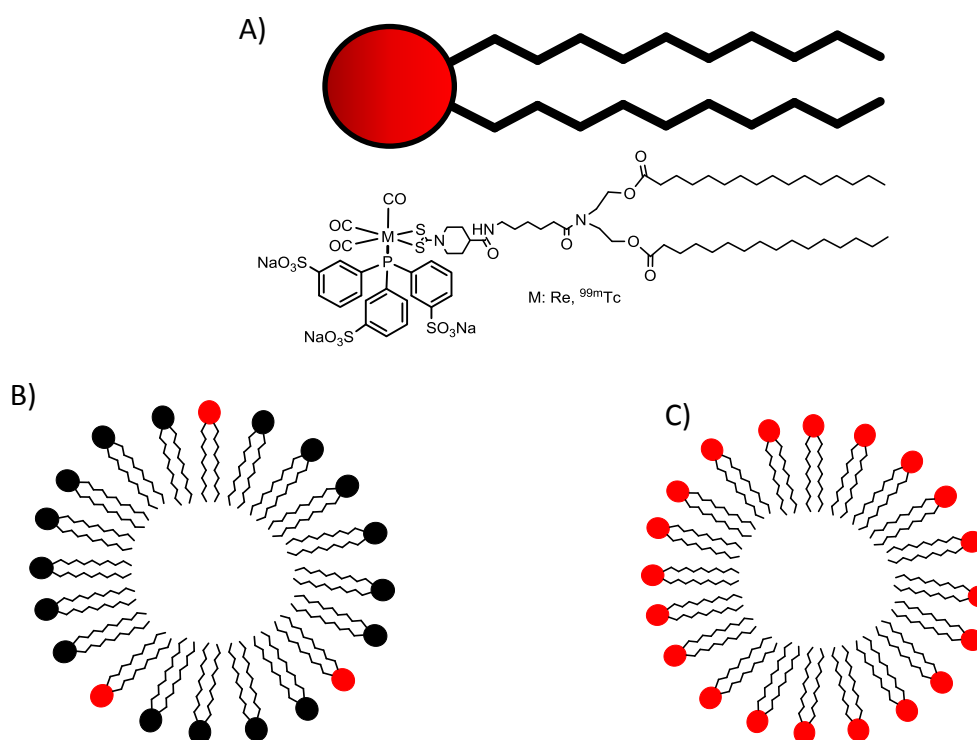


**Figura 55.** Espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN del complex de zinc Zn(DtHP) en  $\text{CDCl}_3$ .

A part de l'estudi de ressonància, es van fer les mesures de ESI-HRMS, infraroig i anàlisi elemental les quals també són coherents amb l'obtenció del producte Zn(DtHP).

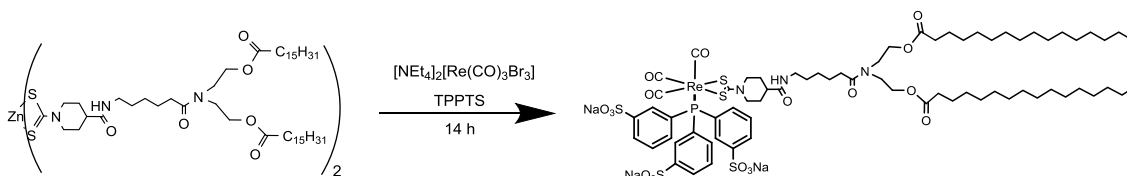
## 5.2. Síntesi de Re(DtHP)TPPTS

D'acord amb el disseny de la molècula, tant la que conté el tecneci-99m com l'homòlega de reni, han de presentar característiques de tensioactiu per poder esdevenir un metal·losurfactant amb la capacitat d'incorporar-se en una bicapa de fosfolípids o autoagregar-se per formar algun tipus d'estructura, com ara micel·les o vesícules. La hidrofobocitat a la molècula la proveiran les dues cadenes alifàtiques del complex ditiocarbamat de zinc que s'ha sintetitzat en els apartats anteriors. Però per completar el disseny amfifílic de la molècula, s'incorporarà en el metall la fosfina monodentada TPPTS perquè les tres càrregues negatives dels sulfonats actuaran com a cap polar. L'altre avantatge que presenta l'ús de la fosfina, és que ja s'ha fet servir prèviament en la reacció de transmetal·lació amb resultats satisfactoris. Reunint totes aquestes peces, en la **Figura 56** es pot veure el disseny del metal·losurfactant, el cap polar de la fosfina que conté el metall i les cadenes derivades del palmitoil.



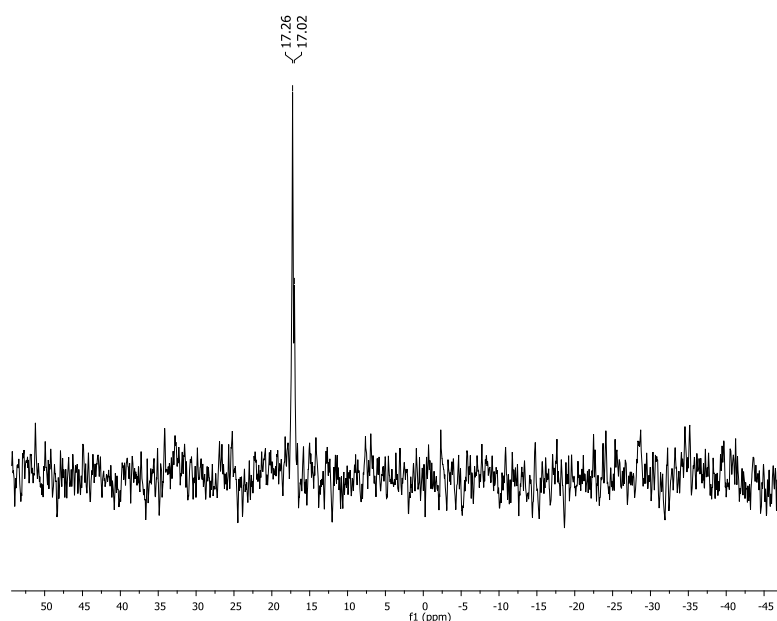
**Figura 56.** A) Estructura de M(DtHP)TPPTS on M és  $^{99m}\text{Tc}$  o Re, esquemàticament també es representa el seu comportament amfifílic. B) Esquema de micel·les on la molècula M(DtHP)TPPTS s'ha intercalat a la monocapa de fosfolípids. C) Autoagregació de la mateixa molècula en forma de micel·les. En les dos situacions la formació de micel·les és una suposició per simplificar l'esquema.

A continuació es presenta l'obtenció del compost model de reni Re(DtHP)TPPTS seguint el mateix procediment descrit en l'apartat 3.1. L'única diferència és que el precursor  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  i la fosfina es dissolen en DMF i que el temps de reacció s'ha augmentat fins a 14 hores.



**Esquema 22.** Reacció de transmetal·lació per l'obtenció de la molècula amfifílica Re(DtHP)TPPTS

Per poder aïllar el producte es força la precipitació amb èter dietílic, després de rentar el precipitat blanc amb etanol fred obtenint el producte Re(DtHP)TPPTS amb un rendiment moderat del 34 %.

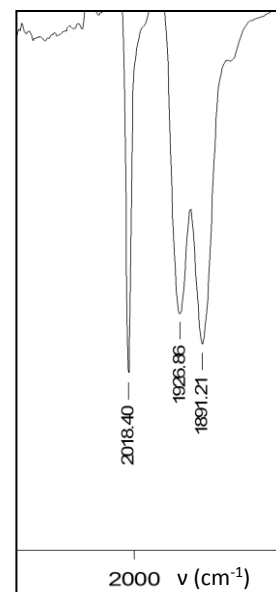


**Figura 57.** Espectre de <sup>31</sup>P-RMN del complex Re(DtHP)TPPTS en d<sub>4</sub>-MeOD, on s'aprecien els dos pics corresponents als dos isòmers.

Una vegada més el <sup>31</sup>P-RMN és una prova inequívoca que la fosfina s'ha coordinat al metall, donant lloc a la coordinació Re(SS)(P). A més a més, també com ja s'ha comentat anteriorment, el doble pic a 17,3 i 17,0 ppm, s'assigna als dos isòmers de la rotació d'enllaç C-N del ditiocarbamat (apartat 3.1.). L'espectre de carboni i protó suggereixen la mateixa conclusió. Per posar un exemple, en el <sup>1</sup>H-NMR els pics

de l'anell isonipecòtic es desplacen a camps més baixos després de l'intercanvi de lligands entre el zinc i el reni. Aquest fenomen ja s'ha observat en les reaccions prèvies de transmetal·lació.

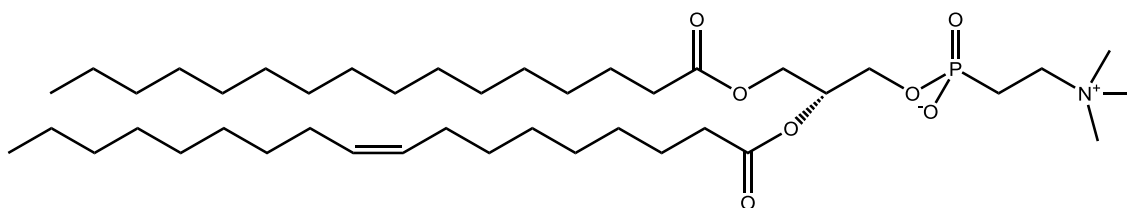
En el ESI-HRMS en polaritat positiva s'observa un pic a 1742,4641 m/z que correspon a l'estequiometria de la molècula  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  que ha guanyat un ió de sodi  $[\text{C}_{70}\text{H}_{120}\text{N}_3\text{Na}_3\text{O}_{18}\text{PReS}_5] + \text{Na}^+$ . Per acabar la caracterització, a continuació es mostra l'espectre d'infraroig (**Figura 58**) on a 2018, 1927 i 1891  $\text{cm}^{-1}$  apareixen les bandes de vibració dels carbonils coordinats amb el metall, en el sistema ditiocarbamat fosfina característic de l'entorn de coordinació  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{SS})(\text{P})]$ .



**Figura 58.** Ampliació del espectre IR-ATR en la zona de vibració dels carbonils metàl·lics de la molècula  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPP}$

### 5.3. Estudis dels complexos en liposomes

La idea inicial per l'obtenció de liposomes marcats amb el radioisòtop de tecneci-99m, consisteix en incorporar el complex de zinc ( $\text{Zn}(\text{DtHP})$ ) en liposomes formats pel fosfolípid natural que s'extreu de la soja anomenat fosfatidilcolina, abreviat SPC (de l'anglès *soybean phosphatidylcholine*).

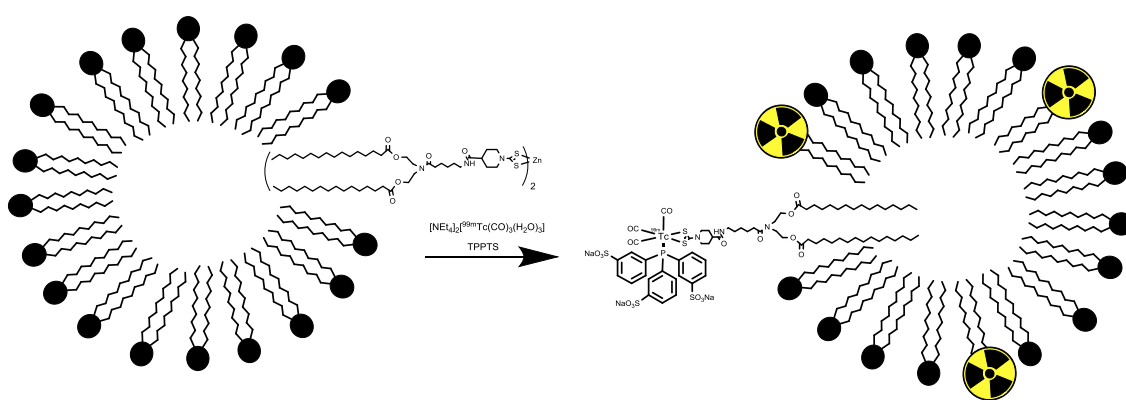


**Figura 59.** Representació del fosfolípid SPC.

L'estratègia consisteix en que tingui lloc la reacció de transmetal·lació entre el precursor de zinc incorporat als liposomes i el de tecneci-99m, o amb la molècula model de reni, en presència de la TPPTS (**Esquema 23**), donant-se lloc l'intercanvi de



metalls per obtenir el liposoma marcat en una “one pot reaction”. Amb l’objectiu de fer un *kit* pràctic per aplicacions en radiofarmàcia, el mètode consistiria en la formació de vesícules marcades partint d’una mescla liofilitzada de fosfolípids i complex  $\text{Zn}(\text{DtHP})$ , a la qual, després d’hidratar-se per formar els liposomes, s’hi afegeix  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  i TPPTS donant lloc a la reacció de transmetal·lació, que hauria de permetre l’intercanvi del zinc en la bicapa de fosfolípids per la nova molècula de tecneci formada. Comparant amb la literatura, aquesta estratègia suposaria el primer cop que s’aplica una reacció de transmetal·lació per radiomarcatge de liposomes.

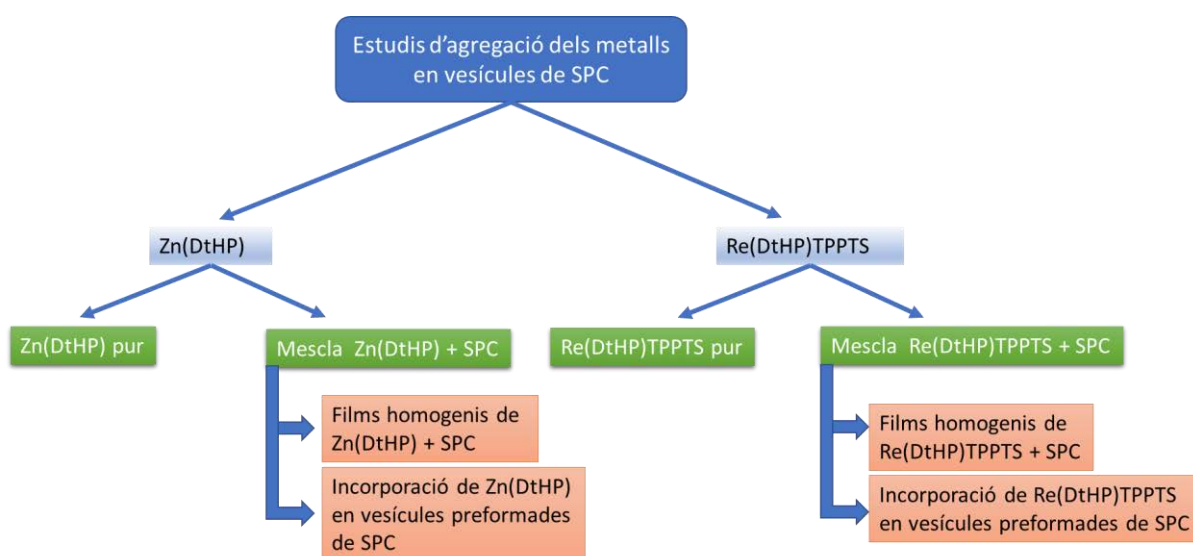


**Esquema 23.** Esquema de la reacció de transmetal·lació entre els complexes per l’obtenció de vesícules marcades radioactivament. Per simplificar, s’han representat una única monocapa dels liposomes.

Per confirmar la hipòtesi, en aquesta part del treball es mostren els estudis de caracterització dels sistemes vesiculars i s’estudia el comportament fisicoquímic dels compostos implicats:  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  i  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ . La incorporació dels complexos amb metalls en liposomes de SPC podria causar un canvi en la mida de les vesícules respecte aquelles que només estan constituïdes per SPC. No obstant, també és veritat que aquests es poden incorporar sense afectar de forma notable la seva estructura. Les tècniques més útils per detectar aquestes possibles variacions i que es faran servir a continuació són, principalment, l’espectroscòpia UV-Vis, DLS (en anglès *Dynamic Light Scattering*) i cryo-TEM.

El procediment experimental serà el mateix pels complexos de zinc i de reni, a diferència del de tecneci, ja que aquest últim és radioactiu i es requereixen

instal·lacions i aparells especial per treballar. A més, probablement, les concentracions de treball amb  $^{99m}\text{Tc}$  són tan baixes que dificultarien l'observació de canvis de la mida de les vesícules per confirmar la incorporació. Pel que fa als altres dos metalls, principalment es portaran a terme tres estudis diferents: 1) capacitat d'autoagregació del Zn(DtHP) i Re(DtHP)TPPTS partint de films purs del complex en estudi, 2) formació de vesícules mixtes de metall i SPC partint de films homogenis de dos compostos i 3) estudis d'incorporació dels complexos Zn(DtHP) i Re(DtHP)TPPTS en vesícules prèviament formades de SPC pur (**Esquema 24**).



**Esquema 24.** Resum del procediment experimental per l'estudi d'agregació dels metalls sols o en vesícules de SPC.

Pel que fa a les dues variants de formació de liposomes mixtes metall/SPC, a part de la diferència experimental dels dos mètodes, també existeixen diferències a nivell conceptual. En la incorporació en els liposomes preformats, el procés d'internalització ve determinat per un control cinètic, és a dir, dependrà de la capacitat que tingui el tensioactiu en incorporar-se en les bicapes dels liposomes. Per posar un exemple, quan el tensioactiu Triton X100 s'afegeix en una solució amb vesícules de SPC preformades, les desestabilitza ràpidament fins a formar micel·les, és a dir, té una capacitat molt gran de difondre dins de les bicapes, intercalar-se en els monòmers de SPC i, finalment, desestabilitzar l'estructura de les vesícules per formar micel·les mixtes.

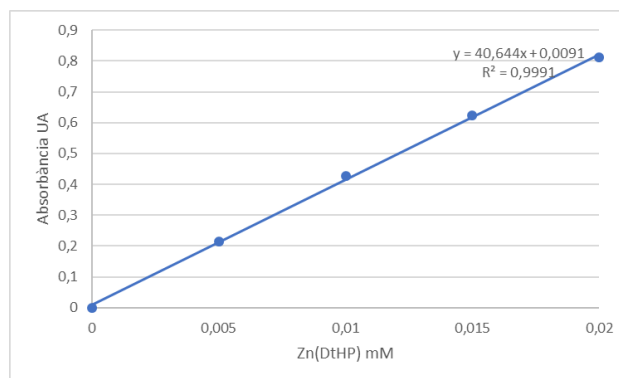
En contraposició, en la preparació a partir d'un film homogeni mixt, al tenir barrejats els dos compostos (SPC i el complex) l'equilibri és termodinàmic perquè dependrà de quin és el sistema més estable que es formarà mesclant els dos compostos i, a diferència de l'altre estratègia, no hi ha una etapa afegida de penetració dins la membrana.

### 5.3.1. Estudis d'agregació de Zn(DtHP) pur i en vesícules de SPC

En primer lloc es van estudiar les propietats fisicoquímiques del complex de zinc, perquè cal recordar que per dur a terme l'objectiu inicial, hauria de ser capaç d'incorporar-se en les vesícules per duu a terme la reacció [2+1] de transmetal·lació.

#### 5.3.1.1. Estudis d'autoagregació del Zn(DtHP)

Quan s'hidrata un film de Zn(DtHP) s'observa a simple vista que aquest producte es queda per les parets, o surant a la interfase aigua-aire, fet que indica que no es formen agregats. No obstant, per corroborar aquesta idea es va obtenir una recta patró de l'absorbància del complex a 266 nm en funció de la seva concentració quan estava dissolt en cloroform (**Figura 60**). La longitud d'ona es va escollir tenint en compte l'existència d'una banda d'absorció del complex en una zona en la qual el cloroform encara presenta certa transmitància.



**Figura 60.** Recta patró de l'absorbància ( $\lambda = 266$  nm) en front de la concentració de Zn(DtHP) per a la determinació de zinc lliure en l'estudi de la seva capacitat d'autoagregació.

La determinació de la capacitat del complex per autoagregar-se en medi aquós es va realitzar de la següent manera: es prepara un film de concentració coneguda i s'hidrata amb aigua. Donat que el complex es molt hidrofòbic i es queda a las parets, es retira l'aigua per decantació, s'asseca el baló al rotavapor i es redissol el contingut en 5 mL de cloroform per mesurar l'absorbància a  $\lambda = 266$  nm. El valor obtingut (0,394 UA) proporciona a la recta patró una concentració de  $9,67 \times 10^{-3}$  mM. Si es té en conte que la concentració inicial de complex és de 0,01 mM, se'n conclou que un 97 % del complex no s'ha quedat en la fase aquosa, evidenciant que aquest no forma cap tipus de estructura en solució aquosa.

### 5.3.1.2. Estudis de formació de vesícules mixtes a partir de films homogenis Zn(DtHP):SPC

Tot i que en l'apartat anterior s'ha vist com el complex de zinc no forma cap estructura per si sol, s'ha de posar en relleu que això no vol dir que no pugui ser incorporat en vesícules si es parteix de films mixtes amb un fosfolípid. De fet, un dels avantatges dels liposomes és que són capaços de transportar molècules molt lipofíliques, i per tant molt poc solubles en aigua, com ara la molècula de colesterol<sup>[36,107]</sup>.

Quan es va procedir a formar liposomes mixtes a partir dels films homogenis de Zn(DtHP) i SPC afegint-hi medi aquós, va tornar a repetir-se una situació anàloga a la de l'apartat anterior. És a dir, a simple vista s'apreciava un sòlid en les parets del baló que corresponia al complex de zinc, fet que suggereix que aquest precursor no és incorporat als liposomes de SPC. Per corroborar aquesta idea, es va tornar a quantificar el zinc que resta en les parets després del procés d'hidratació mitjançant espectrofotometria UV-Vis usant la mateixa longitud que l'anterior ( $\lambda = 266 \text{ nm}$ ), perquè en aquesta longitud la molècula de SPC tampoc absorbeix.

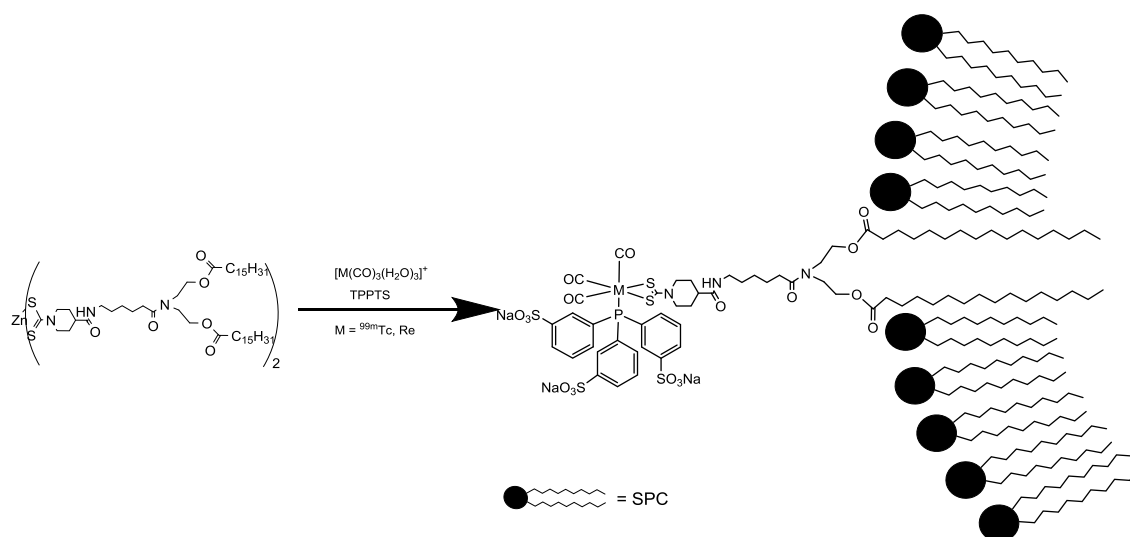
Es van preparar films mixtes de Zn(DtHP) 0,2 mM i SPC 1 mM i, després de la seva hidratació, es va treure la fase aquosa del baló. El sòlid de les parets es va rentar amb aigua anant amb cura per no arrencar-lo de la paret i, finalment, es va assecar amb un rotavapor. Tot seguit es va dissoldre en cloroform per ser analitzat al espectrofotòmetre. Mitjançant la recta patró es va comprovar que el  $94,6\% \pm 1,3\%$  ( $n = 2$ ) de complex de zinc es queda retingut a les parets, fet que indica que la fase aquosa està formada bàsicament per vesícules de SPC.

Amb aquestes dades es conclou que el Zn(DtHP) no és capaç d'interaccionar amb la molècula de SPC formant cap tipus de vesícula, segurament per dos raons principals. La primera podria està relacionada amb que el complex de zinc és tant lipofílic que al no presentar un domini polar dificulta la interacció d'aquest amb la molècula de SPC. La segona explicació seria que el complex, on l'àtom de zinc té un entorn de coordinació tetraèdric, no sigui capaç d'adoptar una conformació que li permeti incorporar-se a l'interior de la membrana. És a dir, a diferència de compostos com el colesterol, aquesta molècula no es pot situar en una conformació menys voluminosa que li permeti cabre dins de l'espai lipofílic de la membrana.

Aquests resultats mostren que no és viable la idea inicial de preparar vesícules de SPC amb Zn(DtHP) per fer la posterior reacció de transmetal·lació per obtenir liposomes marcats radioactivament. Després d'aquests resultats es va inclús descartar procedir a fer els experiments amb liposomes preformats de SPC, perquè si la incorporació a les bicapes no es dona quan el control és termodinàmic, és inviable suposar que tindrà lloc en condicions de control cinètic.

### 5.3.2. Estudis d'agregació de Re(DtHP)TPPTS pur i en vesícules de SPC

Tot i els resultats anteriors, es va decidir estudiar el comportament del compost de reni en liposomes a fi de trobar una alternativa que passaria per duu a terme la reacció de transmetal·lació (entre el Zn(DtHP) i el precursor de reni o tecneci), en presència de liposomes preformats. A diferència de l'apartat anterior, durant el transcurs de la reacció les propietats de tensioactiu de la molècula formada M(DtHP)TPPTS (on M és Re o  $^{99m}\text{Tc}$ ) haurien de permetre la incorporació *in situ* en les vesícules presents en el medi de reacció (**Esquema 25**).

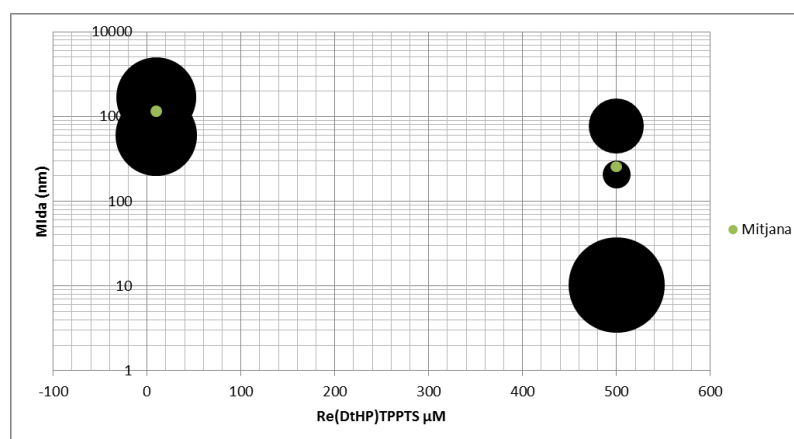


**Esquema 25.** Reacció de transmetal·lació entre el Zn(DtHP) i el precursor de reni o tecneci per donar la posterior incorporació en una bicapa de la molècula amfifílica formada.

Així doncs, tenint aquest nou objectiu present, a continuació s'estudia si els complexos per si sols tenen un comportament de metal·losurfactant i són capaços d'incorporar-se en SPC a diferència del complex de zinc. Atès que les baixes concentracions de tecneci-99m no permeten la caracterització de les vesícules o agregats mitjançant tècniques comunes (DLS, espectroscòpia de IR o UV-Vis) els següents estudis es duen a terme amb el complex homòleg de complex de reni, com a model del complex amb tecneci-99m.

### 5.3.2.1. Autoagregació de Re(DtHP)TPPTS

Per saber si el compost de Re(DtHP) té un comportament de metal·losurfactant, i per tant, té la capacitat de formar agregats per si sol, es van preparar films amb només el complex que es van hidratar per donar concentracions 10  $\mu\text{M}$  i 0,5 mM. Seguidament es va mesurar la distribució de la mida de partícula de cada mostra amb DLS (Figura 61).



**Figura 61.** Distribució de mides dels agregats de Re(HP)TPPTS obtinguts a les concentracions de 10  $\mu\text{M}$  i 0,5 mM (dreta).

D'acord amb els resultats, en les dues concentracions s'obtenen agregats de mida molt variada, des de 10 nm, en el cas de la més concentrada, fins a 1  $\mu\text{m}$ . Tot i tenir distribucions molt diverses, les dades indiquen que la naturalesa amfifílica del Re(DtHP)TPPTS el fa capaç d'autoagregar-se. Aquests experiments van suposar uns resultats positius perquè tot feia pensar que, si el complex de reni tenia un cert caràcter de tensioactiu, aquest podria interaccionar amb els fosfolípids per donar estructures estables.

Al veure que el complex de reni formava agregats en medi aquós, es van obtenir imatges per *cryo*-TEM amb la intenció d'estudiar la seva morfologia (**Figura 62**). Aquestes van ser obtingudes a partir d'una mostra de complex a una concentració de 2 mM.



**Figura 62.** Fotografia de *cryo*-TEM dels agregats del compost Re(DtHP)TPPTS pur a una concentració de 2 mM.

La imatge mostra estructures allargades i de mida considerablement homogènia d'aproximadament 200 nm de llargada. Com es pot apreciar, les estructures referides són només

coincidents amb la població de 200 nm detectada per DLS a una concentració de 0,5 mM. Aquest fet pot explicar-se per la limitació de la *cryo*-TEM per detectar agregats molt petits (menors als 10 nm) i pel fet que el mètode de preparació de les mostres fa que els agregats amb mides superiors a, aproximadament, 1 μm siguin eliminats de la reixeta en la qual s'estudia la mostra<sup>[108]</sup>. En tot cas, la combinació dels resultats de DLS i *cryo*-TEM confirmen que el complex Re(DtHP)TPPTS té la capacitat d'autoagregar-se i formar diversos tipus d'estructures en medi aquós.

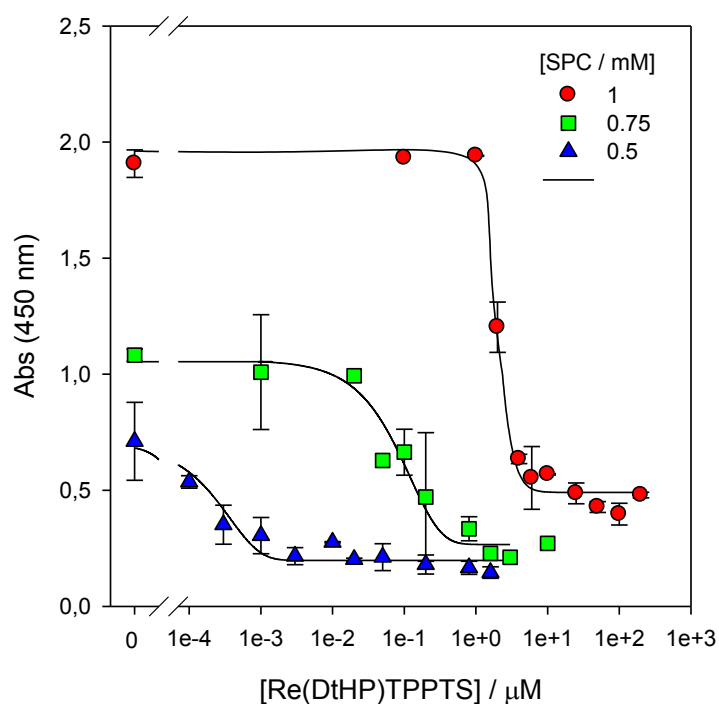
### 5.3.2.2. Estudis de formació de vesícules mixtes a partir de films homogenis Re(DtHP)TPPTS:SPC

A fi de determinar si el complex de Re(DtHP)TPPTS té la capacitat de formar vesícules mixtes amb SPC, es van preparar films mixtes a partir de solucions de CHCl<sub>3</sub> i MeOH (2:1 v/v) on s'hi dissolen el Re(DtHP)TPPTS pur i SPC. Les solucions aquoses que s'obtenen contenen tres concentracions fixes de SPC (0,5 mM, 0,75 mM, i 1m M) i concentracions creixents de MT. Per tal de comprovar l'efecte de la incorporació del MT a les membranes es mesura l'absorbància a 450 nm que, indirectament,



proporciona informació sobre la mida de les vesícules (7.1.1.3. *Materials and Methods*).

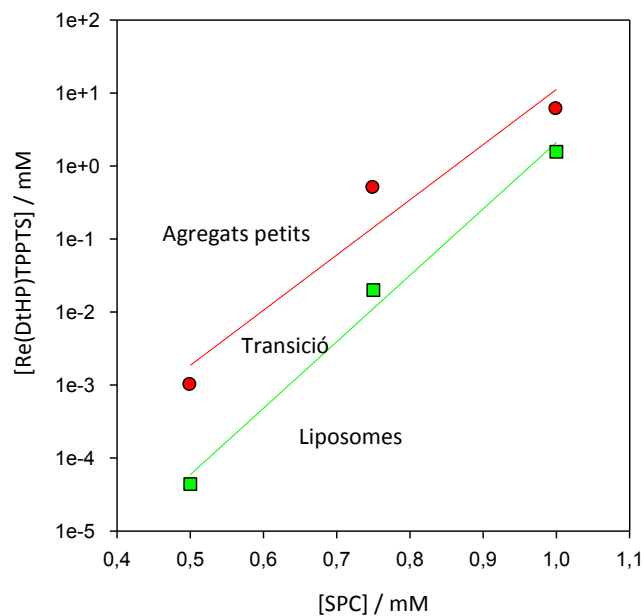
En el primer gràfic (**Figura 63**) s'observa el descens de l'absorbància en augmentar la concentració del complex de reni, fet que indica que a major concentració de complex metàl·lic les vesícules mixtes tenen una mida menor. Aquest comportament és típic dels tensioactius que poden solubilitzar els liposomes. A baixes concentracions, les vesícules de SPC són capaces d'incorporar el MT sense pràcticament variar la mida, no obstant, existeix una concentració crítica a partir de la qual aquestes només s'estabilitzen si redueixen la dimensió, fins a arribar a un plató on les estructures són molt petites.



**Figura 63.** Efecte en l'absorbància de les vesícules en incrementar la concentració de MT.

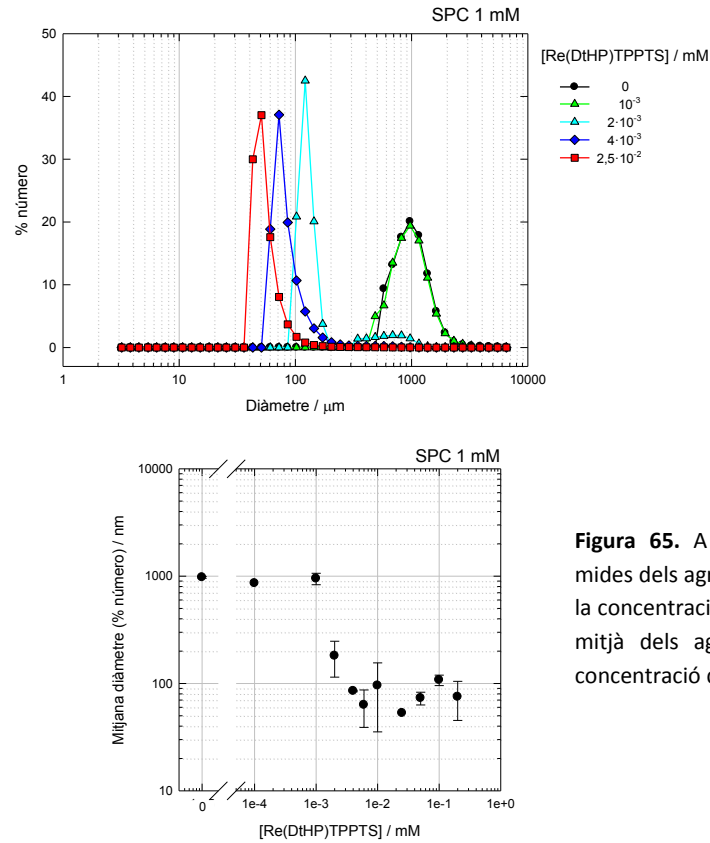
De cada corba es poden treure els punts crítics *Onset/Offset*, que corresponen als punts on la corba estimada fa un canvi bruscat de pendent. Si s'agafen les concentracions de complex de reni i SPC dels punts *Onset/Offset* per a cada corba, es pot representar un gràfic (diagrama de fases) que permet, de manera aproximada,

deduir quin tipus d'agregat (de mida petita, transició o liposomes) obtindrem en funció de la relació de concentració Re(DtHP)TPPTS:SPC (**Figura 62**).



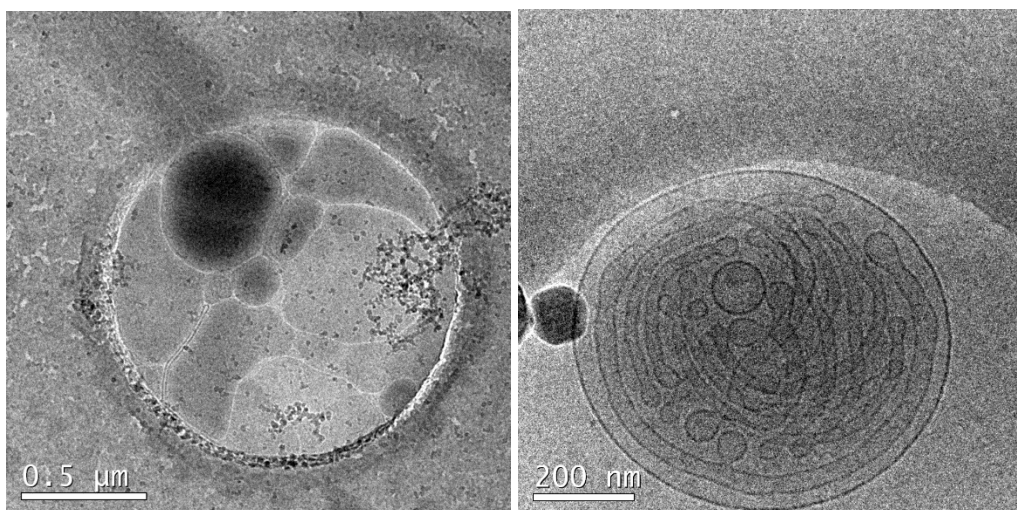
**Figura 64.** Diagrama de fases del sistema Re(DtHP)TPPTS:SPC obtingut a partir dels punts Onset/Offset dels espectres d'absorbància.

L'evolució dels agregats en augmentar la quantitat de MT en les mesclures també s'observa en les mesures del DLS, on la mida dels liposomes disminueix progressivament en augmentar la concentració del complex de reni (**Figura 63**). Per posar un exemple del gràfic, amb una concentració constant de SPC 1 mM s'arriben a tenir una distribució homogènia d'uns 60 nm a concentracions de metal·losurfactant de  $2,5 \cdot 10^{-2}$  mM, quan inicialment, en absència del MT, la mida era d'aproximadament 1  $\mu\text{m}$ .

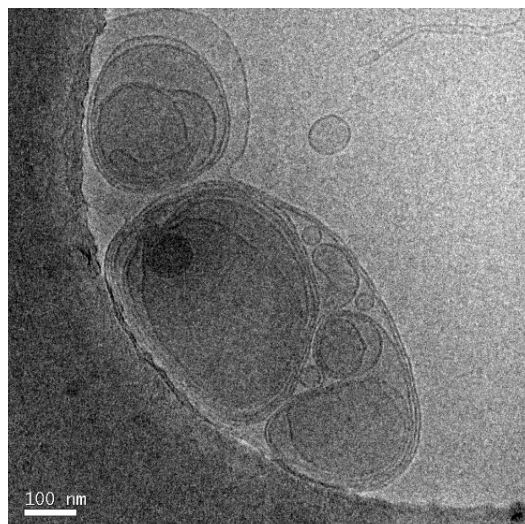


**Figura 65.** A d'alt, distribució de les mides dels agregats mixtes en funció de la concentració de MT. A baix, diàmetre mitjà dels agregats en funció de la concentració de MT.

Per a acabar de complementar aquest anàlisi, es van preparar dues mostres partint de films homogenis a concentracions  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}/\text{SPC } 10^{-4} \text{ mM}:1 \text{ mM}$  i  $0,05 \text{ mM}:1 \text{ mM}$ , per ser estudiades mitjançant microscopia *cryo*-TEM (**Figura 65**). D'altra banda, per poder compara les vesícules en presència de metall i sense, també es van fer enregistrar imatges d'un solució de liposomes de SPC pura a una concentració 3 mM.



**Figura 66.** Fotografies obtingudes amb *cryo*-TEM, a l'esquerra vesícules a una relació  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}/\text{SPC } 10^{-4} \text{ mM}:1 \text{ mM}$  i a la dreta  $0,05 \text{ mM}:1 \text{ mM}$ .



**Figura 67.** Imatge *cryo*-TEM de vesícules de SPC pur 3 mM

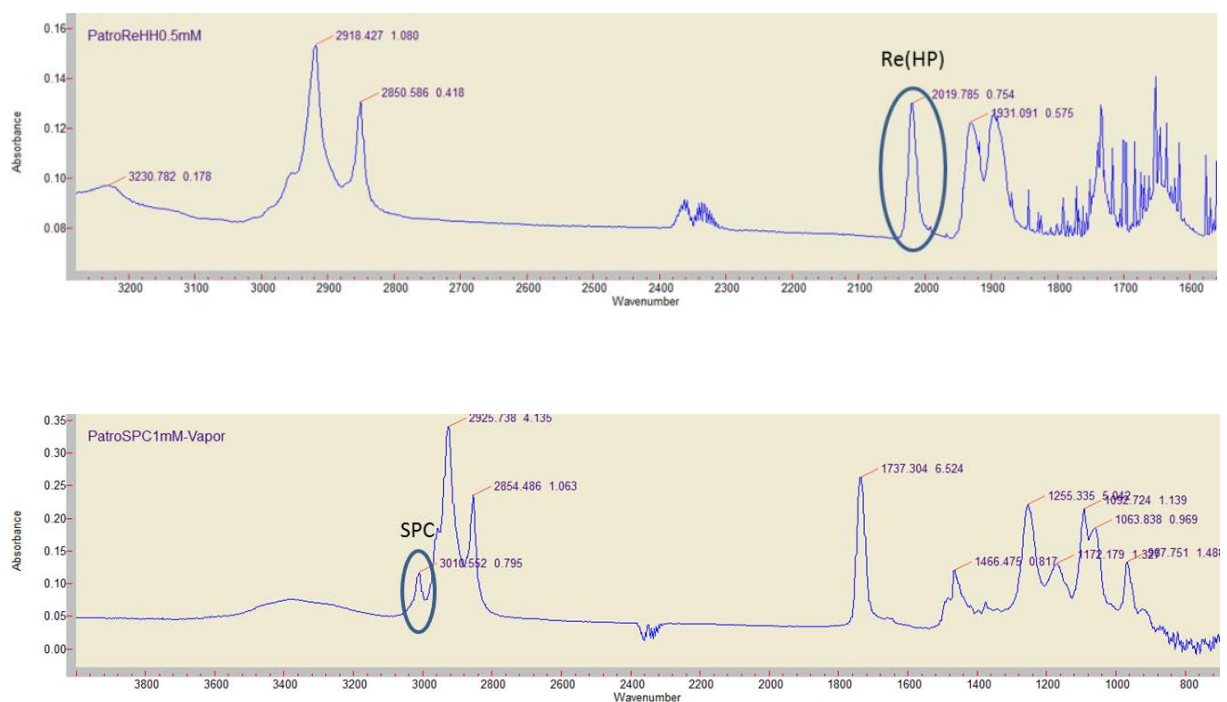
De nou, les imatges obtingudes són coherents amb els experiments d'agregació anteriors ja que les dues imatges d'agregats mixtes demostren que a major concentració de reni es formen vesícules de mida més reduïda. Pel que fa a la morfologia de les vesícules, en els tres casos (dues mesclures SPC/MT i SPC pur) s'obtenen liposomes multilamel·lars, però les de SPC pur presenten una lamel·laritat superior que aquelles que contenen metall. Una possible explicació d'aquest fenomen podria ser una possible repulsió entre les bicapes de les vesícules causada per les tres càrregues negatives dels sulfonats del lligand TPPTS<sup>[109,110]</sup>.

Amb el recull de totes aquestes dades es pot afirmar que el compost de reni i la SPC interaccionen entre si per formar agregats mixtes quan es parteix d'un film amb els dos compostos.

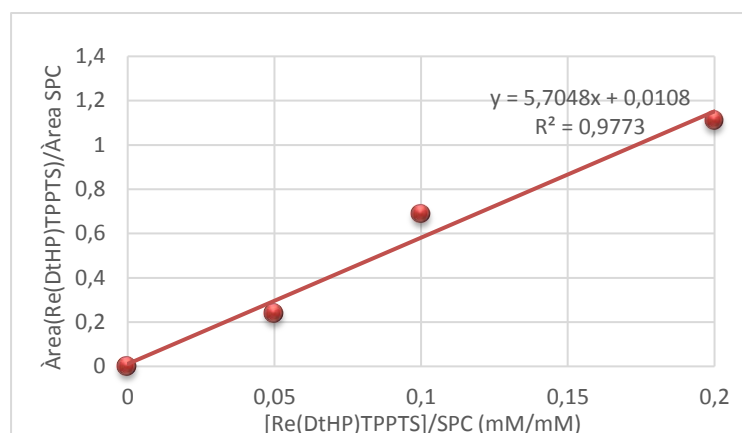
### 5.3.2.3. Quantificació de la encapsulació de Re(DtHP)TPPTS en vesícules de SPC

Els experiments d'incorporació han estat positius i permeten confirmar que el MT de reni i la SPC formen vesícules mixtes quan es parteix de films homogenis.

Conseqüentment, a continuació es quantifica la concentració de MTs dins les vesícules mitjançant espectrofotometria d'infraroig. Atès que el Re(DtHP)TPPTS presenta una banda molt característica a  $2020\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 68**) que correspon a una vibració dels carbonils metàl·lics, i sabent que la SPC en presenta una altre també característica a  $3010\text{ cm}^{-1}$ , que s'assigna a la vibració C-H dels dobles enllaços en les cadenes hidrocarbonades, a partir de mescles entre els dos compostos es va obtenir una recta patró on es relaciona el quocient entre de l'àrea del pic de reni i l'assignat a la SPC amb el quocient de la concentració de complex de reni entre la concentració de SPC, que es va mantenir constant a 1 mM.



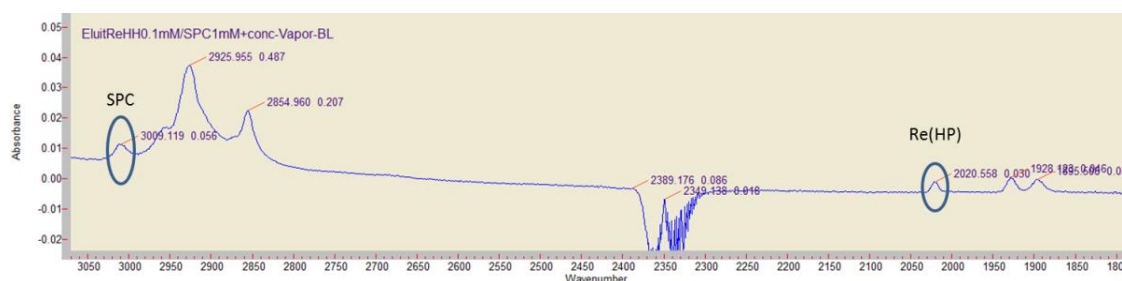
**Figura 68.** Espectre infraroig del Re(DtHP)TPPTS (superior), espectre infraroig del SPC (inferior)



**Figura 69.** Recta de calibratge de les àrees de MT/SPC en front el quocient de concentracions MT/SPC (mM/mM).

Seguidament es van preparar mostres de vesícules partint de films homogenis de Re(DtHP)TPPTS i SPC. Un cop formades, per quantificar la concentració de reni contingut en les vesícules és necessari separar aquestes del reni que pugui estar lliure en solució. És per això que es van fer passar les mostres que contenen mescla de liposomes, reni lliure i salts per una columna d'exclusió molecular de Sephadex-G25.

Per corroborar que les primeres fraccions contenen vesícules, es va comprovar que aquestes absorben a 450 nm i que no ho feien aquelles de major volum d'elució. Es va liofilitzar la fracció que presentava més absorbància, i el film resultant es va redissoldre en el mínim volum de cloroform. Finalment, amb l'ajuda d'una pipeta, es va afegir la solució gota a gota sobre una finestra de transmitància d'infraroig i, després d'evaporar-ne el solvent, se'n va registrar l'espectre (**Figura 70**).



**Figura 70.** Espectre infraroig de la mostra eluïda per exclusió molecular, la qual conté Re(DtHP)TPPTS i SPC

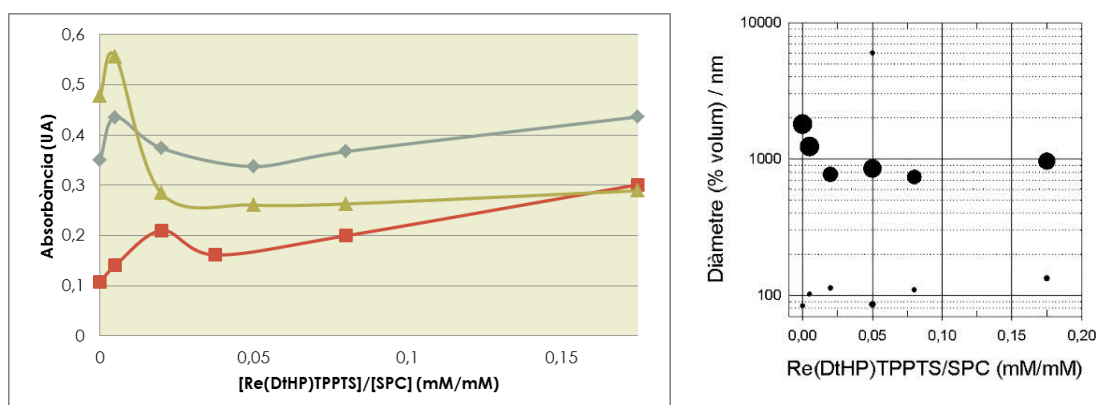
Es va determinar la relació entre les àrees en estudi de Re(DtHP)TPPTS i SPC i aquest resultat es va interpolar en la recta patró obtenint una relació

Re(DtHP)TPPTS/SPC de 0,08:1 mM/mM. Com que la concentració relació inicial de reni afegida era de 0,1:1 mM/mM, es dedueix que el 80 % de metal·losurfactant ha estat incorporat en les vesícules.

L'estudi no només confirma que el complex de reni i el SPC formen vesícules mixtes indicant un bon disseny del metal·losurfactant, sinó que també permet saber que el percentatge d'encapsulació és elevat.

#### 5.3.2.4. Estudis d'incorporació de Re(DtHP)TPPTS en vesícules preformades de SPC

Fins el moment tots els estudis de vesícules mixtes han estat preparades a partir de films que contenen el MT i SPC. Donat que l'objectiu és marcar liposomes radioactivament a partir de vesícules preformades de SPC, el complex de tecneci-99m ha de ser capaç d'incorporar-se a aquestes al final de la reacció de transmetal·lació. En els següents estudis s'utilitzen les tècniques d'espectrofotometria UV-Vis i DLS per determinar si el complex model reni és capaç d'internalitzar-se en liposomes preformats de SPC (7.5.4 *Materials and Methods*).



**Figura 71.** Absorbància (450 nm), a l'esquerra, i distribució de la mida de la població, a la dreta, de suspensions de liposomes de SPC 0,2 mM a les quals s'han afegit concentracions creixents de Re(DtHP)TPPTS. Les lectures es van realitzar després d'1 hora d'incubació de les mostres a temperatura ambient.

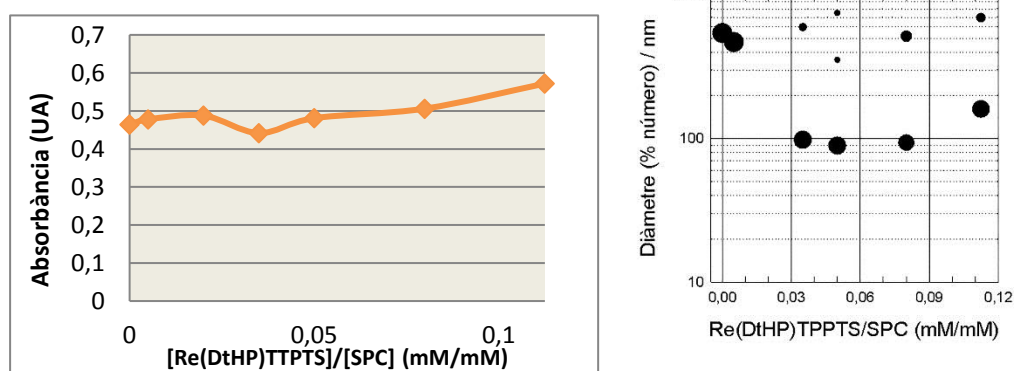
Els resultats que es mostren a la **Figura 71** s'han obtingut a partir de tres experiments independents de solubilització, que consisteix en afegir quantitats creixents de Re(DtHP)TPPTS a suspensions de liposomes de SPC 0,2 mM. Les lectures d'absorbància 450 nm i diàmetre (DLS) han estat realitzades 1 hora després de l'addició del MT i mantenint les mescles a temperatura ambient.

Tot i que la reproductibilitat del valor de l'absorbància és baixa, tant el DLS com l'espectrofotometria d'UV-Vis mostren que hi ha canvis en la mida de les vesícules, fet que pot indicar que es produeix la incorporació del Re(DtHP)TPPTS en els liposomes de SPC prèviament formats. A concentracions baixes de Re(DtHP)TPPTS, les vesícules experimenten un augment de la seva mida que és compatible amb la incorporació del reni a les bicapes de SPC dels liposomes, sense desestabilitzar-les (solubilitzar-les). No obstant, en passar una relació lliurar Re(DtHP)TPPTS/SPC d'aproximadament 4  $\mu$ M: 0,2 mM, els agregats comencen a formar estructures més petites, arribant fins a poblacions de pocs nanòmetres de diàmetre. El comportament descrit és coherent amb la **Figura 64**, on l'extrapolació de les rectes del diagrama de fases a les condicions de l'experiment de la present secció (Re(DtHP)TPPTS/SPC 4  $\mu$ M:0,2 mM ) indicaria que a partir dels films mixtes s'obtindrien agregats petits, tot i que, tenint en compte la **Figura 65**, aquests són més grans que quan es parteix de films homogenis. En tot cas, els resultats de diàmetre obtinguts amb liposomes preformats indicarien que se supera la barrera cinètica i, en 1 hora, el complex s'incorpora les membranes de liposomes de SPC preformats, arribant-se a una situació similar de la que es produeix quan el control és termodinàmic, és a dir, quan el sistema es prepara a partir de films mixtes.

Un fet sorprenent apareix quan encara s'augmenta una mica més la relació Re(DtHP)TPPTS:SPC, ja que sembla que es tornin a formar agregats de mida molt més gran. Aquesta conclusió s'extreu a concentració 35  $\mu$ M tant en el gràfic de l'absorbància, que augmenta considerablement, com en el de DLS, on la mitjana de població (punt verd) es desplaça a valors majors d'un micròmetre. Es desconeixen les causes d'aquest comportament atípic, per la qual cosa seria interessant estudiar-ne els motius fisicoquímics en un futur.



Atès que el DLS no és capaç d'analitzar amb precisió partícules per sobre del micròmetre, es va considerar la possibilitat de validar els resultats anteriors (que van ser obtinguts emprant liposomes preparats per agitació i, per tant, de mida en el rang del micròmetre) utilitzant liposomes de SPC extrusionats per membranes de 800 nm. D'aquesta manera les lectures de DLS se situarien dins un rang en el que l'aparell és més precís. Els resultats es mostren a la **Figura 72**.



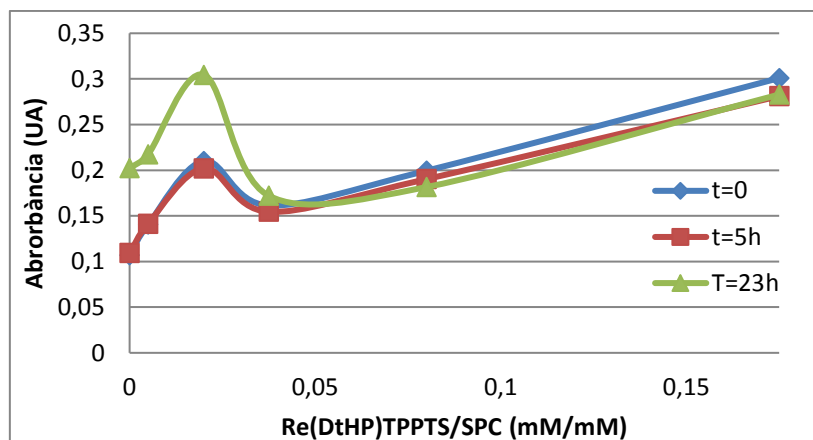
**Figura 72.** Absorbància (450 nm), a dalt, i distribució de la mida de la població, a baix, d'una suspensió de liposomes de SPC 0,2 mM extrusionats per membranes de 800 nm, a la què s'ha afegit concentracions creixents de Re(DtHP)TPPTS. Les lectures es van realitzar després d'1 hora d'incubació de les mostres a temperatura ambient.

En aquest experiment s'observa el mateix comportament que l'obtingut amb els liposomes de mida micromètrica, per la qual cosa es constata que el disseny del metal-losurfactant Re(DtHP)TPPTS és l'adequat per incorporar-se en liposomes de SPC preformats. A més, si el fenomen passa amb el complex de reni, és molt probable que també ho faci l'homòleg de tecneci:  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ .

### 5.3.2.5. Mesures d'estabilitat dels liposomes en el temps

L'estabilitat en el temps és un factor important de cara a la utilització dels liposomes marcats en radiofarmàcia. Per aquest motiu es van preparar suspensions de liposomes preformats de SPC a les quals es van afegir diferents concentracions de reni

i es va seguir la seva l'absorbància en el temps mentre eren conservades a 4 °C i en la foscor.



**Figura 73.** Mesures d'estabilitat de vesícules preformades de SPC amb Re(DtHP)TPPTS incorporat mitjançant espectroscòpia UV-Vis.

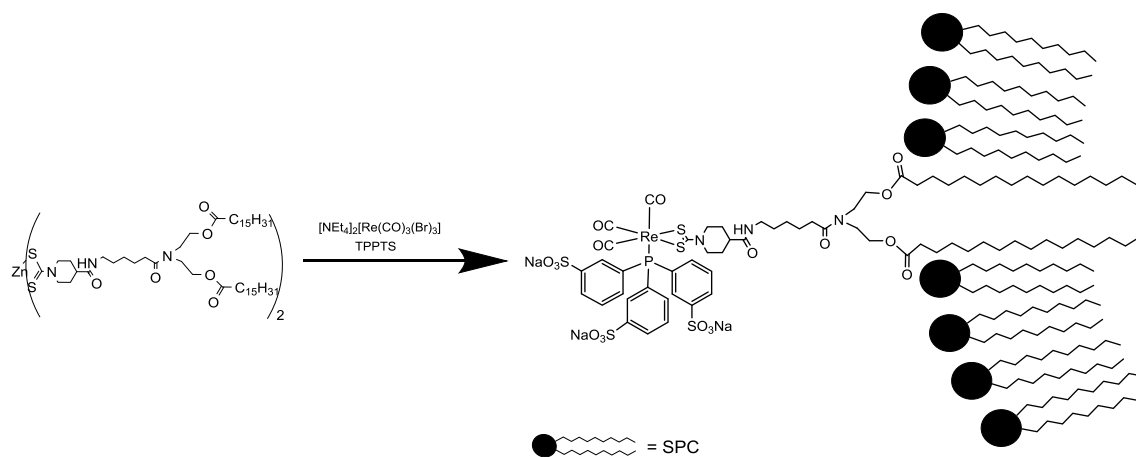
Els resultats indiquen que les vesícules romanen inalterades durant 23 hores independentment de la concentració de Re(DtHP)TPPTS, temps més que suficient si el que es pensa és en aplicacions en radiofarmàcia.

### 5.3.2.6. Reacció de transmetal·lació en condicions de pseudoradiofarmàcia

Fins aquest apartat, s'ha comprovat que el compost de Re(DtHP)TPPTS té les característiques apropiades per formar vesícules amb SPC, tan partint de films mixtes com de vesícules preformades. No obstant, per poder pensar en un sistema per marcar liposomes radioactivament, la incorporació del MT s'ha de donar després de dur a terme la reacció de transmetal·lació [2+1] entre el complex de zinc (Zn(DtHP)) i el de tecneci  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .

Seguint aquesta lògica, i per avaluar la viabilitat del mètode, es va dur a terme un estudi de la reacció entre els precursors de zinc i de reni ( $[\text{NEt}_4][\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Br})_3]$ ) i la fosfina TPPTS (**Esquema 26**), en un medi aquós que conté liposomes preformats de SPC. Anàlogament a experiments anteriors, després de la reacció la solució resultant

s'elueix per una columna de Sephadex G-25 per tal de separar les vesícules dels subproductes en dissolució, així com el complex de zinc insoluble que no hagi reaccionat. Finalment, es liofilitzen les fraccions eluïdes, que posteriorment són analitzades mitjançant espectroscòpia d'infraroig (ATR) per avaluar, mitjançant les bandes corresponents als carbonils metàl·lics, si després de la reacció el compost  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  s'incorpora als liposomes preformats.

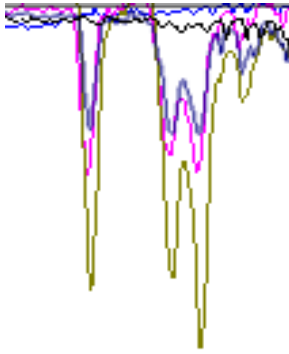


**Esquema 26.** Representació esquemàtica de la reacció de transmetal·lació entre el precursor de reni i la molècula  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  on la molècula amfifílica formada s'incorpora en la capa d'una vesícula. La representació de la bicapa ha estat simplificada.

En aquest estudi la temperatura de reacció és més moderada (60 °C) que en les reaccions de transmetal·lació anteriors amb reni per evitar la descomposició del fosfolípid. L'assaig es va realitzar un volum de 5 mL que conté liposomes preformats de SPC 1 mM prèviament extrusionats per membranes de 400 nm on s'afegeix  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  en excés (1 mg) i  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Br})_3]$  (1 mM). Després d'1 hora de reacció, s'addicionen 5,7 mg de TPPTS i es deixa avançar la reacció durant 3 hores més. En acabar, 1 mL de la suspensió resultant es fa passar per una columna de SEPHADEX i es liofilitzen les fraccions eluïdes que presenten major absorbància al ultraviolat-visible ( $\lambda=450$  nm). Posteriorment, es redissolen en cloroform i s'enregistren els espectres d'infraroig un cop s'ha evaporat el dissolvent de la finestra que conté la mostra.

Tot i que a priori els resultats van ser positius degut a que a les primeres fraccions, on s'elueixen les vesícules, apareixen clarament les senyals dels carbonils del

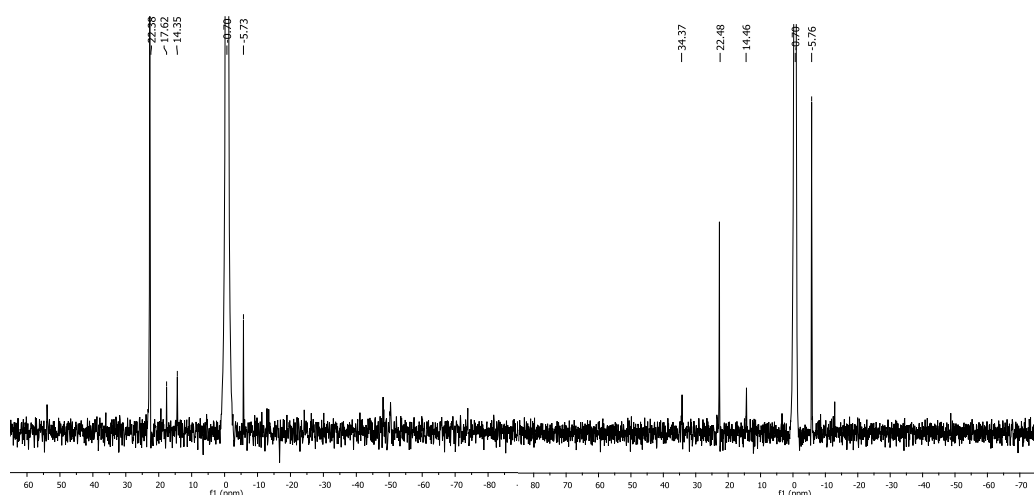
*fac*-{Re(CO)<sub>3</sub>} (**Figura 74**), es va pensar que es podria tractar d'un fals positiu, perquè no quadrava a nivell experimental ja que, qualitativament, al final de la reacció quedava molt complex Zn(DtHP) sense reaccionar.



**Figura 74.** Bandes dels carbonils metàl·lics en les fraccions de columna amb liposomes després de dur a terme la reacció de transmetal·lació en solució aquosa.

Per aquesta raó es va repetir la reacció i es va analitzar el medi després de la reacció sense passar les vesícules per columna, amb la intenció de determinar mitjançant <sup>31</sup>P-RMN quins són els productes de la reacció. Una possible hipòtesi era que l'espècie que s'internalitzava als liposomes fos un subproducte entre el precursor de reni i la fosfina, enlloc del Re(DtHP)TPPTS. Aquesta possibilitat seria raonable degut a que les bandes dels carbonils apareixerien a longituds similars a les del MT.

Per tal de contrastar la hipòtesi es va repetir la reacció en dues situacions diferents: amb presència i en absència de vesícules de SPC. D'aquesta manera es volia comprovar si la presència de vesícules en la reacció podia actuar com a *driving force*, de manera que la incorporació en els liposomes del producte format podria ajudar a la formació, desplaçant l'equilibri de la reacció, ja que els liposomes, de fet, són una fase diferent de l'aquosa.



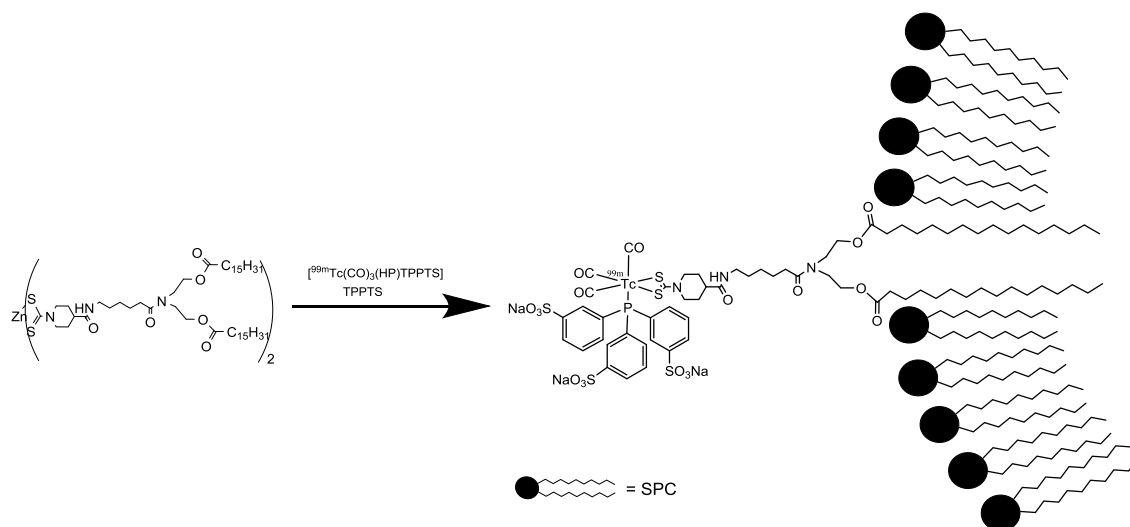
**Figura 75.** Espectre de <sup>31</sup>P-RMN després del cru de reacció. A l'esquerra la reacció simple a la dreta, la mateixa reacció però amb vesícules preformades de SPC

Els resultats es mostren a la **Figura 75**, on el pic a 0 ppm correspon a la senyal d'un capil·lar d'àcid ortofosfòric per referenciar els altres pics. Tot i que en el  $^{31}\text{P}$ -RMN sense SPC s'observa un senyal minoritari del nostre producte (17,6 ppm), els resultats van clarament en contra de la nostra aproximació perquè el producte majoritari correspon al complex de reni i la TPPTS (22,7 ppm). Aquest experiment va permetre treure'n dues conclusions: 1) es pot afirmar que la reacció entre el precursor de zinc i el complex  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  té lloc en medi aquós per donar el producte  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ , no obstant, aquesta reacció és minoritària perquè el complex  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  és tant hidrofòbic i insoluble que afavoreix la reacció secundària entre la fosfina i el reni, i 2) el subproducte entre el reni i la TPPTS també és capaç d'entrar als liposomes quedant encapsulat en els liposomes de SPC. La segona conclusió es pot justificar perquè la hipotètica molècula  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{TPPTS})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  també pot presentar un cert caràcter amfifílic ja que el fragment  $\{fac\text{-Re}(\text{CO})_3\}^+$  té característiques marcadament hidrofòbiques. Al no ser l'objectiu d'aquest treball no es va estudiar en detall la incorporació d'aquesta molècula derivada de la fosfina en la bicapa, però no es descarta fer-ho en un futur, perquè també podria suposar una estratègia alternativa per marcar liposomes radioactivament.

### 5.3.3. Reacció de transmetal·lació [2+1] amb $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Tot i comprovar que la reacció amb el complex de reni no funcionava tal i com s'havia previst, es va dur a terme l'estudi de la reacció entre el complex de zinc i el  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  per formar el complex homòleg de tecneci-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ ). Aquesta idea no és un contrasentit ja que les condicions de reacció d'aquests dos experiments són molt diferents. Així doncs, atès que el problema podria ser que la concentració de reni és molt superior a la de  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  en solució, fet que afavoreix reaccions secundàries, es va intentar la reacció directa entre el complex

de zinc i el  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  donat que la concentració del complex de tecneci és ordres de magnitud inferior a la dels complexos de reni.



**Esquema 27.** Representació de la reacció de transmetal·lació amb tecneci-99m i de la incorporació del producte en una membrana d'un liposoma. Aquest últim ha estat en simplificat en forma de monocapa.

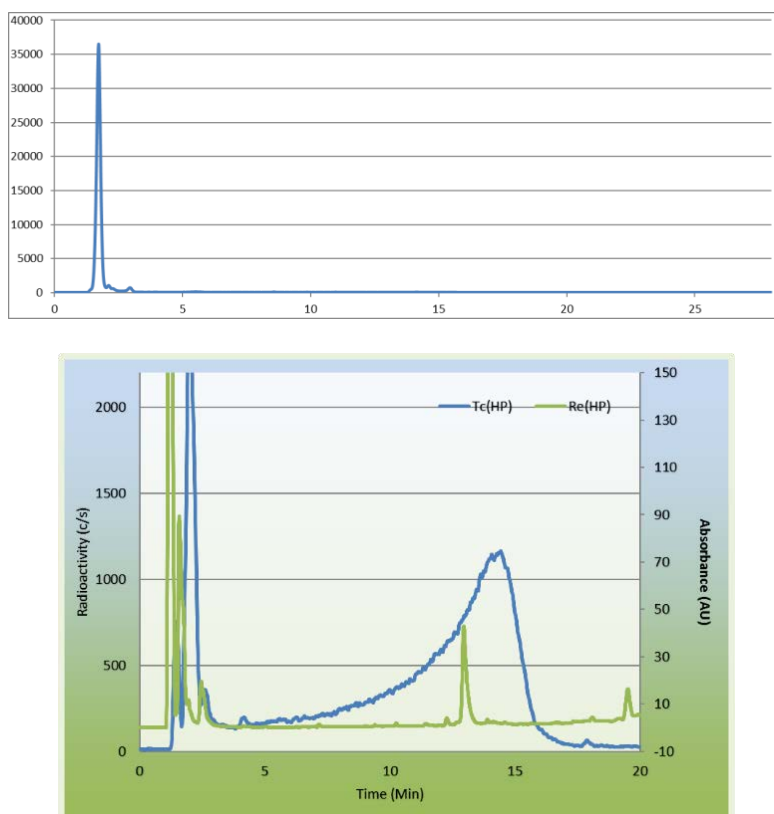
El procediment experimental és idèntic al descrit en l'apartat 4.2.2. amb la variant que durant tota la reacció es va sonicar amb una sonda la solució per dos raons: 1) afavorir la solubilització del zinc i, 2) trencar les vesícules de SPC per promoure que el complex  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  s'internalitzés. Cal tenir en compte que durant la sonicació els liposomes es trenquen i es tornen a formar, habitualment disminuint la seva mida i el nombre de bicapes que els formen.

En primer lloc es va mesurar per RP-HPLC i amb el detector UV-Vis el temps de retenció del complex model de reni optimitzant les condicions de la fase mòbil. Donat que s'està eluint un tensioactiu, no es convenient treballar amb solucions 100 % aquoses perquè es formen agregats que poden augmentar molt la pressió de la columna, per la qual cosa es va optar per injectar les mostres dissoltes en cloroform.

La primera aproximació va ser simplement fer la reacció directa amb presència de vesícules de SPC, liofilitzar la solució resultant i finalment redissoldre-la en cloroform per analitzar-la.

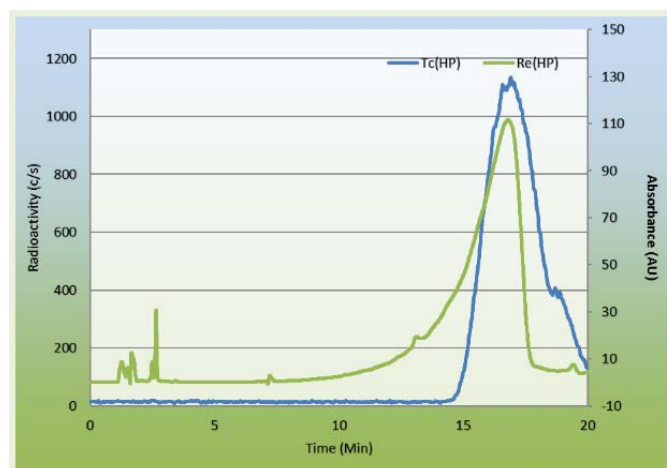
El primer cromatograma correspon al  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  pur, que en ser un compost hidrofílic elueix pràcticament en el temps mort. El segon cromatograma

correspon al complex de  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  i al  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  després de la reacció. Com es pot comprovar, tot i que encara té reactiu inicial i algun derivat del catió  $(^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3)^+$ , es va aconseguir obtenir el compost  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  amb un radiopuresa superior al 70 %



**Figura 76.** A dalt, radiocromatograma de  $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ . A baix, radiocromatograma de la molècula  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  (blau) i cromatograma del homòleg de reni,  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  (verd).

Com que en la primera aproximació la reacció va ser positiva pels nostres objectius, es va repetir el procediment però en aquest cas eluint la solució final per una columna de Sephadex G-25. D'aquesta manera es pretenia comprovar si a més de formar-se el complex de tecneci-99m, el producte s'incorporava en les vesícules. Així doncs, la fracció d'elució que a simple vista presentava més terbolesa (i que, per tant, conté liposomes) va ser assecada al buit i es va injectar en cloroform al sistema HPLC.



**Figura 77.** Radiocromatograma de la molècula  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  en les vesícules de SPC.

En el cromatograma només s'observa un sol pic que s'assigna al producte desitjat. Aquest resultat no només constata la formació del compost, sinó que a més desvela que aquest ha estat l'únic compost que s'ha incorporat en els liposomes.

Si s'observa el cromatograma amb detall es pot apreciar que els temps de retenció entre el compost de reni i tecneci varien lleugerament entre si. Això és degut al fet de treballar amb el *buffer* TEAP en la fase mòbil, una circumstància que requereix de temps d'estabilització molt llargs entre anàlisis per poder tenir resultats totalment reproduïbles. Per raons experimentals (decaïment del producte radioactiu) no és possible deixar passar aquests temps llargs d'estabilització, i per aquest motiu es va optar per co-injectar en el primer cromatograma (**Figura 76**) els complexos de tecneci i reni en la mateixa anàlisi. D'aquesta manera els senyals s'obtenen a temps de retenció similars, tot i que amb formes del pic força diferents, fet que no s'ha pogut justificar. No obstant, cal recordar que tots els subproductes de la reacció són més hidrofílics que els complexos i elueixen a temps de retenció molt més curts. En el cromatograma de la **Figura 77**, que no és el resultat d'una coinjecció, els pics sí que tenen formes molt similars i temps de retenció encara més semblants. En aquest cas el cromatograma de  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  va ser enregistrat dies abans de la reacció amb l'homòleg de tecneci- $^{99m}$ .

Aquests primers estudis, que caldria optimitzar en un futur, han permès confirmar que tot i que el precursor de zinc no és útil per formar el compost



Re(DtHP)TPPTS, probablement degut a que el Zn(DTHP) és massa insoluble en medi aquós, sí que és suficientment soluble perquè la reacció funcioni amb el precursor de  $^{99m}\text{Tc}$ , que es troba en una concentració 3 o 4 ordres de magnitud inferiors que el precursor de reni. Així doncs, s'ha comprovat que la reacció de transmetal·lació [2+1] rendeix el compost  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$ , que té un comportament amfifílic que el permet incorporar-se en liposomes preformats, fet que podria ser molt atractiu en aplicacions en radiofarmàcia, perquè el procés és ràpid (30 min), senzill i assequible.

## 6. CONCLUSIONS

1. [2+1] transmetallation reaction for the preparation of potential second generation radiopharmaceuticals.

1.1. In this work the [2+1] transmetallation reaction have been useful to prepare four new rhenium complexes (**Re(DtPip)ISO**, **Re(DtGlu)TPPTS**, **Re(DtFolAq)TPPTS** and **Re(DtFolEh)TPPTS**) which contain a biologically active fragment, the  $\{fac-Re(CO)_3\}$  core and a  $\pi$ -acceptor ligand. All these compounds have been fully characterized by means of standard tools such as; IR, NMR, ESI-HRMS and elemental analysis.

1.1.1. Two new  $\pi$ -acceptor ligands (*tert*-buthyl isocyanide and triphenylphosphine trisulfonate) have been used for the synthesis of Re(DtPip)ISO and Re(DtGlu)TPPTS, respectively. The results showed that [2+1] transmetallation reaction is a very **versatile strategy for the preparation of potential radiopharmacueticals** because different  $\pi$ -acceptor ligands can be used to improve the features of the final radiotracer.

1.1.2. Before the preparation of rhenium compounds with folic acid, two new zinc complexes, **Zn(DtFolAq)** and **Zn(DtFolEh)** have been successfully biconjugated with two previous reported folic derivative (FolAq and FolEh) and they have been completely characterized by common tools. The zinc complexes have allow the preparation of the corresponding rhenium complex with the ligand TPPTS.

1.2. Since rhenium compounds are used as a model in RP-HPLC for the preparation of the technetium-99m homologues, the fully characterization of all the rhenium compounds mentioned above has paved the way to

perform the radiosynthesis with the precursor  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  obtaining four new technetium complexes;  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtPip})\text{ISO}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ , by means of the transmetallation reaction using the proper  $\pi$ -acceptor ligand and the corresponding bioconjugated zinc complex. The success in the synthesis for all the radiocompounds leads to an important conclusion: **[2+1] transametallation reaction is a robust strategy to obtain potential radiopharmaceuticals**. Moreover, the methodology can be applied for different biomolecules which contains an amino group in the structure. The soft conditions in which the reaction takes place is another clear advantage of this approach because some biologically active molecules can be easily degraded under higher temperatures. For all these reasons, the transmetallation reaction is an appropriate approach for the preparation of potential radiopharmaceuticals, and, due to its technical simplicity, it could be implemented as a radiopharmaceutical kit.

- 1.3. The biological activity of the radiotracers for tumour imaging purpose,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ , has been studied in *in vitro* and *in vivo* experiments. *In vitro* assays showed specific accumulation in cancer cells being more considerable in the case of the glucosamine derivatives due to the difference between the blocking and the unblocking studies. In fact, to the best of our knowledge, the **cell uptake** in case of  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  is higher than the reported data for all previously compounds based on  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucosamine derivatives as a biomolecule. On the other hand, the biodistribution studies with mice by means of cut and count technique and recording nanoSPECT/CT images show that, despite the higher accumulation in the intestine organ for all the compounds, the radiotracers were up to three times more accumulated in the tumour compared with a muscle as a blank tissue. In fact, this difference is large enough which allows the **visualization of the tumour specially for the radiotracers  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and**

$^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  by means of nanoSPECT/CT images. Moreover, regarding the different linkers in the folic derivatives, it can be stated that **the increase in the polarity of the chain favours the accumulation of the radiotracer towards the tumour and its excretion by renal process.** For all these reasons, it must be highlighted another relevant conclusion, **the radiolabelling strategy allows the preparation of potential radiopharmaceuticals showing high specific activity without the need of further purification with biological activity.**

## 2. [2+1] transmetallation reaction for liposome radiolabelling.

2.1. With the aim of developing a new approach for liposome radiolabelling, it has been synthesized a new molecule ( $\text{NH}_2\text{-HP}$ ) which is very lipophilic and, due to its easy reactivity,  $\text{NH}_2\text{-HP}$  could be used to confer hydrophobic character to different complexes or organic molecules. Taking advantage of its lipophilicity,  $\text{NH}_2\text{-HP}$  has been reacted with the zinc precursor  $\text{Zn}(\text{Succ})$  to firstly prepare a lipophilic zinc complex,  **$\text{Zn}(\text{DtHP})$** , and, afterwards, the amphiphilic rhenium complex  **$\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$** . Both complexes have been successfully characterized by means of common spectroscopic and spectrometric analysis.

2.2. The **self-aggregation properties of  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  and  $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$**  were studied **from pure films of MTs and phospholipid (SPC) and from homogenous MTs/SPC films.** The results showed that  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  complex is not incorporated in the phospholipid bilayer. This fact could be associated with the lipophilic character of  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  and also with its structure. On the other hand, since  **$\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  has a clear amphiphilic character** it forms aggregates by itself and it is capable to be **efficiently incorporated into preformed liposomes of SPC.** However, the transmetallation reaction in aqueous media between the precursor  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$ , the complex  $\text{Zn}(\text{DtHP})$  and the monodentate ligand TPPTS in presence of preformed

liposomes, gives rise to the formation of Re(DtHP)TPPTS as a minor product, because the low water solubility of the zinc complex promotes the direct reaction between the phosphine and the rhenium complex which is also incorporated in the vesicles.

2.3. The [2+1] transmetallation was performed with Zn(DtHP),  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  and TPPTS in presence of preformed SPC liposomes. At the end of the reaction, it was possible to confirm that the amphiphilic product  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  is incorporated into the vesicles. This first study opens a door to a **novel and adequate method for the preparation of liposome radiolabelled with technetium-99m by means of the [2+1] transmetallation reaction.**

## 7. MATERIALS AND METHODS

Most of the reactions were performed by means of Schlenk techniques under nitrogen atmosphere to avoid the oxidation or the hydration of the reactants. All reagents were commercially available and used without further purification. All the reagents were provided by Sigma or Across Organics and the solvents were purchased from the company VWR and, if needed, they were dried using molecular sieves of 3 Å. Deuterated solvents were purchased from Euriso-Top.

All radioactive material has been manipulated strictly following the current regulation of *Consejo de Seguridad Nuclear* (CSN).  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  was provided by the company *Catalana De Dispensación, S.A.* (CADISA) where it is obtained by means of  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator. Normally, the activity of ordered dose was 1 mCi/mL.

### 7.1 Instrumentation

#### 7.1.1. Spectroscopy

##### 7.1.1.1. Nuclear magnetic resonance

All the nuclear magnetic resonance spectra,  $^1\text{H}$ ;  $^{31}\text{P}$ ;  $^{13}\text{C}$ -NMR, were recorded at the *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* at *Universitat Autònoma de Barcelona* using three different pieces of equipment: DPX-250, DPX-360, AV400. All data was been recorded at 298K.

##### 7.1.1.2. Infrared spectroscopy

Attenuated total reflection infrared spectra (ATR-IR) were registered at the *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* at *Universitat Autònoma de Barcelona* by means of Tenson 27 from the company Bruker. Fourier-transform infrared spectra

(FTIR) were recorded at *Unitat de Biofísica* at *Universitat Autònoma de Barcelona* using Varian 600-IR equipment.

#### **7.1.1.3. Ultraviolet-visible spectroscopy**

Ultraviolet-visible spectroscopy spectra were recorded at *Unitat de Biofísica* at *Universitat Autònoma de Barcelona* with the equipment Cary 3 Bio UV-Vis from the Agilent Company.

UV-Vis spectroscopy was mainly used to study the formation of aggregates due to the Rayleigh scattering effect which is based on the elastic scattering of the light from small particles. Thus, since the light is absorbed depending of the particle size, the technique can provide useful information about the size of the aggregates in solution. For instance, if the size of the particles decreases when a surfactant is added in the solution, the absorbance of the sample will also decrease.

#### **7.1.1.4. Dynamic light scattering**

Dynamic light scattering (DLS) is a non-invasive technique which provides information of the size distribution of particles in solution. All measurements have been performed in a Microtrax Ultrafine Particle Analyzer (UPA) 150 and can be expressed in volume, number or area. They were recorded at *Unitat de Biofísica* at *Universitat Autònoma de Barcelona*.

### 7.1.2. Spectrometry

All the spectrometric data was recorded at the *Servei d'Anàlisi Química* at Universitat de Barcelona.

#### 7.1.2.1. High resolution mass spectrometry

High resolution electrospray ionization mass spectrometry (ESI-HRMS) analyses were recorded by means of liquid chromatography equipment 1200 RR from Agilent Technologies coupled with a microTOF-Q time of flight detector from the company Bruker Daltoniks.

#### 7.1.2.2. Coupled plasma emission spectroscopy

Determinations of the zinc concentrations were performed by inductively coupled plasma emission spectroscopy (ICP-OES) with the equipment optima 4300DV System from Perkin-Elmer.

### 7.1.3. Elemental analysis

Elemental analysis determining the weight percentages of the elements C, H, O and S of the synthesised products were performed at the *Servei d'Anàlisi Química* at *Universitat Autònoma de Barcelona* in a Thermo Fisher Scientific Flash EA 2000 CHNS equipment. Samples which contained Sulphur were burned with the catalyzer  $V_2O_5$  to optimize the analysis.



#### 7.1.4. Reverse phase high pressure resolution chromatography (RP-HPLC)

Reverse phase high pressure resolution chromatography (RP-HPLC) analyses were performed in *Unitat de Química Inorgànica at Universitat Autònoma de Barcelona* using an Agilent Technologies Serie 1200 system with automatic injection and a C-18 Agilent Eclipse XDB-C18 column. Rhenium compounds were detected with a diode multiwavelength UV-Vis G1315D detector (monitoring at 250 nm), while the radiodetector for technetium-99m complexes used was raytest GABI from the company Raytest Radiometric.

RP-HPLC analyses in BARTS Cancer Institute (QMUL, London) were performed using a Beckman system gold 128 solvent module and a 166 UV detector module (monitoring at 280 nm) and radioactivity was detected using a gamma-detector (Raytest). Compounds were separated on a Jupiter 5  $\mu\text{m}$  C4 from the company Phenomenex.

Different gradients and mobile phase methods have been used to get the best compounds separation. Protocol 1, 2 and 3 were performed at *Universitat Autònoma de Barcelona* using solvents A = H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) and B = ACN (0,05% TFA). Studies performed in London have shown that employing TEAP instead of TFA in the organic phase improves the reproducibility of the radiochromatograms. Thus, new protocols 4 and 5 were implemented where C = ACN (0,1 M TEAP). For all the protocols the flow rate is 1 ml/min.

##### Protocol 1

Re/<sup>99m</sup>Tc(DtPip)ISO

Time (min)	A	B
0	60	40
3	60	40
10	100	0
18	100	0
22	60	40

Table 6. Mobile phase protocol 1.

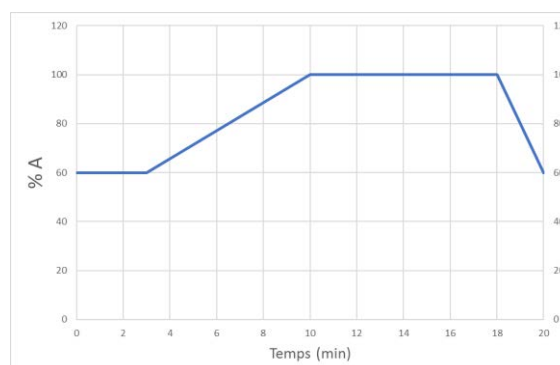


Figure 78. Graphic of the protocol 1.

Protocol 2

Re/<sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS i Re/<sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS

Time (min)	A	B
0	95	5
5	95	5
15	0	100
18	0	100
25	95	5
28	95	5

Table 7. Mobile phase protocol 2.

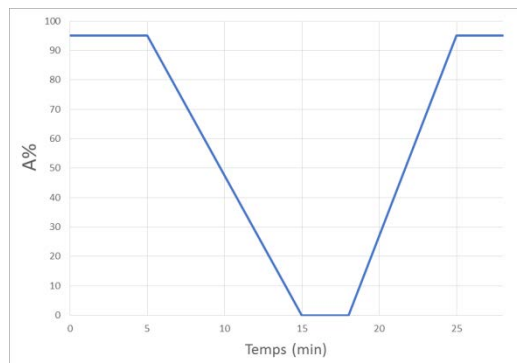


Figure 79. Graphic of the protocol 2.

Protocol 3

Re/<sup>99m</sup>Tc(DtGlu)TPPTS

Time (min)	A	B
0	95	5
3	95	5
17	0	100
22	0	100
25	95	5
28	95	5

Table 8. Mobile phase protocol 3.

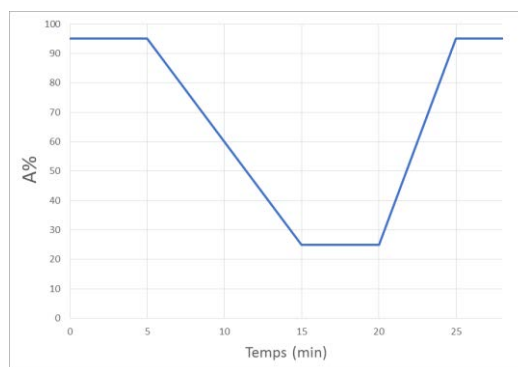


Figure 80. Graphic of the protocol 3.

Protocol 4

Re/<sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS, Re/<sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS i Re/<sup>99m</sup>Tc(DtGlu)TPPTS

Time (min)	A	C
0	95	5
5	95	5
15	25	75
20	25	75
25	95	5
28	95	5

Table 9. Mobile phase protocol 4.

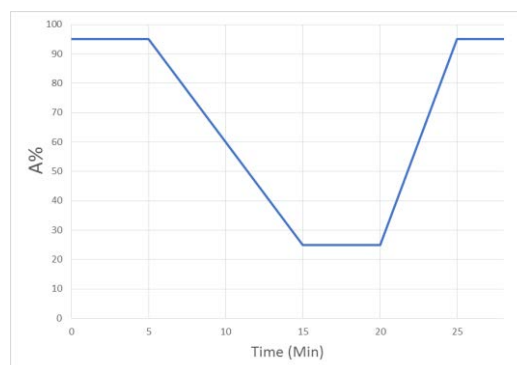


Figure 81. Graphic of the protocol 4.

## Protocol 5

Re/<sup>99m</sup>Tc(DtHP)TPPTS

Time (min)	A	C
0	95	5
5	95	5
15	25	75
20	25	75
25	95	5
28	95	5

Table 10. Mobile phase protocol 5.

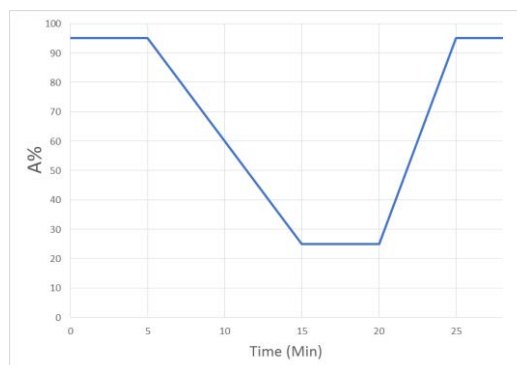


Figure 82. Graphic of the protocol 5.

## 7.1.5. Gamma Counter

Gamma counter is a very accurate piece of equipment, useful for automatically quantifying the radioactivity in a sample emitted by a gamma radionuclide. Basically, it contains a luminescence crystal called scintillator capable of converting gamma rays to UV light which will provide the signal for the detector. The instrument used was 1282 Compugamma Cs from the Company LKB Wallac.

## 7.1.6. NanoSPECT/CT

Since nanoSPECT/CT technology provides images without killing the animal, it is possible to study the biodistribution of the potential radiopharmaceuticals in a mouse. The images were obtained from one mouse for each radiocompound group ([<sup>99m</sup>Tc(DtGlu)TPPTS], [<sup>99m</sup>Tc(DtFolAq)TPPTS] and [<sup>99m</sup>Tc(DtFolEh)TPPTS]) at 1 h and 4 h time points. SPECT settings: aperture set 1.4 mm, imaged for 30 min at 1 hour time point and 45 min at 4 hour time point. CT settings: 1000 ms exposure time and 45 KVP (peak kilovoltage). After acquisition, data was reconstructed with Vivo Quant software.

The nanoSPECT/CT machine used for the studies is a four-head camera from the company Bioscan Inc.

### 7.1.7. Transmission electron cryomicroscopy

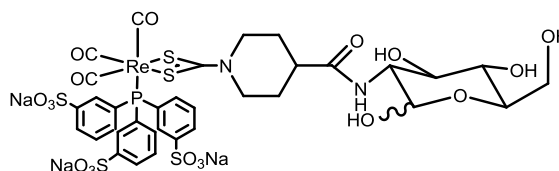
Transmission electron cryomicroscopy (*cryo*-TEM) has the particularity that analyzes samples under cryogenic temperatures (<-150 °C). Consequently, it is especially useful for biological samples or particles in aqueous media because the ultrafrozen process avoids the formation of water crystals (vitrification process) preserving the structure and morphology of the samples in solution. Moreover, it is important to avoid water crystals, because they appear at *cryo*-TEM images as black points hiding our vesicles under study.

Images of the vesicles are recorded at *Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona* using the electronic microscopy JEM-2011 (acceleration voltage: 80-200 kV) with a maximum resolution of 0,18 nm at 200 kV. It is coupled with camera CCD GATAN 895 USC 4000 and it is equipped with a GATAN cryo-holder and the detector EDS Oxford Instruments X-max.

## 7.2. Synthesis and characterization

### 7.2.1. Synthesis of bioconjugated rhenium compounds

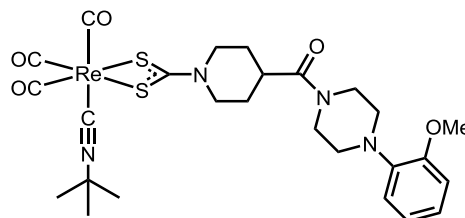
#### 7.2.1.1. Synthesis of Re(DtGlu)TPPTS



A solution of  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  ( 120 mg, 0,18 mmol ) in methanol ( 5 mL ) is added to a suspension of  $\text{Zn}(\text{DtGlu})$  ( 71 mg, 0,10 mmol ) in methanol ( 45 ml ) and the resulting mixture is heated to reflux for 1 hour. Afterwards, the solid TPPTS ( 114 mg, 0,08 mmol ) is added to the reaction mixture and refluxed for 3 additional hours. After

that period, the reaction mixture is cooled down at room temperature helping the formation of a white precipitate which is removed by filtration. The final solution is evaporated to dryness. Finally, the obtained white solid is washed with chloroform (3x15 mL) and the solid is dried under vacuum. Yield: 0,127 gr (55%). IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3407 (O-H); 2019; 1924; 1888 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 1500 (C-N,  $\text{S}_2\text{CN}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 8,70-7,55 (m, 12H, ArH); 6,50 (t, 1H, NH); 6,38 (d, 1H,  $\text{NHCHCH}(\text{OH})\text{O}$ ); 4,89 (d, 2H,  $\text{NHCHC}$  and  $\text{CH}(\text{OH})\text{CHOCH}_2\text{OH}$ ); 4,58-4,37 (2H, glucosamine ring); 4,02 (d, 4H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>eq</sub>); 2,74 (alcohols); 2,68 (t, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>ax</sub>); 1,66 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>eq</sub>); 1,33 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>ax</sub>).  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{MeOD-}d_4$ ,  $\delta$  in ppm): 18,6, also observed 18,5.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{MeOD-}d_4$ ,  $\delta$  in ppm ): 209,6 ( $\text{S}_2\text{CN}$ ); 192,6 (CO); 176,1 (CO, amide); 145,9-127,8 ( $\text{H}_{\text{ar-TPPTS}}$ ); 91,0 ( $\text{NHCHCH}(\text{OH})\text{O}$ ); 76,7 ( $\text{OCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ); 74,5 ( $(\text{NHCHCH}(\text{OH}), \text{NHCHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH}))$ ); 61,3 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 54,3 (NHCH); 41,4 ( $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ ); 27,3 ( $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ ). ESI HRMS (negative mode,  $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{NaO}_{18}\text{PReS}_5$  ( $\text{M} - 2\text{Na}^+$ ), 578,9768, found 578,9673. Retention time RP-HPLC (minutes): 8,8 (protocol 3) and 13,9 (protocol 4).

### 7.2.1.2. Synthesis $\text{Re}(\text{DtPip})\text{ISO}$



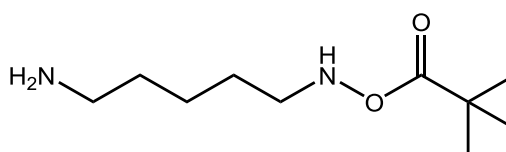
$\text{Zn}(\text{DtPip})_2$  ( 30 mg, 0,04 mmol ) and *tert*-Buthyl isocyanide ( 20  $\mu\text{L}$ , 0,17 mmol ) are added to a solution of  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  ( 50 mg, 0,07 mmol ) in 6 ml of methanol. The reaction mixture is heated to reflux for 2h. At that time, the product is observed as a white solid. Next, the precipitate is removed by filtration, washed with cold ethanol (3 x 15 mL) and dried under high vacuum. Yield: 27 mg (57 %). IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2186 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 2013; 1918; 1898 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 1497 (C-N,  $\text{S}_2\text{CN}$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 7,07-6,89 (m, 4H, ArH); 4,80 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>eq</sub>); 3,91 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,74 (d, 4H,  $\text{CONCH}_2\text{CH}_2$ ); 3,08 (d, 4H,  $\text{CONCH}_2\text{CH}_2$ ); 2,89 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>ax</sub>); 1,88 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>ax</sub>); 1,88 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,55 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ -*d*,  $\delta$  in ppm): 213,7 ( $\text{S}_2\text{CN}$ ); 190,8 (CO); 172,2 (CO, amide); 152,2-111,3 ( $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 55,4 ( $\text{OCH}_3$ ); 51,2

(CONCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 50,5 (CONCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 45,9 (CNC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 45,0 (S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 37,5 (CHCON); 30,7 (CN(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 30,7 (S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS (positive mode, m/z): calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>ReS<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>), 733,1523, found 733,1527. Retention time RP-HPLC (minutes): 8,0 (protocol 1).

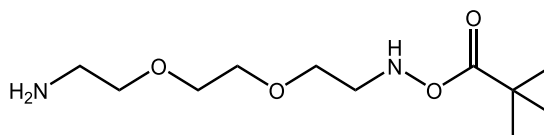
### 7.2.1.3. Synthesis of folic derivatives

#### 7.2.1.3.1. Organic synthesis

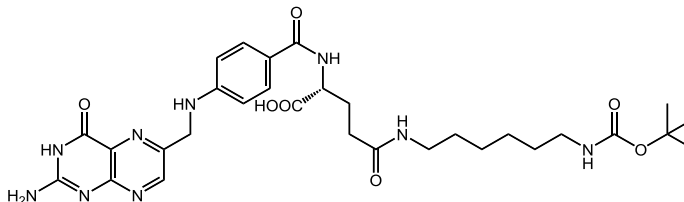
##### Synthesis Boc-HMDA



Hexamethylenediamine ( HMDA ) ( 20,2 g, 0,174 mol ) is dissolved in chloroform ( 500 mL ) and cooled down at 0 °C. Then, a mixture of Di-*tert*-butyl dicarbonate ( 5,05 g, 0,023 mol ) in chloroform ( 250 mL ) is added to the cooled solution dropwise over 3 hours under vigorous stirring and the resulting mixture is left reacting overnight at room temperature. The day after, the half part of chloroform is evaporated, in case of the formation of a precipitate it must be filtered of. Next, the remaining solvent is removed under *vacuum* obtaining an oily residue. The oil is re-dissolved in ethyl acetate (30 mL) and washed with water ( 3 x 50 mL ). The organic phase is dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered of. Finally, EtOAc was removed under *vacuum* to yield a white solid. Yield: 3,30 g (70%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 5,26 (br, 1H, NH); 2,81 (d, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,40 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 1,16-1,05 (m, 17H, 4CH<sub>2</sub> + (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 156,3 (C=O); 78,6 (CC(CH<sub>3</sub>)); 42,1 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 40,2 (CH<sub>2</sub>NHBoc); 33,7 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 30,2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc); 28,6 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; 26,2 (CH<sub>2</sub>); 26,8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc). ESI MS (positive mode, m/z): 217,2 [Boc-HMDA + H<sup>+</sup>].

**Synthesis Boc-HMDA-Eh**

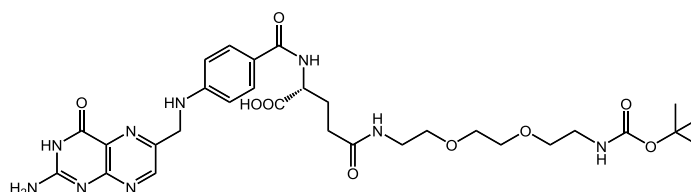
2,2'-(Ethylenedioxy)bis(ethylamine) (HMDA-Eh) ( 30 g, 0,20 mol ) is dissolved in chloroform ( 300 mL ) and cooled down at 0 °C. Then, a mixture of Di-*tert*-butyl dicarbonate (5,0 g, 0,02 mol) in chloroform ( 180 mL) is added to the cooled solution dropwise over 3 hours under vigorous stirring and the resulting mixture is left reacting overnight at room temperature. The day after, the organic solvent is removed until dryness and the resulting oil is redissolved in dichloromethane ( 150 mL ) to perform an extraction with brine ( 3 x 150 mL). Then, after the organic phase is isolated and, after the addition of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the suspension is filtered and the solvent is evaporated under vacuum to yield an oil which can solidify few days after the synthesis in de freeze. Yield: 2,95 g (60%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 5,36 (br, 1H, NH); 3,44 (d, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,31 (q, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 1,26 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Synthesis Boc-FolAq**

A suspension of folic acid ( 35,0 g, 3,06 mmol) in anhydrous DMSO ( 49 mL), anhydrous pyridine ( 18,0 mL, 223 mol ) and DCC is and stirred for 30 minutes at room temperature to yield a yellow suspension. A solution of Boc-HMDA ( 0,795 g, 3,69 mmol ) in anhydrous DMSO (6 mL) is added to the previous suspension and stirred overnight at room temperature. Then, the reaction mixture is filtered and the filtrate is slowly poured into vigorous stirred solution of dry Et<sub>2</sub>O ( 500 mL ). The yellow precipitate is collected by filtration, washed with anhydrous Et<sub>2</sub>O ( 3 x 50 mL ) and dried under *vacuum*. Yield: 1,32 g (67%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 8,65; 7,82; 6,63 (5H, Ar); 8,18; 7,92; 6,93; 6,74 (s, 5H, RNHCOR); 4,50 (d, 2H, ArCH<sub>2</sub>NHAr); 4,32 (m, 2H, NHCHCOOH ); 3,02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,87 (s, 2H, OCNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,25-1,60 (m, 4H, COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,36 (s, 11H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc and C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,21 (s, 6H,

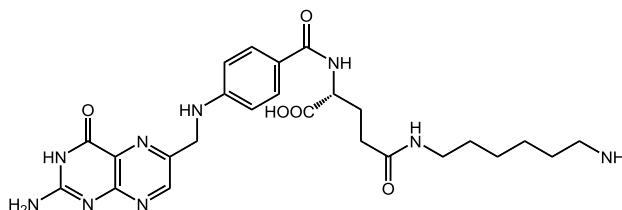
NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 174,5 (COOH); 171,9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH); 166,7 (HNCOCN (pteridine ring)); 161,2 (ArCONH); 155,8 (NHCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 154,1 (NH<sub>2</sub>CNHN (pteridine ring)); 151,1 (HNC (amino-benzoic acid)); 148,4 (NHCCHN (pteridine ring)); 129,4 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 128,3 (NHCOCN (pteridine ring)); 121,8 (HNCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 111,6 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 77,7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 52,7 (NHCCOOH); 46,3 (ArCH<sub>2</sub>NHAr); 32,2-29,3 (CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 28,6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27,7-26,3 (alkyl).

### Synthesis Boc-FolEh

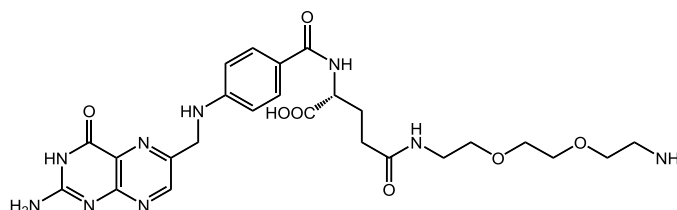


A yellow suspension of folic acid ( 4,08 g, 9,24 mmol ) in anhydrous DMSO ( 140 mL ) with anhydrous pyridine ( 55,0 mL, 0,682 mmol ) and DCC is stirred for 45 minutes at room temperature. A solution of Boc-HMDA-Eh ( 2,98 g, 12,0 mmol ) in anhydrous DMSO ( 120 mL ) is added to the previous suspension and stirred overnight at room temperature. Then, the reaction mixture is filtered and the filtrate is slowly poured into vigorous stirred solution of dry Et<sub>2</sub>O ( 500 mL ). The yellow precipitate is collected by filtration, washed with anhydrous Et<sub>2</sub>O ( 3x 50 mL ) and dried under *vacuum*. Yield: 1,32 g ( 67% ). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 8,64; 7,64; 6,63 ( 5H, ArH ); 7,96; 7,88; 6,93; 6,63 (s, 5H, RNHCOR); 4,50 (d, 2H, ArCH<sub>2</sub>NHAr); 4,36 (m, 2H, NHCHCOOH); 3,18 (s, 8H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 3,05 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 2,26 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,03-1,86 (m, 4H, COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 174,4 (COOH); 172,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH); 166,1 (HNCOCN (pteridine ring)); 161,3 (ArCONH); 156,0 (NHCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 154,1 (NH<sub>2</sub>CNHN (pteridine ring)); 151,4 (HNC (amino-benzoic acid)); 148,8 (NHCCH (pteridine ring)); 129,9 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 128,3 (NHCOCN (pteridine ring)); 121,9 (HNCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 112,1 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 78,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 70,2-69,5 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 53,0 (NHCCOOH); 46,3 (ArCH<sub>2</sub>NHAr); 30,6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).



**Synthesis FolAq**

Boc-FolAq ( 5,2 g, 9,6 mmol ) is dissolved in trifluoroacetic acid (TFA) ( 38 mL, 0,49 mol ) at room temperature. After stirring for 3 h, TFA is removed under high vacuum. The oily residue is dissolved in anhydrous DMF ( 50 mL ) and pyridine ( 170 mL ) is added dropwise (15 mL) giving rise to a yellow precipitate which is collected by filtration and washed with Et<sub>2</sub>O ( 3 x 20 mL ). Yield: 2,8 g ( 63% ). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 8,66; 7,83; 6,65 (5H, Ar); 8,16; 7,98; 6,96; (s, 4H, RNHCOR); 4,51 (d, 2H, ArCH<sub>2</sub>NHAr); 4,33 (m, 2H, NHCHCOOH); 3,04 (s, 2H, OCNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,79 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,27-1,19 (m, 4H, COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,51 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); 1,38-1,27 (6H, alkyl). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 174,5 (COOH); 172,0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH); 166,3 (ArCONH (amino-benzoic acid)); 154,3 (NH<sub>2</sub>CNHN (pteridine ring)); 150,8 (HNC (amino-benzoic acid)); 150,0-149,0 (NHCCHN (pteridine ring)); 129,5 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 128,3 (NHCOCN (pteridine ring)); 121,8 (HNCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 111,6 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 52,6 (NHCCOOH); 45,8 (ArCH<sub>2</sub>NHAr); 31,0-25,3 (alkyl).

**Synthesis FolEh**

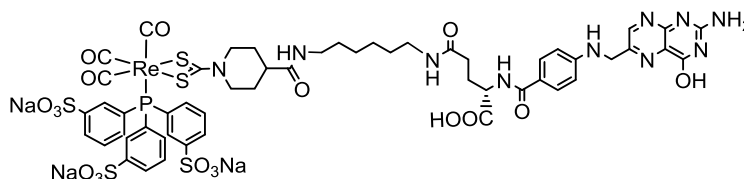
Boc-FolEh ( 4,2 g, 0,78 mmol ) is dissolved in TFA ( 23 mL, 0,30 mmol ) at room temperature. After stirring for 3 h, TFA is removed under high vacuum. After dissolving the oily product in DMF ( 12 mL ) pyridine ( 140 mL ) is added dropwise (15 mL) to get the precipitation of a yellowish product which is collected by filtration and washed with Et<sub>2</sub>O. Yield: 2,7 g ( 76% ). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ in ppm): 8,64; 7,63; 6,65 (5H, Ar); 8,05; 7,92; 6,98; (4H, RNHCOR); 4,48 (d, 2H, ArCH<sub>2</sub>NHAr); 4,33 (m, 2H, NHCHCOOH); 2,97 (s, 2H, OCNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 2,26 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 1,93 (m, 4H, COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).



previous solution and the resulting suspension is stirred overnight. To precipitate de yellow product, 95 mL of THF is added to the solution. Finally, the product is isolated by filtration and washed with a basic water solution ( NaOH; pH 9-10 ) ( 3 x 20 mL ) and acetone ( 2 x 20 ml ). Yield: 2,56 g ( 88 % ). IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3282 (N-H); 1604 (C=O); 1510 (C-H,  $\text{S}_2\text{CN}$ ).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 8,64; 7,63; 6,65 (5h, ArH); 8,02; 7,93; 6,93; (s, 4H, RNHCOR); 4,83 (d, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>eq</sub>); 4,49 (d, 2H, Ar $\text{CH}_2\text{NHAr}$ ); 4,32 (s, 2H, NHCHCOOH); 3,19 (s, 12H, OCNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,30-2,17 (m, 4H, COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,79 (s, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>eq</sub>); 1,56 (s, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ,<sub>ax</sub>).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 203,2 ( $\text{S}_2\text{CN}$ ); 174,0 (RCONH (isonipeccòtic)); 172,4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH); 166,6 (HNCOCN (pteridine ring) and CONH (amino-benzoic acid)); 156,7 (NH<sub>2</sub>CNHN (pteridine ring)); 151,4 (HNC (amino-benzoic acid)); 149,0 (NHCCHN (pteridine ring)); 129,5 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid) and NHCOCN (pteridine ring)); 121,8 (ArCCONH (amino-benzoic acid)); 111,9 (HNCCHCHCCONH (amino-benzoic acid)); 69,9-69,5 (RCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R); 65,6 (CONHCH<sub>2</sub>RCH<sub>2</sub>CONH); 53,8 (NHCCOOH); 51,3 ( $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ); 46,4 (ArCH<sub>2</sub>NHAr); 29,0 (COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH); 19,5 ( $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ); 15,8 (COOHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH). ESI-HRMS (negative mode, m/z): calcd. for  $\text{C}_{64}\text{H}_{82}\text{N}_{20}\text{O}_{16}\text{S}_4\text{Zn}$  ( $\text{M-H}^+$ ), 1579,4293, found 1579,4329. Anal. Elem for  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_2\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : C, 47,5; H, 5,36; N, 17,3. Experimental: C, 47,6; H, 5,54; N, 17,1.

### 7.2.1.3.3. Rhenium complexes with folic derivatives

#### Synthesis $\text{Re}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$



The precursor  $[\text{NEt}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  ( 89 mg, 0,11 mmol ) is dissolved in degassed DMSO ( 2,5 mL ) and added to a solution of  $\text{Zn}(\text{DtFolAq})$  ( 100 mg, 66,1  $\mu\text{mol}$  ) in also degassed DMSO ( 2 mL). The red resulting mixture is heated at 110  $^\circ\text{C}$  for 1 h. Next, TPPTS ( 69 mg, 0,12 mmol ) is added and the resulting suspension is heated for 2 additional hours. After cooling down the reaction solution at room temperature, 75mL of absolute ethanol:methanol ( 3 : 1 ) mixture is added to yield a yellow precipitate



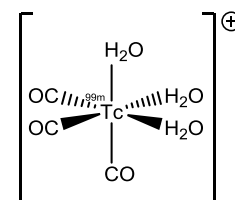
benzoic acid)); 69,3 (RCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R); 51,3 (S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>); 46,4 (ArCH<sub>2</sub>NHAr); 27,9-25,6 (alkyl). Retention time RP-HPLC (minutes): 9,9 (protocol 2) and 15,1 (protocol 4).

#### 7.2.1.3.4. Synthesis of Re(DtFolAq)TPPTS in pseudoradiopharmaceutical conditions

Firstly, it is prepared a 20 ppm solution of the precursor [Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> according to the reported method<sup>[77]</sup> which is added to a suspension of Zn(DtFolAq) (3 mg, 2 μmol) in water (1 mL). The resulting suspension is heated at 100 °C for 1 hour. Then, TPPTS (4 mg, 7 μmol) is added in the reaction flask keeping the temperature at 100 °C for an additional 1 hour. Finally, the solution is cooled down and it is centrifuged, taking the supernatant to be analysed by means of ESI HRMS. ESI-HRMS (negative mode, m/z): : calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>53</sub>N<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>18</sub>PS<sub>5</sub>Re (M-Na<sup>+</sup>), 1541,1239, found 1541,1186 m/z.

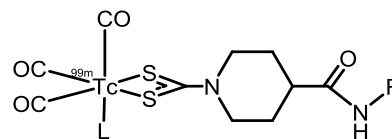
#### 7.2.2. Synthesis of bioconjugated technetium-99m compounds

##### 7.2.2.1. Synthesis of [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>



Na[<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>] is eluted and provided by CADISA from <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc generator using 0,9% saline solution. The precursor [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> is prepared either with the Isolink kit (Covidien)<sup>[27]</sup> or with an alternative method<sup>[78]</sup> (part 3.2.1). Briefly, in a 20 mL vial was added sodium potassium tartrate (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O) (15mg), NaBH<sub>4</sub> (6,5mg) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6mg) and then the vial is carefully sealed and flushed for 15 minutes with CO. Finally, 1ml of Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (MBq) is added and heated at 90°C for 25 minutes. For both methods, after the heating period, the vial is cooled down to room temperature and the pH is adjusted to approximately 7,0 with HCl 0,1M. The radiochemical yield was evaluated with a RP-HPLC. Retention time RHPLC (minutes): 0,9 (protocol 1), 8,9 (protocol 2), 7,4 (protocol 3) and 4,0 (wide peak) (protocol 4).

### 7.2.2.2. Preparation of Tc-99m complexes by transmetallation reaction with Zn derivatives

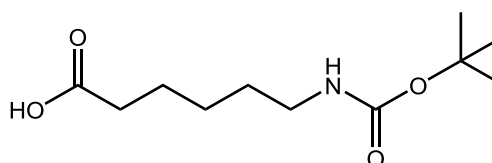


To radiolabel  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M), 100  $\mu\text{L}$  ( $\approx 0,1$  mCi) of technetium-99m precursor is added to a suspension of the corresponding zinc-dithiocarbamate compound (150  $\mu\text{L}$ , 10 mg/ml), previously sonicated for 15 minutes, with 10  $\mu\text{L}$  of the solution of the  $\pi$ -acceptor ligand ( $10^{-3}\text{M}$ ), with the exception of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{DtPip})\text{ISO}]$  radiosynthesis which the *tert*-butylisocyanide solution is in ethanol. The resulting suspension mixture is heated to 40°C - 65°C for 25 minutes. Afterwards, the reaction mixture was cooled down and the remaining zinc complex solid is removed by centrifugation. The radiochemical yield is measured by means of RP-HPLC. Radiochemical yield; for  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtPip})\text{ISO} > 85\%$ . For;  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  and  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS} > 95\%$ . Retention times (minutes):  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtPip})\text{ISO}$  (protocol 1): 8,00.  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$  (protocol 3 and 4): 9,1 and 14,1.  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$  (protocol 2 and 4): 9,6 and 15,7.  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$  (protocol 2 and 4): 9,4 and 15,8.

### 7.2.3. Synthesis of Zn, Re and $^{99m}\text{Tc}$ compounds for liposome radiolabelling

#### 7.2.3.1. Organic synthesis

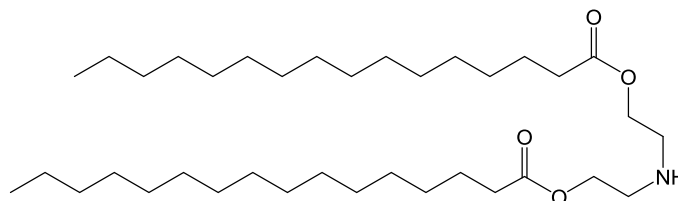
##### Synthesis Boc-Hex



In a bottom flask is prepared a solution of 6-aminohexanoic acid (1,307 g, 9,98 mmol) with triethylamine (2,8 mL, 20 mmol) in a 1:1 mixture of acetone/ $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL). Then the protecting agent  $\text{Boc}_2\text{O}$  (2,364 g, 10,82 mmol) is added and the resulting solution is left under vigorous stirring at room temperature for 4 hours. At this point, acetone is removed under vacuum, and the aqueous solution is acidified with

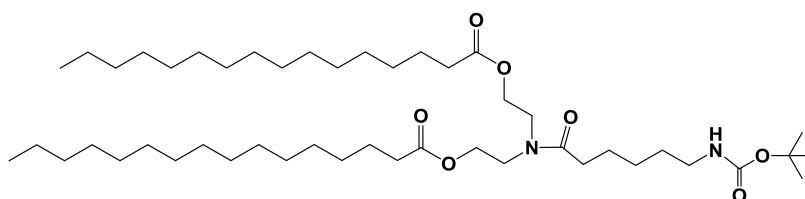
HCl ( 0,5 M ) until pH = 5 giving rise a white suspension. Finally, the product is extracted with AcOEt ( 3 x 25 mL) and the organic phase is washed with brine ( 25 mL), after drying the AcOEt fraction with anhydrous MgSO<sub>4</sub>, it is filtered and the solvent is removed under vacuum yielding to a yellowish oil. Yield: 1,459 g (63%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 4,69 (br, 1H, NH); 3,07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,31 (t, 2H, HOOCCH<sub>2</sub>); 1,62 (m, 2H, HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,48-1,34 (13H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### Synthesis PA



Diethanolamine hydrochloride ( 9,44 g, 66,7 mmol ) is dissolved in DMF ( 132 mL ). To this solution, palmitoyl chloride 98% ( 40 g, 145 mmol ) is added and 10 min later a white precipitate is formed. Next, the solution is stirred for 4 additional hours at room temperature. After this time, the white precipitate is filtered off and it is recrystallized with methanol. After drying the product, it is dissolved with in a aqueous solution of NaOH ( 1 N ) and a extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> is carried out,. Then, the organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent is removed under high vacuum. Finally, the product is recrystallized with pentane. Yield: 23,5 g (61%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 4,17 (t, 4H, COOCH<sub>2</sub>); 2,91 (t, 4H, CH<sub>2</sub>COO); 2,34 (t, 4H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); 1,64 (t, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 1,27 (s, 48H, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>); 0,90 (t, 6H, CH<sub>3</sub>).

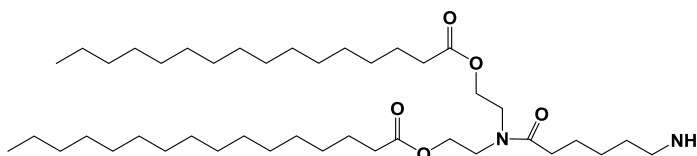
### Synthesis Boc-HP



The product HP ( 3,19 g, 5,48 mmol ) and hydroxybenzotriazole ( HOBT ) ( 0,740 g, 5,48 mmol ) are dissolved in anhydrous CHCl<sub>3</sub> ( 40 mL ) yielding to a colourless solution. To the previous solution is added Boc-Hex ( 1,46 g, 6,31 mmol ) and the resulting solution is cooled down at 0 °C. Next, DCC ( 1,36 g, 6,59 mmol ) in CHCl<sub>3</sub> ( 30 mL) is added dropwise during 1 hour. After this time, the ice-bath is removed and the

solutions is left reacting overnight at room temperature under N<sub>2</sub> atmosphere yielding to a suspension which is filtered to remove the insoluble DCC-Urea. Next, the solvent of the filtrate is removed under vacuum and the oily residue is redissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 50 mL) and extracted with the following solutions: 1 x 50 ml NaOH ( 1 M ), 1 x 50 mL HCl ( 1 M ) and 1 x 50 mL Brine. Finally, the organic phase is dried with MgSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> is removed by filtration, and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> is evaporated with the rotatory evaporator obtaining the yellowish final product. Yield: 2,21 g (66%). IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3326 (NH); 1734 (CONR<sub>2</sub>); 1641 (COO); 1524 (Boc). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 4,58 (br, 1H, NH); 4,22 (d, 4H, COOCH<sub>2</sub>); 3,64 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NCO); 3,15 (d, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc); 2,32 (m, 6H, CH<sub>2</sub>COO and NCOCH<sub>2</sub>); 1,61 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc); 1,47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,28 (m, 50H, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> + (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 0,90 (t, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 174,0-173,8 (COO (anti/syn)); 173,5 (CON); 156,4 (NCOO (Boc)); 79,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 62,4-61,1 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 47,5-45,9 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 40,8 (CH<sub>2</sub>NHBoc); 34,6-33,3 (CH<sub>2</sub>COO and NOCCH<sub>2</sub>); 30,1 ((CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>); 29,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 28,6-26,0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc); 14,5 (CH<sub>3</sub>). ESI-HRMS (modo positive, m/z): calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>90</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> (M+Na<sup>+</sup>), 817,6640, found 817,6618. Anal. Elem for C<sub>47</sub>H<sub>90</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 71,0; H, 11,4; N, 3,52. Experimental: C, 71,2; H, 11,8; N, 3,8.

### Synthesis NH<sub>2</sub>-HP

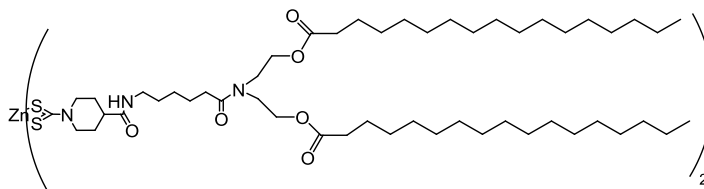


Firstly, the product Boc-HP (2,275 g, 2,86 mmol) is suspended in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (55ml) and cooled down at 0 °C under stirring. The next step is the addition of TFA ( 5,1 mL, 66 mmol) giving rise to a clear solution which is left reacting for 2 hours at room temperature. After this time the TFA is removed under high vacuum to get an yellowish oil which is redissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 40 mL) and extracted with a basic solution of NaOH ( 40 mL, 0,5 M ). Finally, the organic fraction is dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent is removed under vacuum. This process yields to the slightly yellow product. Yield: 1,765 g (89%). IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3309 (NH<sub>2</sub>); 1732 (CONR<sub>2</sub>); 1628 (COO). <sup>1</sup>H-NMR



(CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 4,18 (q, 4H, COOCH<sub>2</sub>); 3,60 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NCO); 2,70 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,29 (m, 6H, CH<sub>2</sub>COO and NCOCH<sub>2</sub>); 1,63 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO and NOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1,45 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 1,26 (m, 50H, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> + (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 0,88 (t, 6H, CH<sub>3</sub>). 13C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 174,0-173,8 (COO (anti/syn) and CON); 62,5-61,8 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 49,3-47,9 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 41,9 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 34,3-33,0 (CH<sub>2</sub>COO and NOCCH<sub>2</sub>); 30,1 ((CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>); 26,6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 26,0-23,1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 14,5 (CH<sub>3</sub>). ESI-HRMS (positive mode, m/z): calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>82</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub> (M+H<sup>+</sup>), 695,1345 found 695,6292. Elemental analysis calculated for C<sub>44</sub>H<sub>83</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (TFA salt): C, 65,3; H, 10,3; N, 3,46. Found: C, 68,9; H, 11,3; N, 4,0.

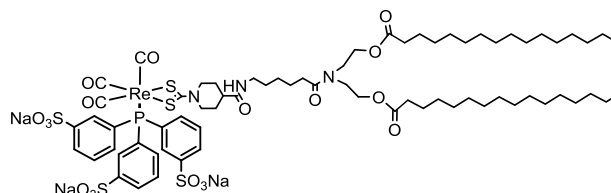
### 7.2.3.2. Synthesis of Zn(DtHP)



In a Schlenk flask is dissolved the precursor Zn(DtSuc) ( 0,489 g, 0,73 mmol ) in DMF ( 7,5ml ). Then, a suspension of a NH<sub>2</sub>-HP ( 0,849 g, 1,22 mmol ) and DIPEA ( 0,90 mL, 5,2 mmol ) in DMF ( 15 mL ), the resulting mixture is left reacting at room temperature under N<sub>2</sub> for 72 hours. After this time, the product is precipitated with a mixture 1:1 ethanol/H<sub>2</sub>O ( 60 mL ) as pinkish solid, it is isolated by centrifugation, washed with the same mixture ( 2 x 15 mL ), next with absolute ethanol ( 1 x 15 mL ) and dried under vacuum. To remove the unreacted Zn(DtSuc) the product is dissolved in the minimum amount of CHCl<sub>3</sub> and filtered. Finally, after the evaporation of chloroform, the product is recrystallized in acetone. Yield: 0,441 g (39%). IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3272 (NH); 1733 (CONR<sub>2</sub>); 1634 (COO); 1489 (CN, S<sub>2</sub>CN). 1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 6,12 (br, 2H, CONH); 4,93 (d, 4H, S<sub>2</sub>CNCH<sub>2eq</sub>); 4,21 (m, 8H, COOCH<sub>2</sub>); 3,61 (d, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NCO); 3,40 (m, 4H, S<sub>2</sub>CNCH<sub>2ax</sub>); 3,33 (m, 4H, CONHCH<sub>2</sub>); 2,39 (t, 8H, CH<sub>2</sub>COO); 2,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CONH); 1,98 (m, 4H, S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2eq</sub>); 1,64 (m, 18H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2ax</sub> and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON); 1,27 (m, 100H, (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> + (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 0,88 (t, 12H, CH<sub>3</sub>). 13C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm): 202,6 (2C, S<sub>2</sub>CN); 174,0-173,9 (COO (anti/syn) and CON); 62,3-61,9 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 51,2 (S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>); 46,2 (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (anti/syn)); 42,0-39,0 (S<sub>2</sub>CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> and OCNCH<sub>2</sub>); 34,6 (CH (isonipecotic

ring)); 32,9-32,4 ( $\text{CH}_2\text{CON}$  and  $\text{OOCCH}_2$ ); 29,6 ( $(\text{CH}_2)_{10}$ ); 27,3-25,2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$  and  $\text{OOCCH}_2\text{CH}_2$ ); 23,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 14,8 ( $\text{CH}_3$ ). ESI-HRMS (positive mode,  $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{102}\text{H}_{189}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_4\text{Zn}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 1883,2566, found 1827,1818. Elemental analysis calculated for  $\text{C}_{98}\text{H}_{180}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_4\text{Zn}$ : C, 64,4; H, 9,92; N, 4,60; S, 7,01. Found: C, 63,3; H 9,83; N, 4,56; S, 6,75.

### 7.2.3.3. Synthesis of $\text{Re}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$

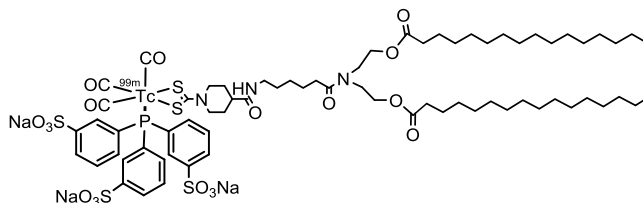


$\text{Zn}(\text{DtHP})$  ( 100,5 mg, 0,0550 mmol ) is dissolved in the minimum volume of anhydrous and degassed DMF ( 0,50 mL ). The precursor  $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  ( 92,5 mg, 0,120 mmol ) is added to the previous solution and mixture is stirred and heated at 80 °C for 1 hour. At this time, TPPTS ( 80,9 mg, 0,142 mmol ) is added and the resulting solutions is left reacting overnight at 80 °C. The day after, the reactions mixture is cooled down and, to provoke the precipitation of the complex,  $\text{Et}_2\text{O}$  ( 20 mL ) is added to the crude mixture and a precipitate is formed, which is isolated by centrifugation, washed with ethanol ( 3 x 5 mL ) and dried under vacuum. Yield: 60 mg (33%). IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2019, 1926, 1886 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  in ppm): 8,15-7,53 (TPPTS); 4,26 (s, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2,eq$ ); 3,64 (d, 4H,  $\text{CONHCH}_2$  and  $\text{OCNCH}_2$ ); 2,64 (m, 2H,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2,ax$ ); 2,44 (m, 4H,  $\text{COOCH}_2$ ); 2,33 (s, 3H,  $\text{CH}$  (isonipecotic ring) and  $\text{CH}_2\text{CON}$ ); 1,63 (m, 10H,  $\text{OCNHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCNHCH}_2\text{CH}_2$  and  $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2,eq$ ); 1,31 (s, 52H,  $(\text{CH}_2)_{12}$ ,  $\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2,eq$  and  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$  ); 0,92 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 17,3 also observed 17,0.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  in ppm): 173,6 ( $\text{COO}$  and  $\text{CON}$ ); 147,7-127,5 (TPPTS); 52,3 ( $\text{S}_2\text{CNCH}_2$ ); 33,8-32,2 ( $\text{CH}_2\text{CON}$  and  $\text{OOCCH}_2$ ); 29,8 ( $(\text{CH}_2)_{10}$ ); 26,6-24,3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$  and  $\text{OOCCH}_2\text{CH}_2$ ); 23,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 14,4 ( $\text{CH}_3$ ). ESI-HRMS (positive mode,  $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{70}\text{H}_{102}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{PReS}_5$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 1742,4642 found 1742,4585. Retention time RP-HPLC (minutes): 16,6 (protocol 4) ( recommended to co-inject with technetium-99m homologue).

#### 7.2.3.4. Attempt of Re(DtHP)TPPTS synthesis in aqueous solution with SPC liposomes

Firstly, a 5 mL of suspension of SPC liposomes (1mM, 400 nm) is prepared. To this solution is added the complex Zn(DtHP) (1 mg, 0,5  $\mu\text{mol}$ ) and a solution of the precursor  $[\text{NEt}_4][\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  (0,5 ml, 1mM, 0,5  $\mu\text{mol}$ ), the resulting suspension is heated at 60 °C during 1 hour. At this time, 5,7 mg of TPPTS (10  $\mu\text{mol}$ ) is added and the reaction mixture is heated for 3 additional hours. At the end of the reaction, 1 ml of final suspension is eluted in a SEPHADEX size exclusion column. The eluted fractions that show more absorbance at  $\lambda=450$  nm are lyophilized and redissolved in chloroform ( $\text{CDCl}_3$  for NMR) to be analysed by means of IR-ATR or  $^{31}\text{P}$ -NMR. The same reaction was performed in absence of liposomes following exactly the same procedure without the chromatography step. IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2023, 1921, 1880 (CO, assigned to the fragment  $\{\text{Re}(\text{CO})_3\text{TPPTS}\}_n^+$ ). *In presence of liposomes*:  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm): -34,4 (oxide of TPPTS) , -22,5 and -14,5 ( $\{\text{Re}(\text{CO})_3\text{TPPTS}\}_n^+$ ). *Without liposomes*:  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm): -22,4 and -14,4 ( $\{\text{Re}(\text{CO})_3\text{TPPTS}\}_n^+$ ), -17,6 (Re(DtHP)TPPTS).

#### 7.2.3.5. Synthesis of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$



Firstly, a solution of SPC ( 1 mM ) liposomes is prepared with the standard method. A solution of  $(^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3)^+$  ( 100  $\mu\text{L}$ , 0,1 mCi ) is added to a suspension of Zn(DtHP) ( 200  $\mu\text{L}$ , 8 mg / mL ) in water previously sonicated for 15 minutes. Next, to this mixture is added a 20  $\mu\text{L}$  of TPPTS ( 2 mg / mL ) and 700  $\mu\text{L}$  of the SPC solution. The whole mixture is heated for 25 minutes at 60 °C under sonication with a tip. Finally, after cooling down the reaction, 0,50 mL of the solutions is eluted with a size exclusion chromatography ( Sephadex G-25 ) column ( PD-10 ), the cloudier fraction is dried under high vacuum, redissolved in  $\text{CHCl}_3$  to be injected for RHPLC analysis. The

product  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtHP})\text{TPPTS}$  elutes at 16,8 min ( recommended to co-inject with rhenium homologue).

### 7.3. *In vitro* studies

To evaluate the biological activity of the potential radiopharmaceuticals, *In Vitro* and *In vivo* studies have been performed at BARTS Cancer Institute (London), with the exception of the stability studies with cysteine which were performed at *Universitat Autònoma de Barcelona*.

#### 7.3.1. Cysteine stability study

Cysteine solution (100  $\mu\text{L}$  of a  $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ )<sup>[83]</sup> in 5 mM PBS (pH 7.4) were added to 150  $\mu\text{L}$  of the studied radiocomplex. Each solution was incubated at 37 °C and analyzed by RP-HPLC at 1, 2, 3 and 4 hours. The stability is calculated as a percentage of the area of the radiocompound peak respect to the area of all the peaks.

#### 7.3.2. Serum stability study

The serum is prepared by centrifugation of 4 ml of mice blood at 3000 rpm for 15 minutes<sup>[85]</sup> to separate serum, which is the supernatant (soluble proteins, hormones, glucose, etc...) from the pellet, mostly composed of cells (leucocytes and erythrocytes). Then, 600  $\mu\text{L}$  of the supernatant is added to a 150  $\mu\text{L}$  of solution and incubated at 37 °C. At each time point (0, 1, 2, 4 and 6 hours) aliquots of 150  $\mu\text{L}$  are taken out off and added to 150  $\mu\text{L}$  of acetonitrile to precipitate the proteins. Each

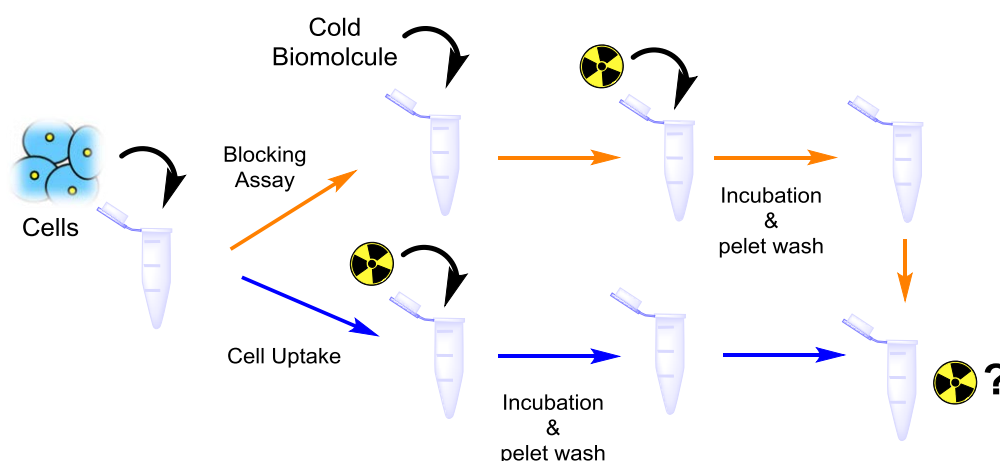
sample is stirred for 5 minutes and centrifuged. Finally, the supernatant is analyzed by RP-HPLC to evaluate the stability of the radiocompound which is calculated as a percentage of the area of the radiocompound respect to the area of all the peaks of the radiochromatogram.

### **7.3.3. Cell culture**

SKOV-3 cells (human ovarian adenocarcinoma) were used to study folate derivatives molecules, while A431 cells (epidermoid carcinoma) were used for  $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ . Both cell lines were cultured as monolayers at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 %  $\text{CO}_2$ . Firstly, SKOV-3 cells were cultured with DMEM medium supplemented with 5 % (v/v) of FBS (fetal bovine serum). Due to the lack of reproducibility of cell experiments, DMEM medium was replaced by a free-folate culture medium FFRPMI (modified RPMI, without folic acid, vitamin B12 and phenol red) supplemented with 10 % (v/v) of FBS as the only source of folic acid. A431 cells were cultured with DMEM medium with 5 % (v/v) of FBS. Cells are harvested in 75  $\text{cm}^2$  flasks, when they achieve 80 % of confluence, the medium is removed and cells are washed with the PBS buffer (10 ml). Then, to remove cells from the flask wall, 2 ml of trypsin-EDTA is added and the flaks are left in the incubator for 3 min, which is enough time to detach them from the plastic. Finally, 4 ml of fresh media is added to deactivate the trypsin, and they are transferred into a new flask with a 1:3 dilution. This operation is repeated approximately 2 or 3 times a week depending on the dilution factor.

### 7.3.4. Cell binding assay

Cell binding assay, apart from providing information related with the cell uptake of a certain radiocomplex, also gives an idea about which process is involved in the accumulation of a potential radiopharmaceutical in cells. The experiment is structured in two parts, cell uptake and blocking assay, as it is shown in the **Figure 83**.



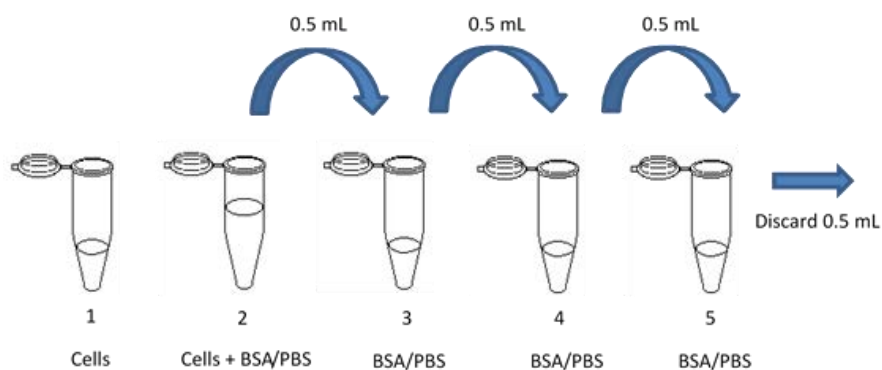
**Figure 83.** Diagram of the two parts of the assay, cell uptake is a simplification, the real assays is using many samples varying cell concentration.

- *Cell uptake by concentration:* preparation of samples with different cell concentrations to obtain a plot of the numbers of cells in front of the uptake.
- *Blocking assay:* before the addition of the radiocompound, the cold biomolecule is added to cells in order to saturate the cell receptors avoiding specific binding of the radiotracer. For instance, in the case of folic derivatives, if the receptors are previously blocked with cold folic acid and, at the end of the study, the final activity is comparable with the unblocked assay, it would mean that the accumulation of the potential radiopharmaceutical is via unspecific process, like absorption in the membrane, rather than specific, like a receptor mediated process. Thus, presumably, the radiocompound will not be delivered selectively in tumour cells.

For all the studies, to reduce the unspecific binding, the protein BSA (bovine serum albumin) is added to PBS solution because the radiocomplex interacts unspecifically with that protein instead of cell membrane.

The cell preparation for the study begins when cells have achieved 80% of confluence, after the addition of trypsin and removing cells from the flaks, 15 mL of fresh media is added for trypsin deactivation. Afterwards, cell suspension is transferred into a *Falcon* tube and spins them at 1000 rpm for 5 min. The next step is to remove the supernatant and cells are resuspended again in 15 ml of PBS with 1% of BSA. After a last centrifugation and resuspension in PBS with 1 % BSA again, they are ready to use for the assay. The cell concentration and viability are calculated using a Neubauer camber and Trypan Blue. Each experiment is done in triplicate.

In two microfuge tubes (**1** and **2**), 0,5 mL of cells ( $4,1 \times 10^6$  cell/mL) in PBS/BSA are added. Then, 0,5 mL of PBS/BSA is added to tube **2**, and from this tube, serial dilution (1:2) is performed to obtain tube **3**, **4** and **5**. Using this process, the following cell concentrations (cell/mL) are prepared:  $1,7 \times 10^5$ ;  $3,4 \times 10^5$ ;  $6,8 \times 10^5$ ;  $1,4 \times 10^6$  and  $2,7 \times 10^6$ .



**Figure 84.** Dilutions for preparation of cell binding assay

Finally, 0,25  $\mu$ L of radiocompound is added to each tube, they are gently stirred until ready for incubation.

Blocking assay preparation is performed adding 0,5 mL of cells ( $4,1 \times 10^6$  cell/mL) to PBS/BSA, then 0,2  $\mu$ L of cold molecule (3 mM). After stirring the tube, 0,25  $\mu$ L of radiocompound is added.

Another tube with 0,25  $\mu$ L of radiocomplex is prepared as a control of the total activity added to other samples. To avoid the saturation of the scintillator crystal of the gamma counter, the activity of the radiocomplex added should not exceed 100.000 counts.

All the tubes are incubated at 37 °C for 90 minutes whilst gently stirring. Next, after centrifugation at 1000 rpm for 2 min the pellet is washed with PBS to remove non-binding activity. The washing process is repeated two additional times. Finally, the remaining activity of the cell pellet is determined with gamma counter. Results are expressed as percentage of activity in the pellet by total activity added.

## 7.4. *In vivo* studies

### 7.4.1. Preparation of Mice Tumour models

*In vivo* experiments were performed with 9 female athymic mice aged 6 weeks old. Athymic mice have a lack of thymus gland which is responsible for T-Cells maturation, consequently, they are immunodepressed making them useful for investigation purposes because the organism does not reject foreign cells or tissues like tumours.

Three mice were used to study the radiocomplex [ $^{99m}\text{Tc}(\text{DtGlu})\text{TPPTS}$ ]. A431 cells ( $5 \times 10^6$  cells in 200  $\mu$ L PBS) were injected subcutaneously into the right flank of each mouse. The other 6 mice were inoculated with SKOV3 Cells ( $5 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L PBS with 100  $\mu$ L of Matrigel) into the right flank to study *In vivo* cell uptake of compounds [ $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolAq})\text{TPPTS}$ ] and [ $^{99m}\text{Tc}(\text{DtFolEh})\text{TPPTS}$ ] using 3 mice for each complex. Mice with A431 cells were fed with standard rodent food, while the animals with SKOV-3 cells were fed a folate-free rodent diet.



#### **7.4.2. Biodistribution studies**

20 days after tumour cell implantation, biodistribution assays for all radiocompounds were performed. Three compounds were radiosynthesized with a high radiochemical yield (<95%) and were administered in the tail vein of each mouse with a total activity 12 MBq in 200  $\mu$ L with PBS.

#### **7.4.3. Cut and count**

Four hours after injection, all 9 mice were put down and organs (stomach, spleen, intestine, heart, liver, tumour, muscle, blood, tail, lung, pancreas and kidney) were carefully removed. After weighing them, total activity is measured with the gamma counter and values are expressed as the percentage of total dose per gram of tissue weight (%ID/g).

### **7.5. Aggregation studies**

#### **7.5.1. Aggregates preparation**

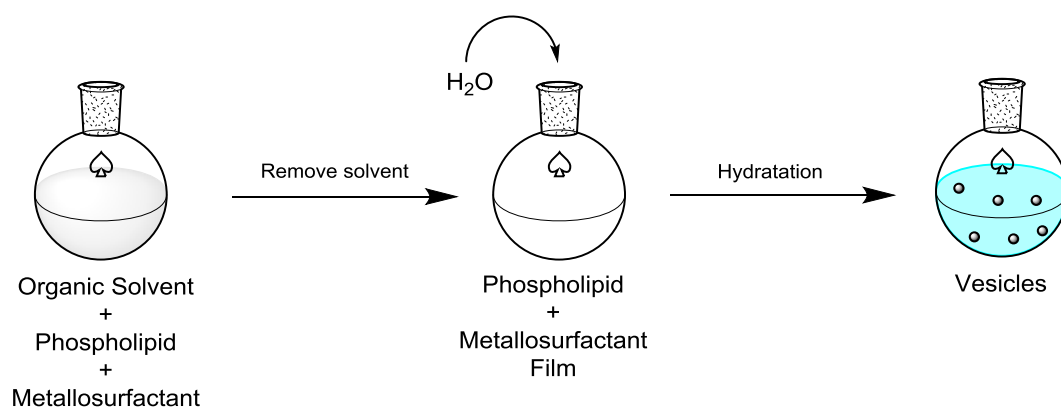
The phospholipid for the aggregation studies is Epikuron 200 (SPC) (molecular formula:  $C_{44}H_{86}NO_8P$ ) with a minimum content of phosphatidylcholine of 95% from Degussa Chemicals M.W.=788,13 g/mol. CAS [8002-43-5]. For the following studies, Milli-Q water was used.

Vesicles and aggregates are prepared with simple hydration of a pure film (SPC or MTs) or mixture (SPC/MTs). For the preparation of pure aggregates, SPC or MTs are dissolved in chloroform/methanol (2:1 v/v) mixture with the proper concentration, the resulting solution is transferred to a round-bottom flask where solvent is evaporated under vacuum to dryness obtaining a thin film in the walls. To make sure all the solvent

has been removed, the film is flushed with N<sub>2</sub>. Next, after the addition of water and stirring the sample for 45 min, the aggregates are formed and ready to use for further studies.

If the study requires the use of two compounds like SPC and MTs, they can be prepared following two different methods: 1) from homogeneous film 2) from preformed liposomes of SPC.

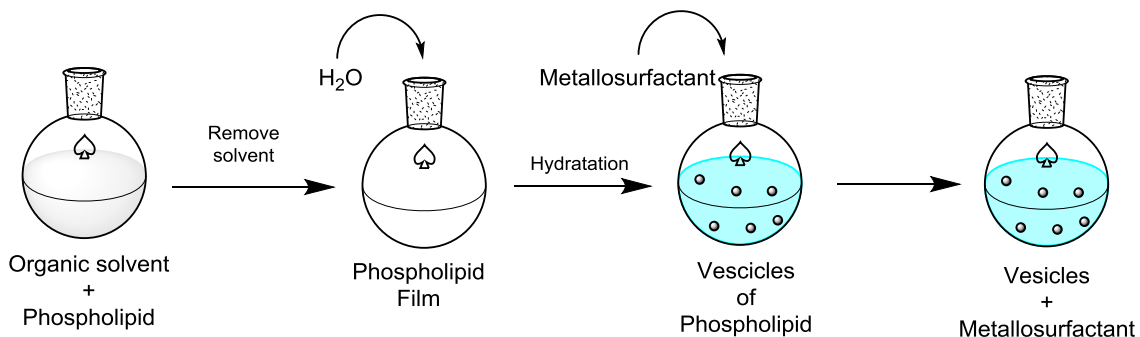
### 7.5.2. Preparation of liposomes from a mixture of homogeneous film



**Figure 85.** Preparation of liposomes from a homogeneous film

Both compounds, SPC and MT, are dissolved in a chloroform/methanol mixture (2:1 v/v) with the proper concentration for the study of each one. After removing the organic solvents, water is added to the flask and the suspension is left stirring for 45 minutes to obtain the vesicles.

### 7.5.3. Preparation of liposomes by incorporation of MT to preformed liposomes of SPC



**Figure 86.** Preparation of liposomes by incorporation of MT to preformed liposomes

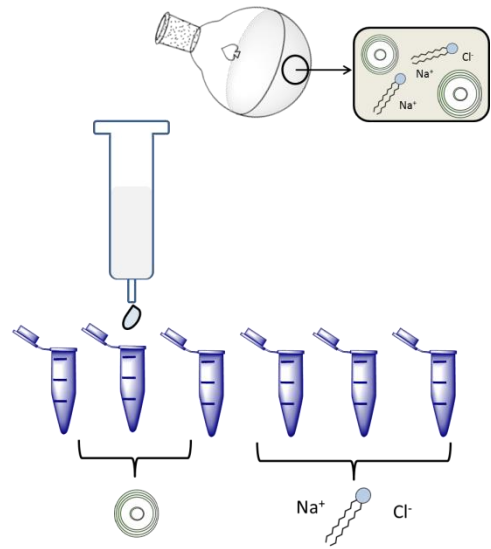
For this method, a film of pure SPC is prepared and, after the proper formation of the SPC vesicles, a water solution with MT is added to the liposomes one. Finally, after stirring the resulting mixture (normally around 1 hour), they can be used for further studies. In some experiments, in order to promote the incorporation of MTs in the bilayer, the samples were sonicated dipping a sonicator tip in the solution.

For all the different methods explained above, the exact volumes are not mentioned because it depends on the stock solution and the final concentration. However, to have an idea, the organic mixtures added in the flask are around 0,5 mL to 2 mL, and the volume of the water additions around 5 mL. It is important to highlight that the water volume should be higher than the organic volume to ensure complete hydration of the film. All of the films that have been prepared can be stored in the freezer at -20 °C for at least 6 months without losing their properties.

#### 7.5.4. Size exclusion chromatography

For the separation of the liposomes from other components of the solutions (salts, free MTs, etc), a common strategy to perform the separations is by means of size exclusion chromatography of Sephadex G-25 in PD-10 columns. Sephadex is composed of dextrin derivatives which allows the elution of the vesicles or aggregates faster than free molecules in solution.

To perform the elution, firstly Sephadex powder is hydrated with Milli-Q water 24 hours before the experiment yielding a gel. Afterwards, the column is loaded with that gel, and, after gently packing the column, 1,0 mL of solution is added for the elution. The eluted fractions are collected in volumes of 1,5 ml, always using Milli-Q water as a mobile phase.



**Figure 87.** Size exclusion chromatography technique

#### 7.5.5. Mechanical extrusion of the liposomes

After their preparation, liposomes can be mechanically extruded with a membrane pore of a certain size (100, 200, 400 or 800 nm) to obtain a homogenous size distribution. The solution is loaded in a syringe, then the membrane is plugged and the solution is passed through that membrane an odd number of times (at least 19).

#### **7.5.6. Liposomes solubilisation**

Liposomes solubilization is the effect that takes place after the addition of a surfactant to a vesicle system. If there is a positive effect, the phospholipid membrane is broken due to the surfactant, the effect is measured by means of DLS or UV-Vis spectroscopy.

## 7. REFERENCES

- [1] World Health Organization. The medical uses of ionizing radiation and isotopes. Technical Report Series 492. Geneva: WHO, **1972**.
- [2] Williams, J. E. *J Nucl. Med.* **1999**, 40, 16-20.
- [3] Carlson, S. *Acta Oncologica.* **1995**, 34, No. 8, 1095-1102.
- [4] Anger, H. O. *Review of Scientific Instruments.* **1958**, 29, 27-33.
- [5] Van Dort, M.E.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2008**, 4, 46-53.
- [6;5BIS] Hamoudehm M.; Kamleh, M. A.; Diab, R.; Fessi, H. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2008**, 60, 1329–1346.
- [7] Liu, S.; Chakraborty, S. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 6077-6086.
- [8] Anotch, G.; Bockisch, A. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2009**, 36, 113-120.
- [9] Zeglis, B. M.; Jacob L. Houghton, J. L.; Michael J. Evans, M. J.; et al. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 1880-1889.
- [10] MEDraysintell 2014 report – *Opportunities in nuclear medicine*.
- [11] Gudkov, S.V.; Shilyagina, N. Y.; Vodeneev, V. A.; ZvyaginInt, A.V. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17(33).
- [12] Drude, N.; Tienken, L.; Mottaghy, F. M. *Methods.* **2017**, 130, 14-22.
- [131] Zhiliang Cheng, Z.; Al Zaki, A.; Hui, J. Z.; Muzykantov, V. R.; Tsourkas, A. *Science.* **2012**, 338, 903-910.
- [14] Alberto, R; Braband, H. *SPECT/PET Imaging with Technetium, Gallium, Copper, and Other Metallic Radionuclides*. Comprehensive inorganic chemistry II: from elements to applications. (Eds) Elsevier; Amsterdam. **2013**, 785-817.
- [15] Schibli, R.; Schubiger, P. A. *European Journal of Nuclear Medicine.* **2002**, 29(11), 1529-1542.
- [16] Ikawa, M.; Kawai, Y.; Arakawa, K.; Tsuchida, T.; et al. *Mitochondrion.* **2007**, 7, 164–170.
- [17] Blekker-Rovers, C. P.; VOS, F. J.; Van Der Graff, W. T. A.; OYEN, W. J. G. *The Oncologist.* **2011**, 16, 980–991.
- [18] Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Meléndez-Alafort, L. *Current Pharmaceutical Analysis.* **2006**, 2, 339-352.
- [19] Braband, H. J. *Label Compd. Radiopharm.* **2014**, 57, 270–274.
- [20] Bhattacharyya, S.; Dixit, M. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 6112–6128.
- [21] Hruska, C. B.; Weinmann, A. L.; O'Connor, M. K. *Med. Phys.* **2012**, 39(6), 3466-3475.
- [22] Mundwiler, S.; Kündig, M.; Ortner, K.; Alberto, R. *Dalton Trans.* **2004**, 1320–1328
- [23] Coogan, M. P.; Doyle, R. P.; Valliant, J. F.; Babich, J. W. Zubieta, J. J. *Label Compd. Radiopharm.* **2014**, 57, 255–261.
- [24] Dilworth, J. R.; Parrott, S. J. *Chemical Society Reviews.* **1998**, 27, 43-55.
- [25] Patton, D.D.; Garcia, E. N.; Webber, M. *American Journal of Roentgenology.* **1966**, 97(4), 880-885.
- [26] Jürgens, S.; Herrmann, W. A.; Kühn, F. E. *Journal of Organometallic Chemistry.* **2014**, 751, 83-89.

- [27] Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J. P.; Plückthun, A.; Schubiger, P. A. *Nature Biotechnology*. **1999**, *17*, 897-901.
- [28] Correia, J. D. G.; Paulo, A.; Raposinho, P. D.; Santos, I. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6144–6167.
- [29] TAGAMI, K.; UCHIDA, S. *Appl. Radiat. Isot.* **1996**, *47*(9/10), 1057-1060.
- [30] Yoshihara, K.; Omori, T. *Topics in Current Chemistry*, 176, Technetium and Rhenium, (Eds) Springer Verlag, **1996**, 275.
- [31] Grummon, G.; Rajagopalan, R.; Palenik, G. J.; Koziol, A. E.; Nosco, D.L. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1764-1772.
- [32] Lecina, J.; Carrer, A.; Álvarez-Larena, A, Mazzi, U.; Melendez-Alafort, L.; Suades, J. *Organometallics*. **2012**, *31*, 5884–5893.
- [33] Ferreira, C. L.; Ewart, C. B.; Bayly, S. R.; Patrick, B. O; Steele, J.; Adam, M. J.; Orvig, C. *Inorganic Chemistry*. **2006**, *45*(17), 6979-6987.
- [34] Résimont, M.; Liégeois, J. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5199–5202.
- [35] Banhham, A. D.; Standish, M. M.; WATKINS, J. C. J. *Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- [36] Bushmakina, I. M.; Martynova, M. A.; Knyazeva, E. V. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **2015**, *49*(3), 111-119.
- [37] Barenholz, Y. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2001, *6*, 66-77.
- [38] Nii, T.; Ishii, F. *International Journal of Pharmaceutics*. **2005**, *298*, 198–205.
- [39] Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Grenader, T. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, *45*, 388–398.
- [40] Maeda, H.; Sawa, T.; Konno, T. *Journal of Controlled Release*. **2001**, *74*, 47–61.
- [41] Torchilin, V. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, *63*, 131–135.
- [42] Šegota, S.; Težak, D. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2006**, *121*, 51–75.
- [43] Gradzielski, M. J. *Phys.: Condens. Matter*. **2003**, *15*, 655–697.
- [44] Simão, A. M. S.; Bolean, M.; Campos, T. A.; Guerino, R.; Itri, R.; Ciancaglini, P. *Biophys Rev* **2015**, *7*, 391–397.
- [45] Phillips, W. T. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1999**, *37*, 13–32.
- [46] Laverman, P.; Boerman, O. C.; Storm, G. *Methods in Enzymology*, **2003**, *373*, 234-248.
- [47] Petersen, A. L.; Hansen, A. E.; Gabizon, A.; Andresen, T. L. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 1417–1435.
- [48] Kaur, R.; Mehta, S.K. *Coordination Chemistry Reviews*. **2014**, *262*, 37– 54.
- [49] Chen, Y.; Zhu, Q.; Cui, X.; Tang, W.; Yang, H.; Yuan, Y.; Hu, A. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12477– 12482.
- [50] Elbayoumi, T. A.; Torchilin, V. P. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. **2006**, *33*(10), 1196-1205.
- [51] Torchilin, V. P. *The AAPS Journal*. **2007**, *9*(2), 128-147.
- [52] Yao, V. J.; D'Angelo, S.; Butler, K. S.; Theron, C.; Smith, T, L.; Marchiò, S.; Gelovani, J. G.; Sidman, R. L.; Dobroff, A. S.; Brinker, C. J.; Bradbury, A. R.M.; Arapa, W.; Pasqualini, R. *Journal of Controlled Release*. **2016**, *240*, 267–286.
- [53] Schibli, R.; Dumas, c.; Petrig, J.; Spadola, L.; Scapozza, L.; Garcia-Garayoa, E.; Schubiger, P. A. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 105-112.
- [54] Chena, Y.; Huang, Z. W.; Heb, L.; Zhengb, S. L.; Lib, J.L.; Qinc, D. L. *Applied Radiation and Isotopes*. **2006**, *64*, 342–347.
- [55] Guo, H.M; Xie, F.; Zhu, M.; Li, Y.; Yang, Z.; Wang, X.; Lu, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2011**, *21*, 2025–2029.

- [56] Purohit, A.; Liu, S.; Casebier, D.; Edwards, D. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 720-727.
- [57] Xie, F.; Zhang, C.; Yu, Q.; Pang, Y.; Chen, Y.; Yang, W.; Xue, J.; Liuc, Y.; Lu, J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 32197–32206.
- [58] Bernard, J.; Ortner, K.; Spingler, B.; Pietzsch, H. J.; Alberto, R. *Inorganic Chemistry.* **2003**, *42*(4), 1014-1022.
- [59] Hassanzadeh, L.; Erfani, M.; Esmail, S.; Ebrahimi, S. J. *Label Compd. Radiopharm.* **2012**, *55*, 371–376.
- [60] Gorshkov, N.I.; Schibli, R.; Schubiger, A.P.; Lumpov, A. A.; Miroslavov, A.E.; Suglobov, D.N. *Journal of Organometallic Chemistry.* **2004**, *689*, 4757–4763.
- [61] Stover, P. J. *Nutrition Reviews.* **2004**, *62*(6), 3-12.
- [62] Cianciolo, G.; De Pascalis, A.; Di Lullo, L.; Ronco, C.; Zannini, C.; La Manna, G. *Cardiorenal Med.* **2017**, *7*, 255–266.
- [63] Guaragna, A.; Chiaviello, A.; Paoletta, C.; D’Alonzo, D.; Palumbo, G.; Palumbo, G. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 84–96.
- [64] Mohapatra, S.; Mallick, S. K.; Maiti, T. K.; Ghosh, S. K.; Pramanik, P. *Nanotechnology.* **2007**, *18*, 1-9.
- [65] Tram, B.; Le, T. *The Pharmaceutical and Chemical Journal.* **2017**, *4*(4), 109-114.
- [66] Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X. E.; Yi, W.; Brunzelle, J.S.; Li, J. Yong, E. L.; Xu, H. E.; Melcher, K. *NATURE.* **2013**, *500*, 486, 490.
- [67] Müller, C.; Schibli, R. *The Journal of Nuclear Medicine.* **2011**, *52*(1), 1-4.
- [68] Wang, S.; Lee, R. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Low, P. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 56-62.
- [69] Okarvi, S. M.; Jammaz, I. A. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.* **2006**, *21*(1), 49-60.
- [70] Mindt, T.; Struthers, H.; Garcia-Garayo, E.; Desbouis, D.; Schibli, R. *Chimia.* **2007**, *61*(11), 725-731.
- [71] Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2004**, *56*, 1127–1141.
- [72] Baier, G.; Baumann, D.; Siebert, J. M.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K. *Biomacromolecules.* **2012**, *13*, 2704–2715.
- [73] Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemain, F.; Müller, J.F.; Barberi-Heyob, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2005**, *13*, 2799–2808.
- [74] Bonechi, C.; Donati, A.; Lampariello, R.; Martini, S.; Picchi, M. P.; Ricci, M.; Rossi, C. *Spectrochimica Acta Part A.* **2004**, *60*, 1411–1419.
- [75] Lua, J.; Panga, Y.; Xie, F.; Guo, H.; Lia, Y.; Yang, Z.; Wang, X. *Nuclear Medicine and Biology.* **2011**, *38*, 557–565.
- [76] Guo, Z.; You, L.; Shi, C.; Song, M.; Gao, M.; Xu, D.; Peng, C.; Zhuang, R.; Liu, T.; Su, X.; Du, J.; Zhang, X. *Mol. Pharmaceutics.* **2017**, *14*, 3780–3788.
- [77] He, H.; Lipowska, M.; Xu, X.; Taylor, A. T.; Carlone, M.; Marzilli, L. G. *Inorganic Chemistry.* **2005**, *44*(15), 5437-5446.
- [78] Alia, M.; Vanniasingha, A.; Kumarb, V.; Barnettb, R.; Albertoc, R.; Manoliosa, M. *Nuclear Medicine and Biology.* **2011**, *38*, 751–756.
- [79] Satpati, D.; Mallia, M.; Kothari, K.; Pillai, M.R.A. *J Label Compd Radiopharm.* **2004**, *47*, 657–668.
- [80] Djokić, D.; Janković, D.; Stamenković, L.; Pirmettis, L. *Nuclear Medicine Review.* **2004**, *7*(1), 1–5.

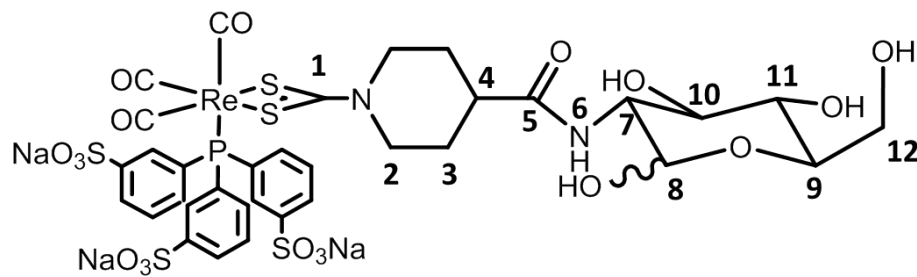


- [81] Czaplewska, J.A.; Theil, F.; Altuntas, E.; Niksch, T.; Freesmeyer, M.; Happ, B.; Pretzel, D.; Schäfer, H.; Obata, M.; Yano, S.; Schubert, U. S.; Gottschaldt, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 6290–6297.
- [82] Yazdani, A.; Janzen, N.; Banevicius, L.; Czorny, S.; Valliant, J. F. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 1728–1736.
- [83] Hayes, T. R.; Powell, A. S.; Barnes, J. L.; Benny, P. *Journal of Coordination Chemistry.* **2015**, 68(19), 3432–3448.
- [84] Ferreira, C. L.; Marques, F. L.; Okamoto, M.; Otake, H.; Sugai, Y.; Mikata, Y.; Storr, T.; Bowen, M.; Yano, S.; Adam, M. J.; Chammas, R.; Orvig, C. *Applied Radiation and Isotopes.* **2010**, 68,1087–1093.
- [85] North, A. J.; Hayne, D.J.; Schieber, C. S.; Price, K. M.; White, A. R.; Crouch, P.J.; Rigopoulos, A.; O’Keefe, G. J.; Tochon-Danguy, H.; Scott, A. M.; White, J. M.; Ackermann, U. M.; Donnelly, P. S. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 9594–9610.
- [86] Rossin, R.; Pan, P.; Qi, K.; Turner, J. L.; Sun, X.; Wooley, K. L.; Welch, M. J. *The Journal of Nuclear Medicine.* **2005**, 46(8), 1210–1218.
- [87] Bowen, M.L.; Chen, Z. F.; Roos, A. M.; Misri, R.; Häfeli, U.; Adam, M. J.; Orvig, C. *Dalton Trans.* **2009**, 9228–9236.
- [88] Tolmachev, V.; Rosik, D.; Wällberg, H.; Sjöberg, A.; Sandström, M.; Hansson, M.; Wennborg, A.; Orlova, A. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2010**, 37, 613–622.
- [89] Huang, L.; Tchouate, L. O.; Caveliers, V.; Vanhove, C.; Keyaerts, M.; De Baetselier, P.; Bossuyt, A.; Revets, H.; Lahoutte, T. *Mol Imaging Biol.* **2008**, 10, 167–175.
- [90] Zhou, W.; Han, W. F.; Landree, L. E.; Thupari, J. N.; Pinn, M. L.; Bililign, T.; Kim, E. K.; Vadlamudi, A.; Medghalchi, S. M.; El Meskini, R.; Ronnett, G. V.; Townsend, G. A.; Kuhajda, F. P. *Cancer Res.* **2007**, 67(7), 2964–2971.
- [91] Zhanga, L.; Houb, S.; Maob, S.; Weic, D.; Song, X.; Lu, Y. *International Journal of Pharmaceutics.* **2004**, 287, 155–162.
- [92] Mindt, T. L.; Müller, C.; Melis, M.; De Jong, M.; Schibli, R. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1689–1695.
- [93] Chu, K. S.; Hasan, W.; Rawal, S.; Walsh, M. D.; Enlow, Em M.; Luft, J. C.; Bridges, A.S.; Kuijter, J. L.; Napier, M. E.; Zamboni W. C.; De Simone, J. M. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* **2013**, 9, 686–693.
- [94] Dijkers, E. C. F.; Kosterink, J. S.; Rademaker, A. P.; Perk, L. R.; van Dongen, G. A.; Bart, J.; de Jong, J. R.; de Vries, E. G.; Lub-de Hooge, M. N. *The Journal of Nuclear Meicine.* **2009**, 50(6), 974–981.
- [95] Shi, J.; Wang, L.; Kim, Y. S.; Zhai, S.; Liu, Z.; Chen, X.; Liu, S. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7980–7990.
- [96] Makris, G.; Papagiannopoulou, D. J. *Label Compd. Radiopharm.* **2016**, 59, 95–102.
- [97] Müller, C.; Schibli, R.; Krenning, E.P.; de Jong, M. *The Journal of Nuclear Medicine.* **2008**, 49(4), 6239–629.
- [98] Müller, C.; Reber, J.; Schlup, C.; Leamon, C. P.; Schibli, R. *Mol. Pharmaceutics.* **2013**, 10, 967–974.
- [99] Müller, C.; Hohn, A.; Schubiger, P. A.; Schibli, R. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* **2006**, 33(9), 1007–1016.
- [100] Liu, S.; Edwards, D. S. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2235–2268.

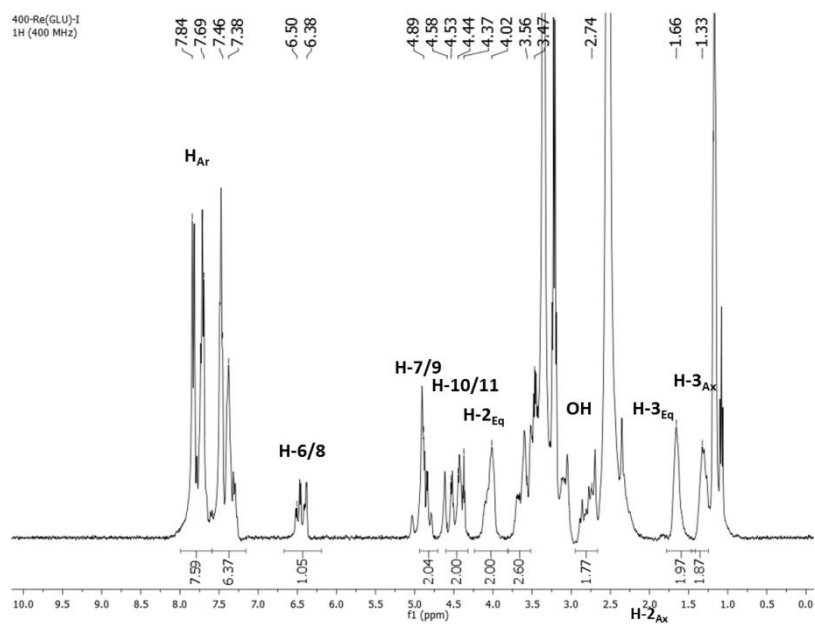
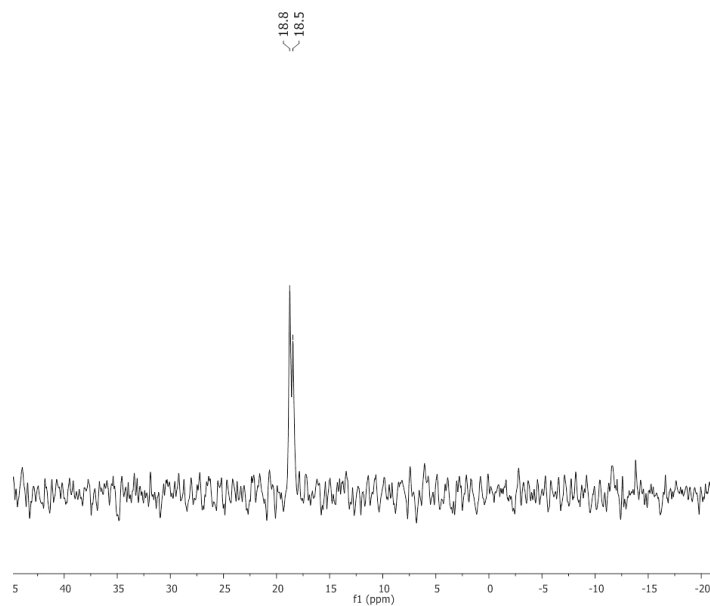
- [101] Griffiths, P.C.; Fallis, I.A.; Chuenpratoom, T.; Watanesk, R. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2006**, 122, 107–117.
- [102] Tundo, P.; Kippenberger, D. J.; Politi, M. J.; Klahn, P.; Fendler, J. H. *J. Am. Chem.* **1982**, 104, 5352-5358.
- [103] Biraboneye, A. C.; Madonna, S.; Laras, Y.; Krantic, S.; Maher, P.; Kraus, J. L. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4358–4369.
- [104] Huang, B.; Du, D.; Zhang, R.; Wu, X.; Xing, Z.; He, Y.; Huang, W. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2012**, 22, 7330–7334.
- [105] Alexopoulos, K.; Fatseas, P.; Melissari, E.; Vlahakos, D.; Roumelioti, P.; Mavromoustakos, T.; Mihailescu, S.; Paredes-Carbajal, M. C.; Mascher, D.; Matsoukas, J. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3338-3352.
- [106] Fritz, H.; Hug, P.; Sauter, H.; Winkler, T.; Logemann, E. *Organic Magnetic Resonance*. **1997**, 9(2), 108-112.
- [107] Pattni, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 10938–10966.
- [108] Almgren, M.; Edwards, K.; Karlsson, G. *Colloids Surf.* **2000**, 174, 3–21.
- [109] Parera, E.; Marín-García, M.; Pons, R.; Comelles, F.; Suades, J.; Barnadas-Rodriguez, R. *Organometallics*. **2016**, 35(4), 484-493.
- [110] Barnadas, R.; Sabés, M. *Liposomes, Part A; Methods in Enzymology*; (Eds) Elsevier: Dordrecht, **2003**; 367, 28-46.

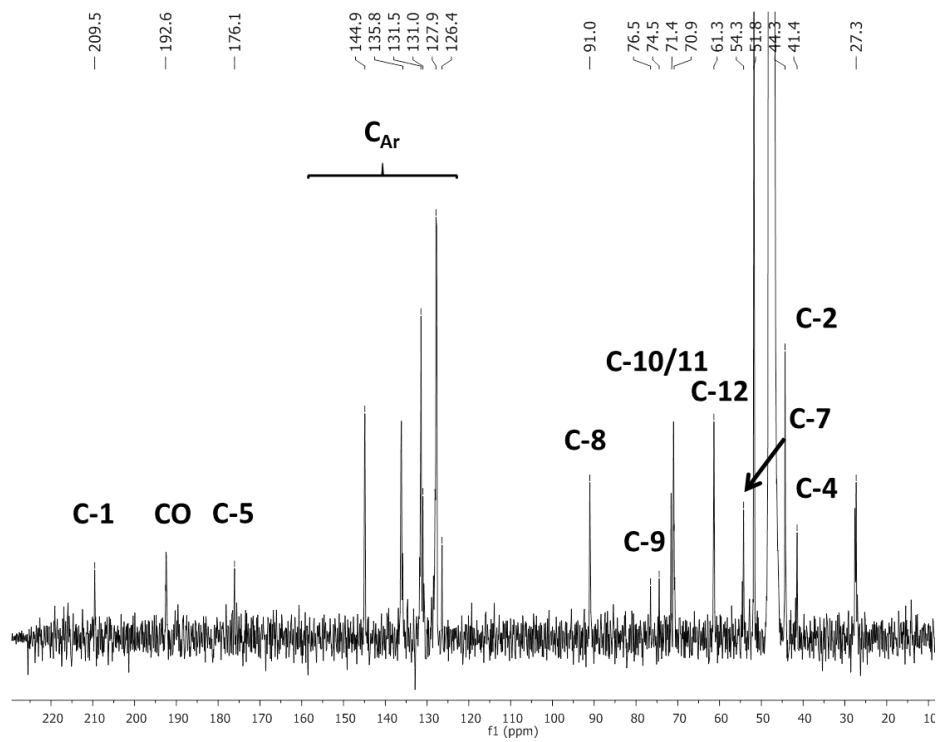


## 9. SUPPORT INFORMATION

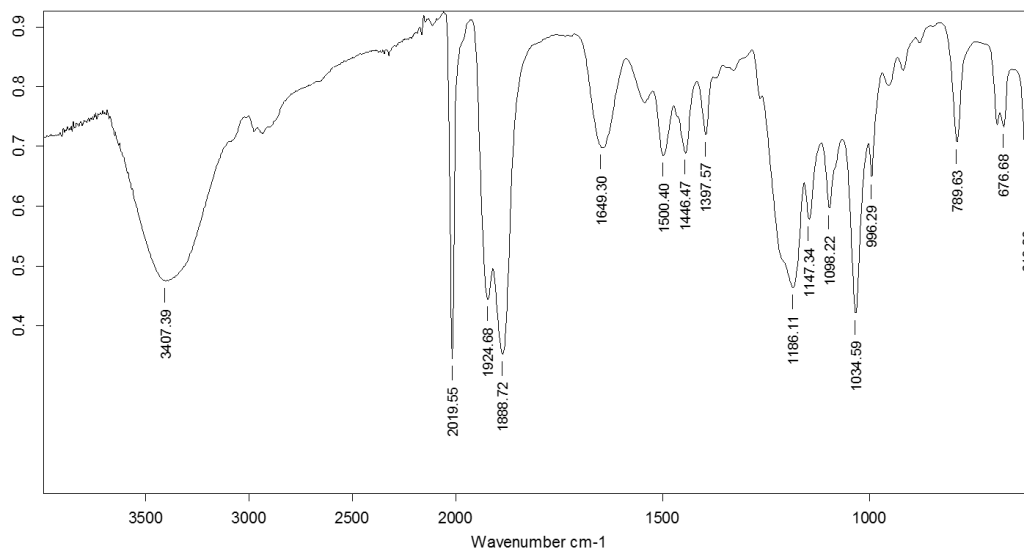


Re(DtGlu)TPPTS

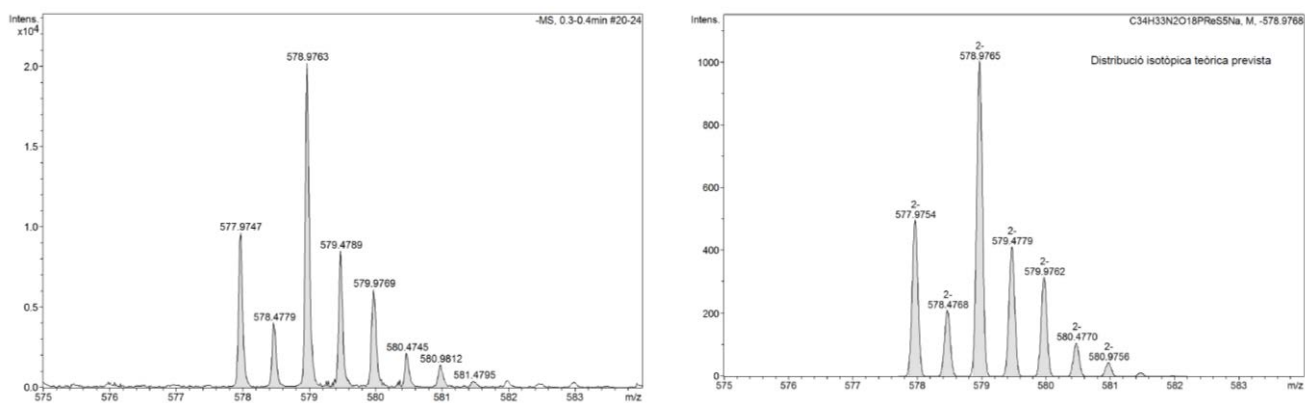
<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-400 MHz)<sup>31</sup>P-RMN (*d*<sub>4</sub>-MeOD-400 MHz)



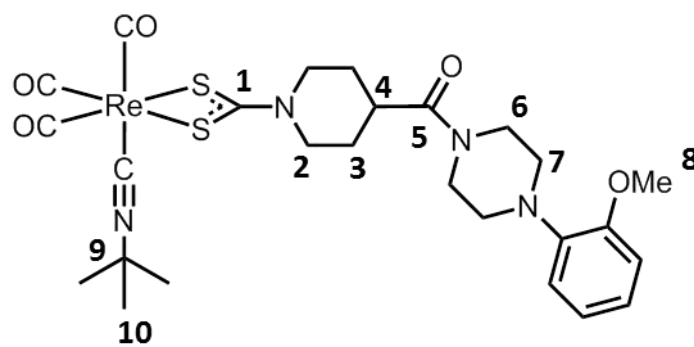
<sup>13</sup>C-RMN (*d*<sub>4</sub>-MeOD-400 MHz)



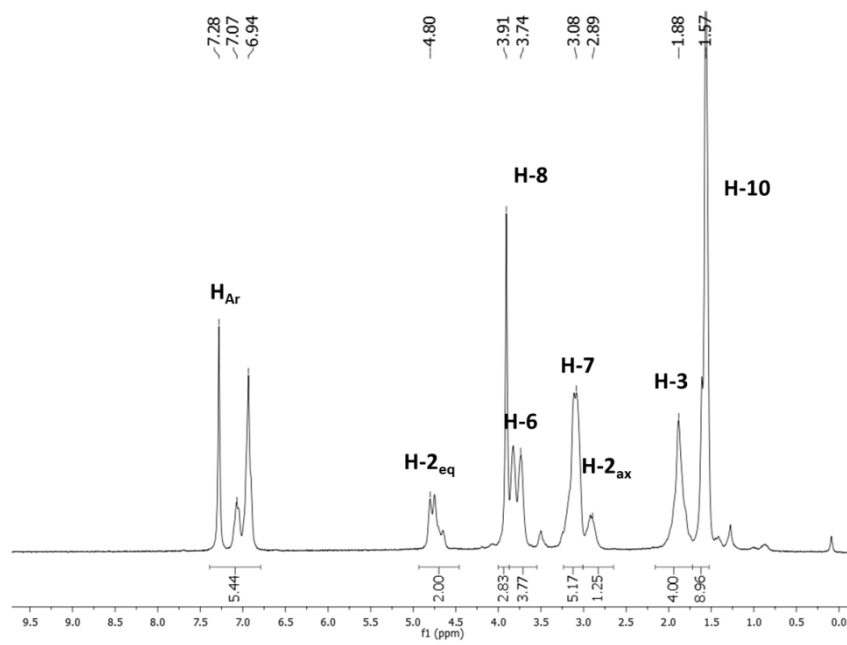
IR-ATR

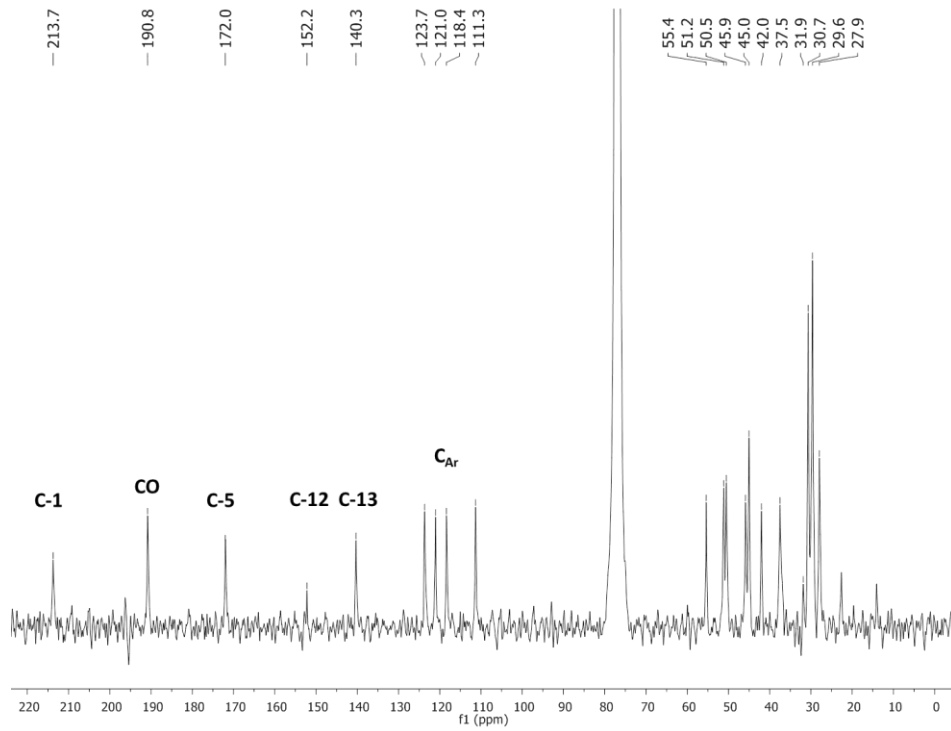


## ESI-HRMS (negative mode)

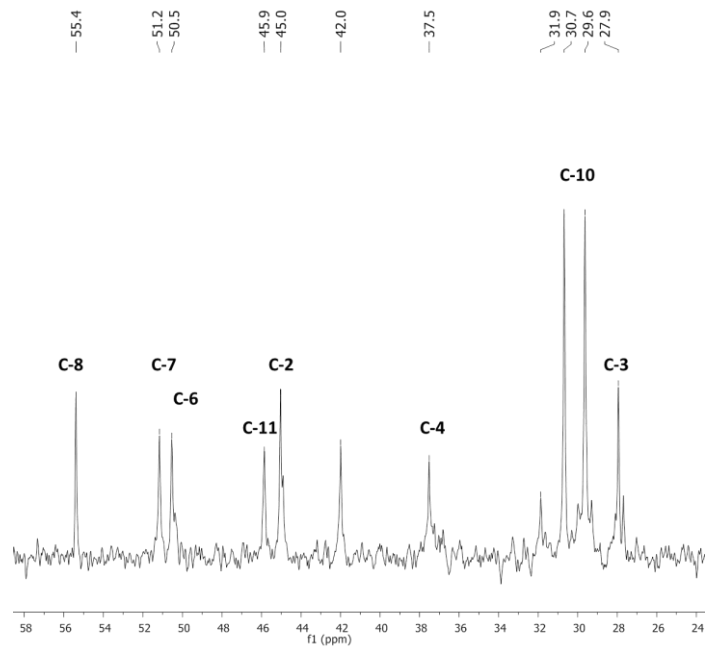


Re(DtPip)ISO

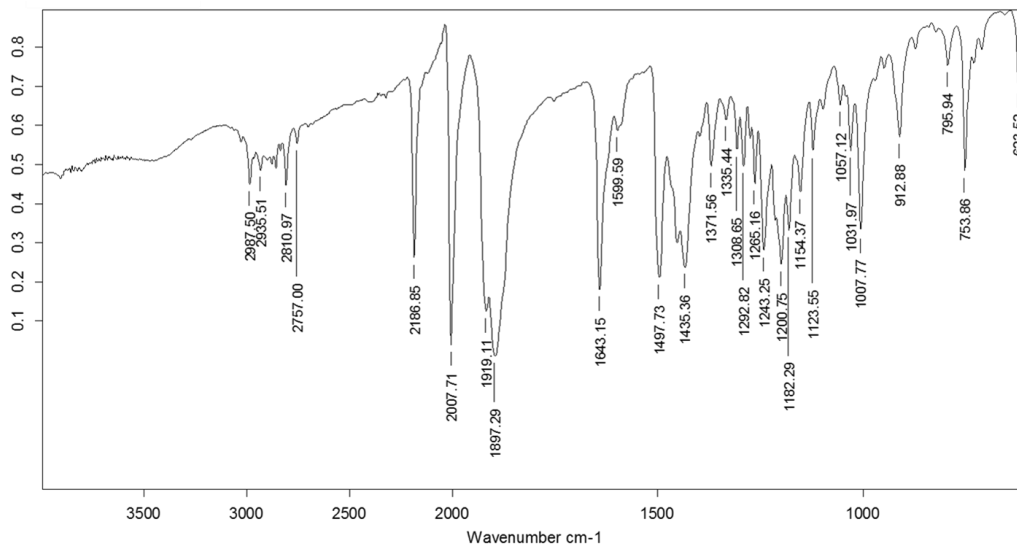
<sup>1</sup>H-RMN (*d*-CDCl<sub>3</sub>-400 MHz)



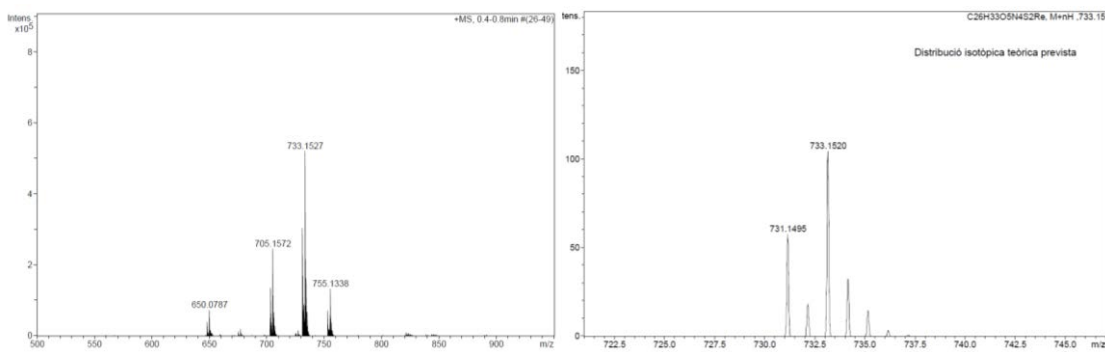
<sup>13</sup>C-RMN (*d*-CDCl<sub>3</sub>-400 MHz)



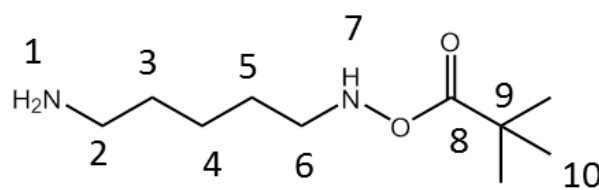
<sup>13</sup>C-RMN (*d*-CDCl<sub>3</sub>-400 MHz)



IR-ATR

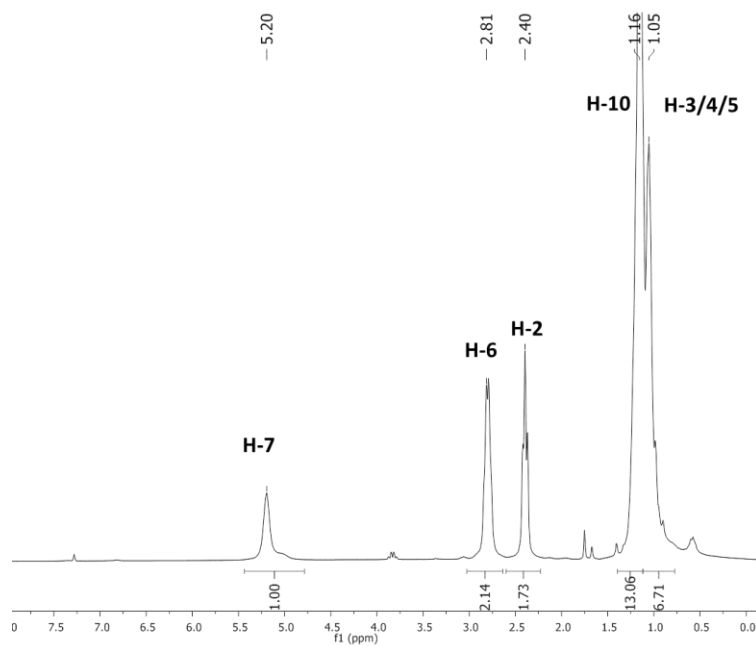


ESI-HRMS (positive mode)

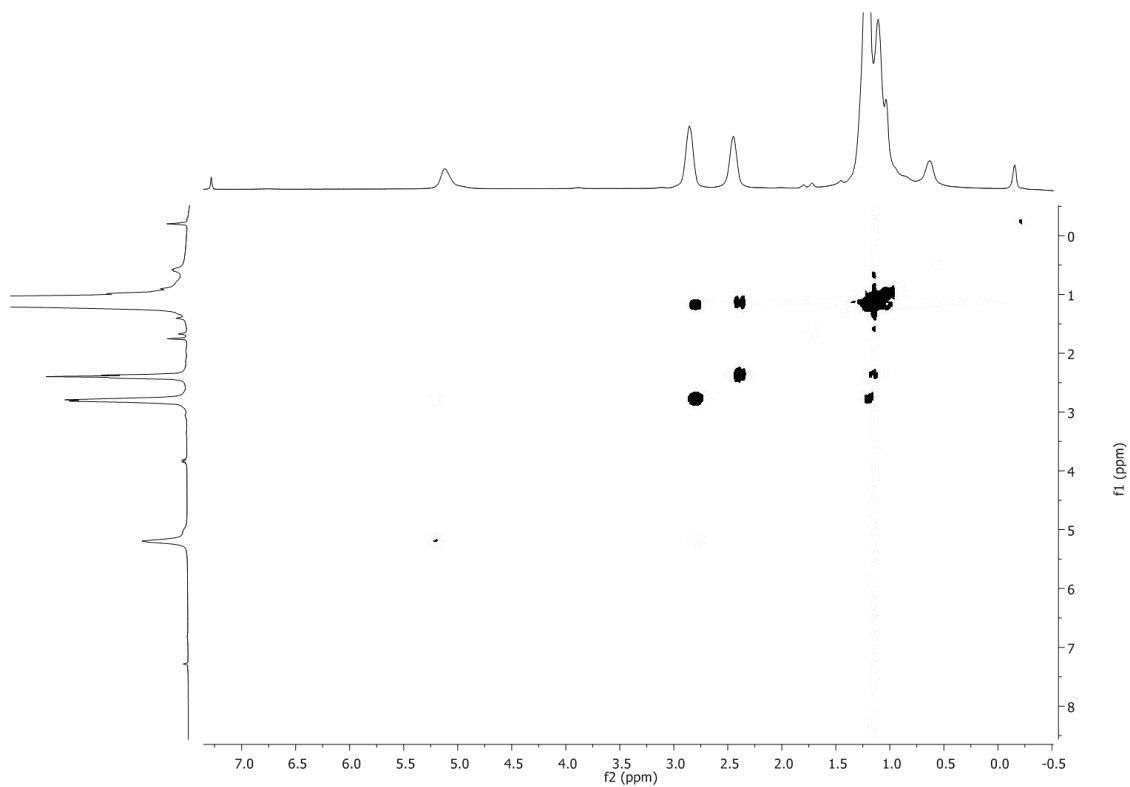


Boc-HMDA

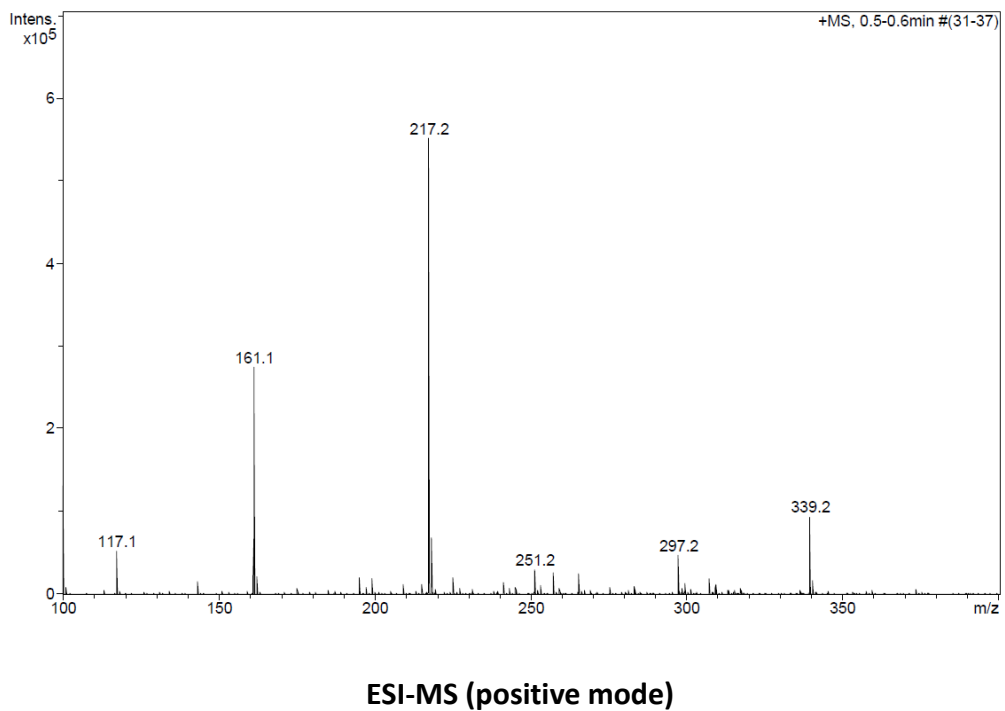
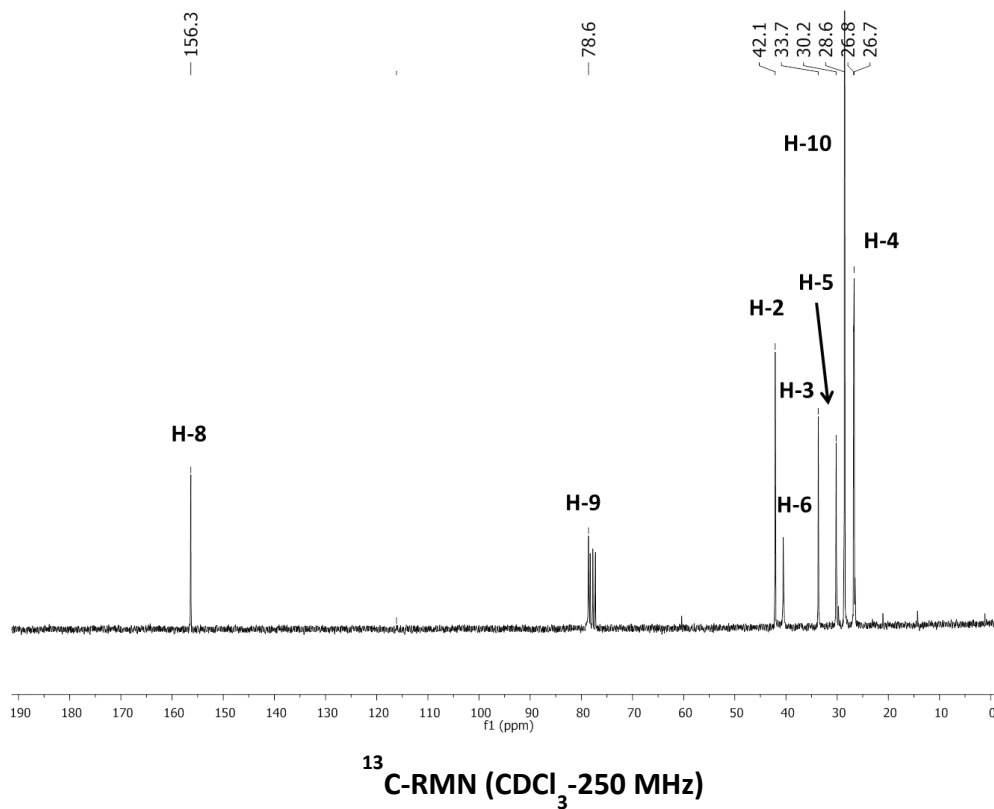


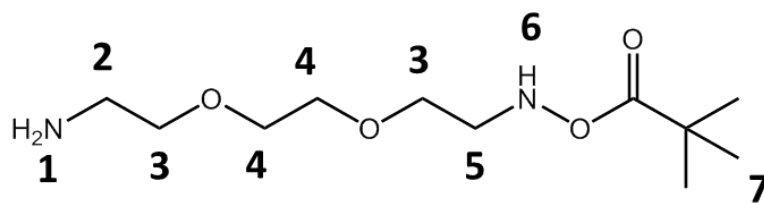


$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)

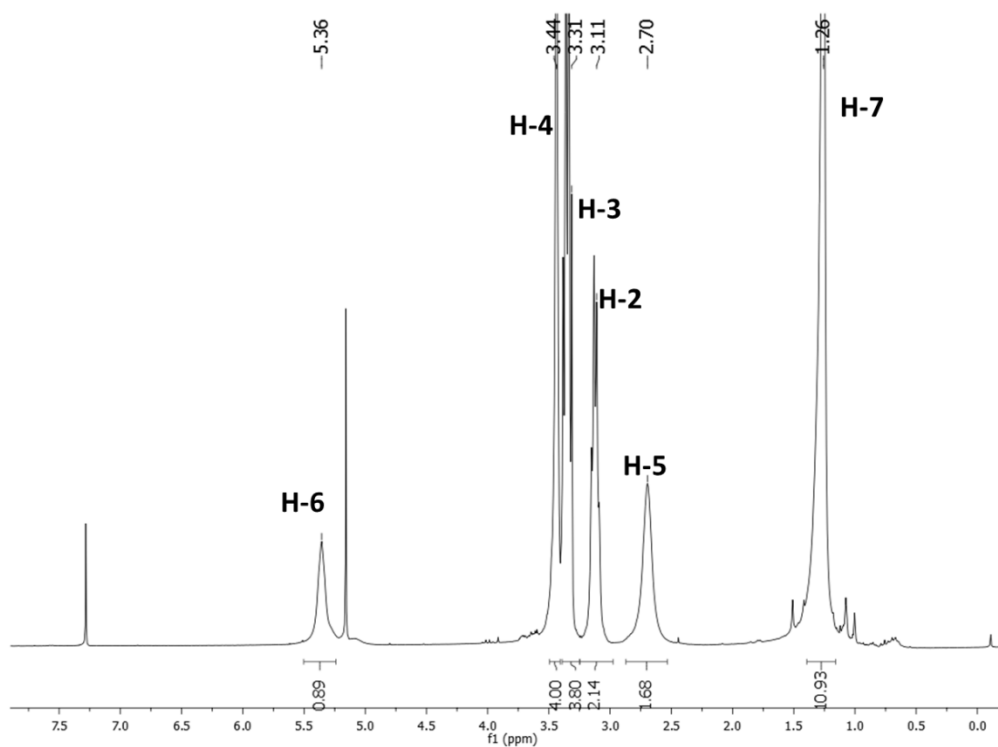
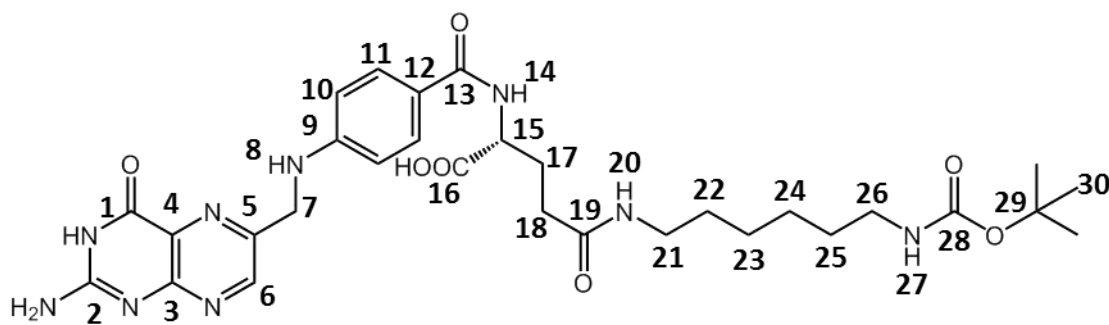


$^1\text{H}$ -COSY-RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)

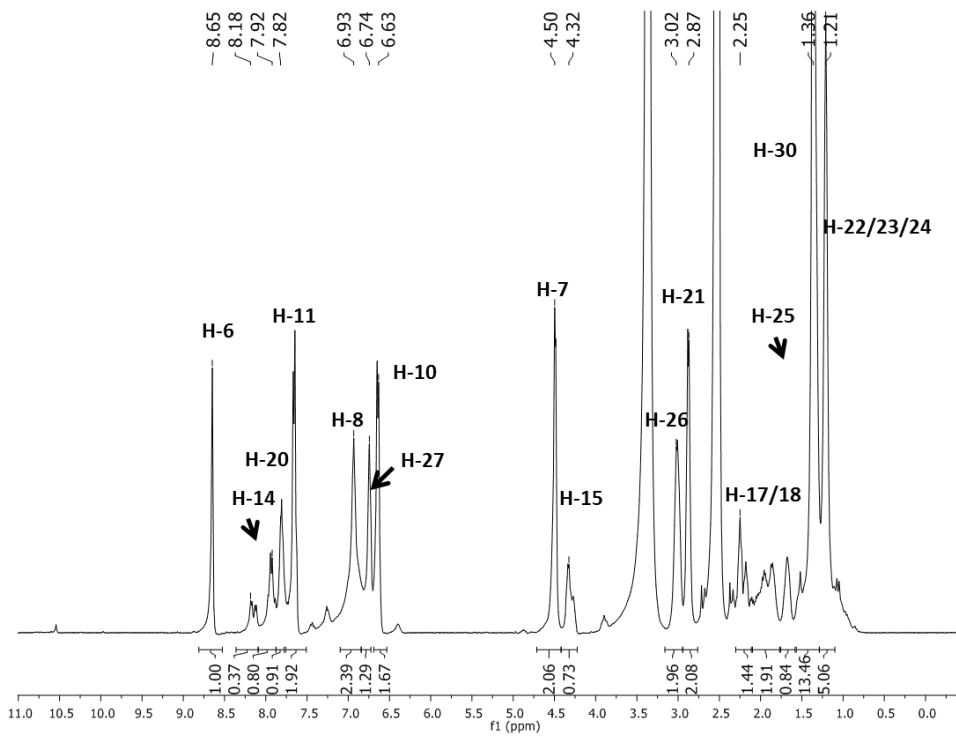




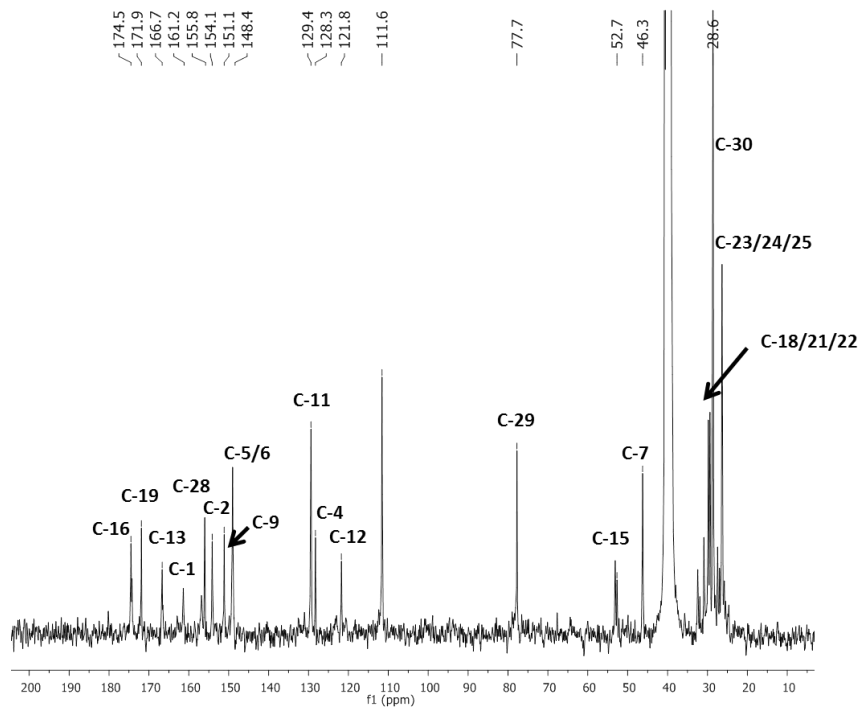
Boc-HMDA-Eh

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)

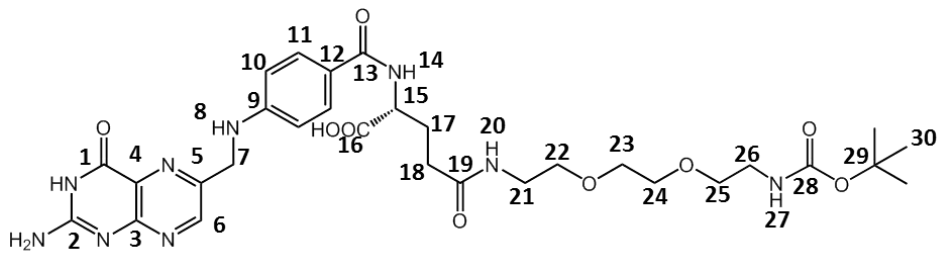
Boc-FolAq



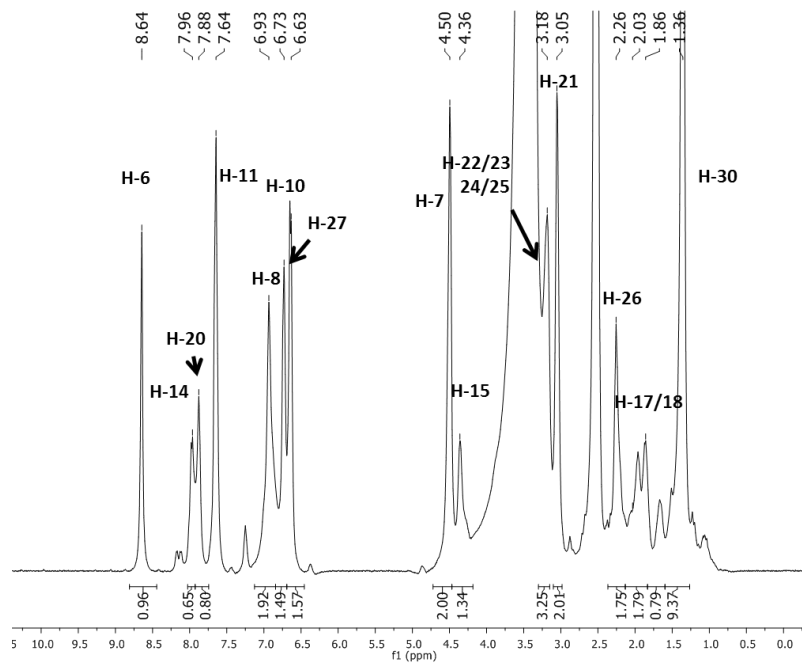
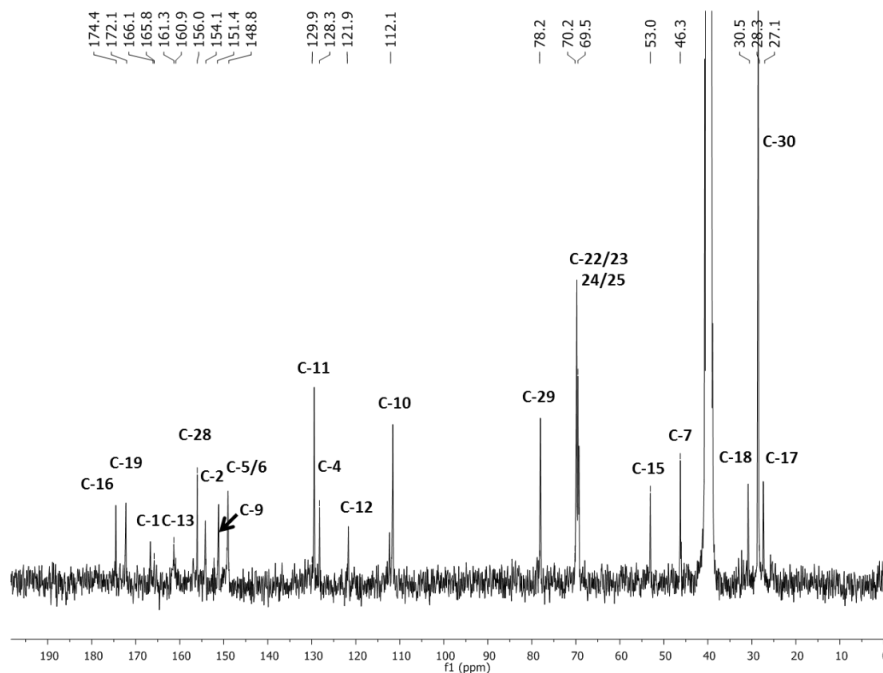
$^1\text{H-RMN}$  ( $d_6$ -DMSO-400 MHz)

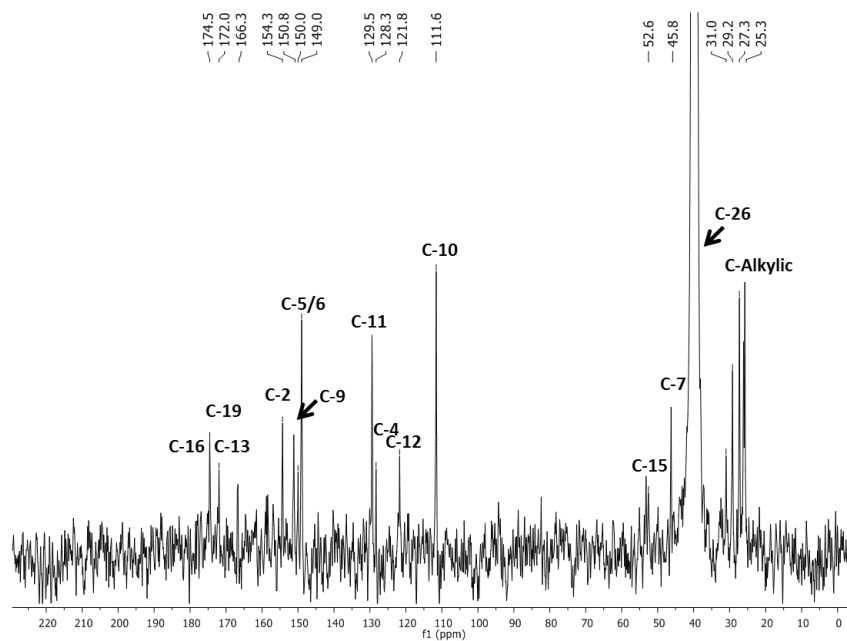
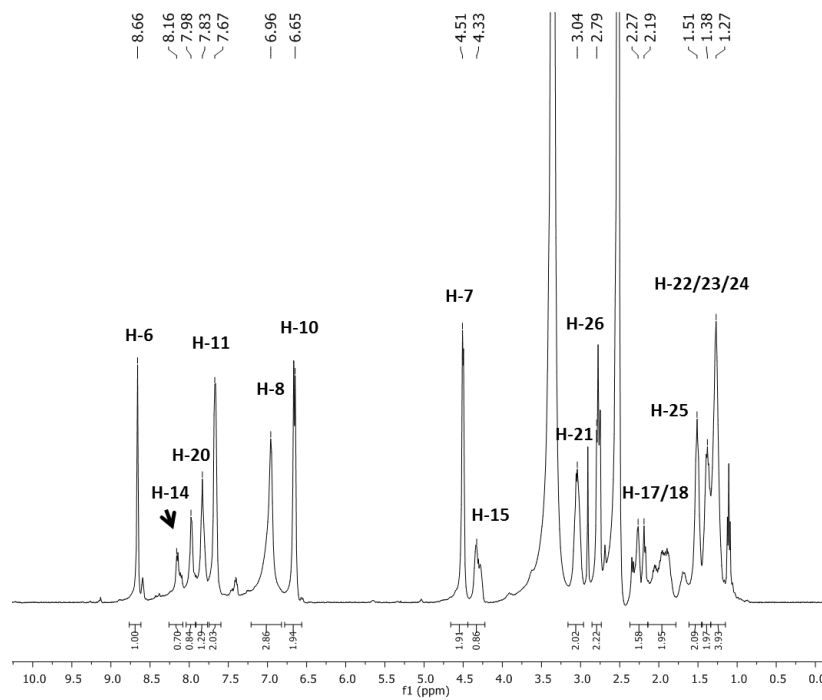
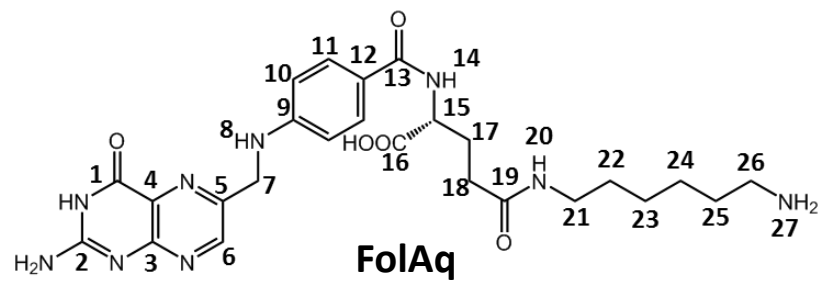


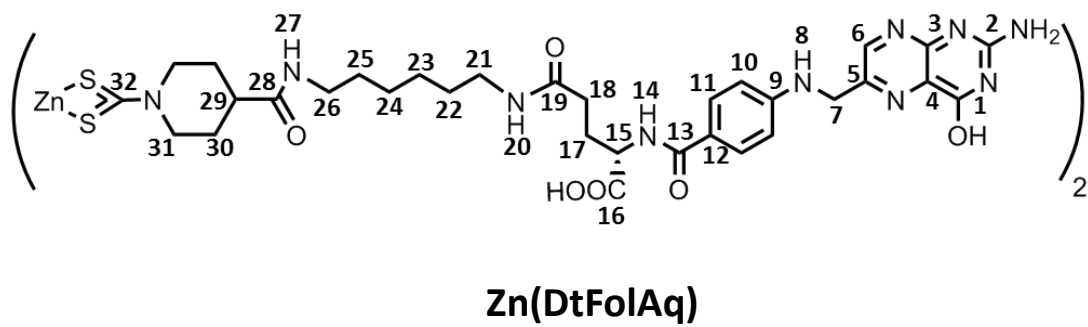
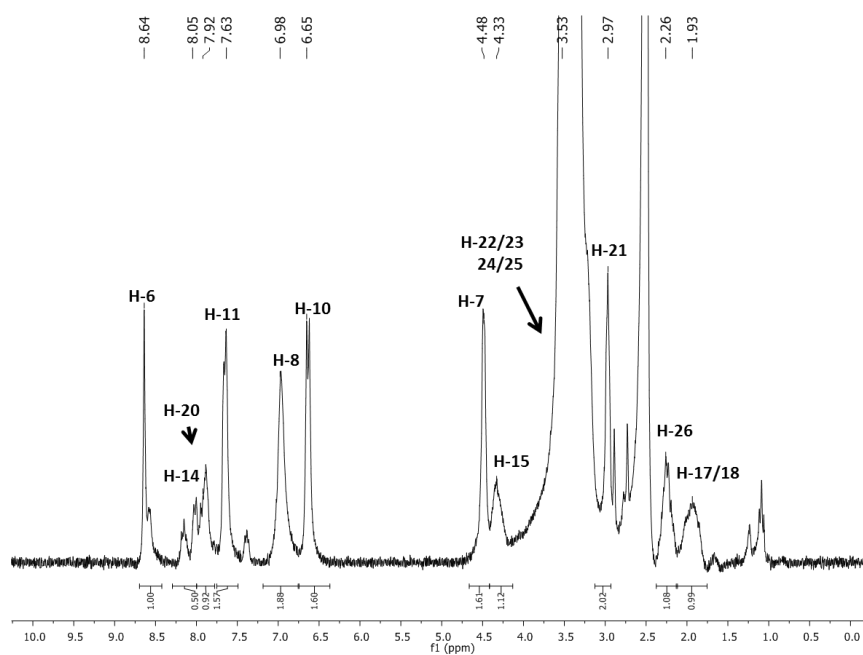
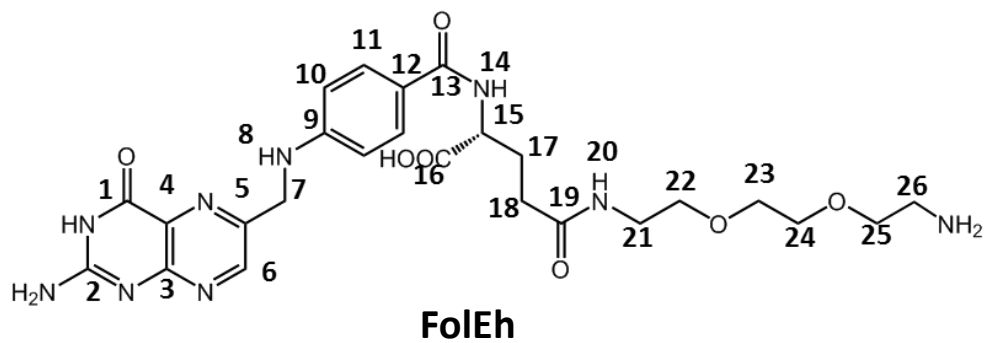
$^{13}\text{C-RMN}$  ( $d_6$ -DMSO-400 MHz)

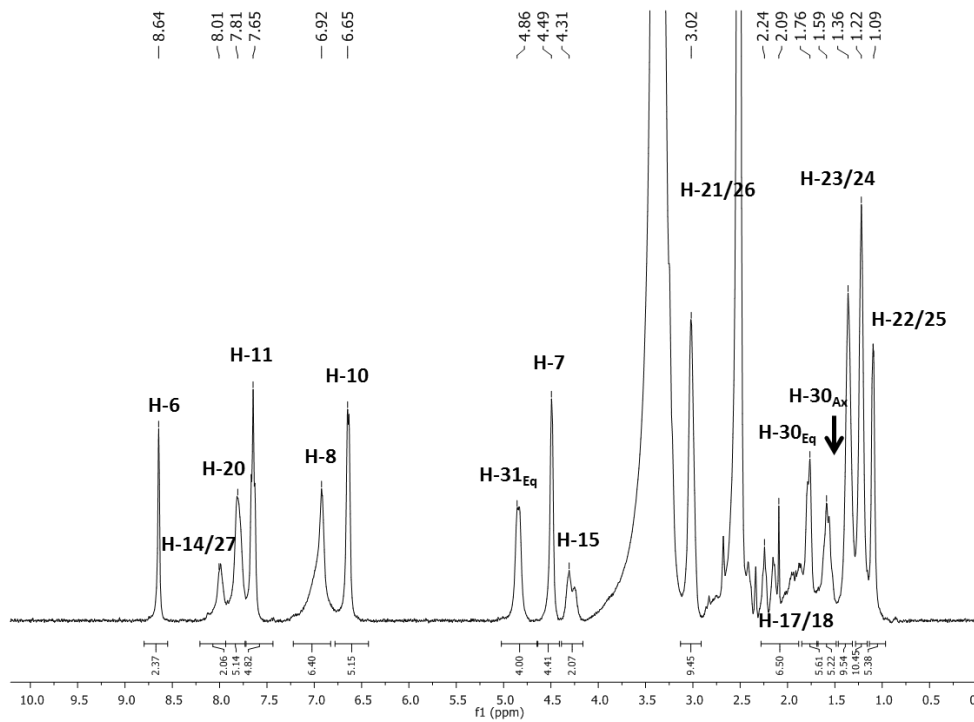


Boc-FolEh

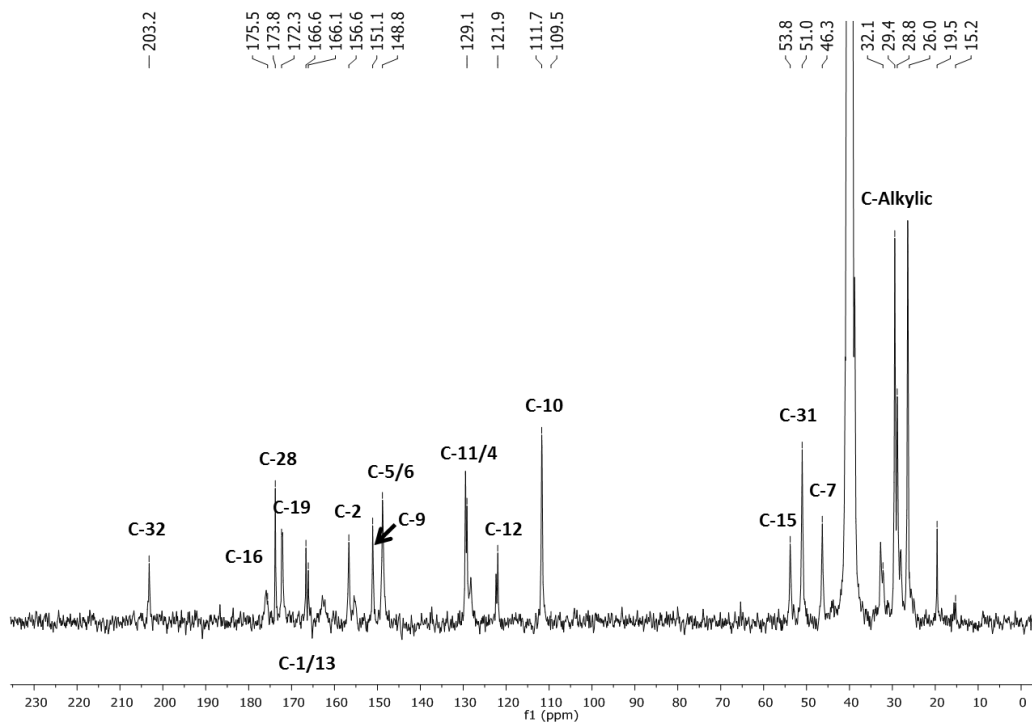
<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)<sup>13</sup>C-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)





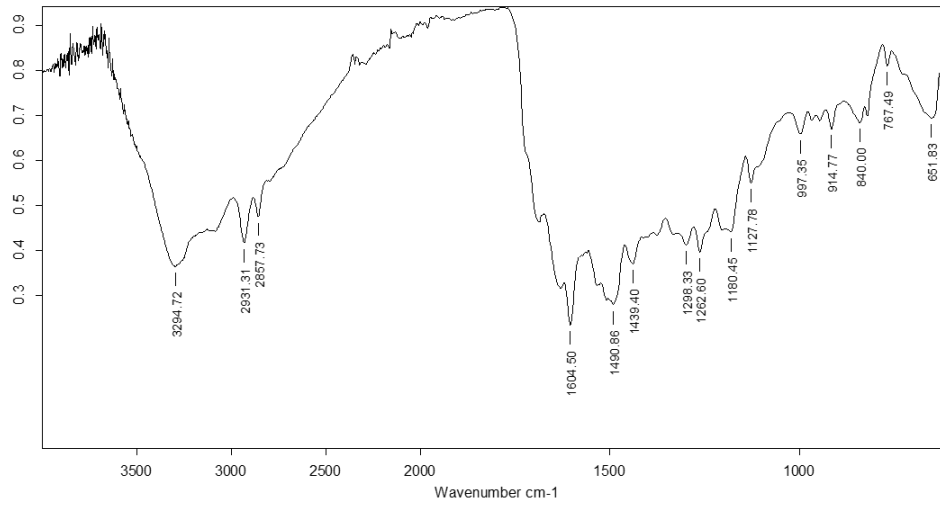


<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-400 MHz)

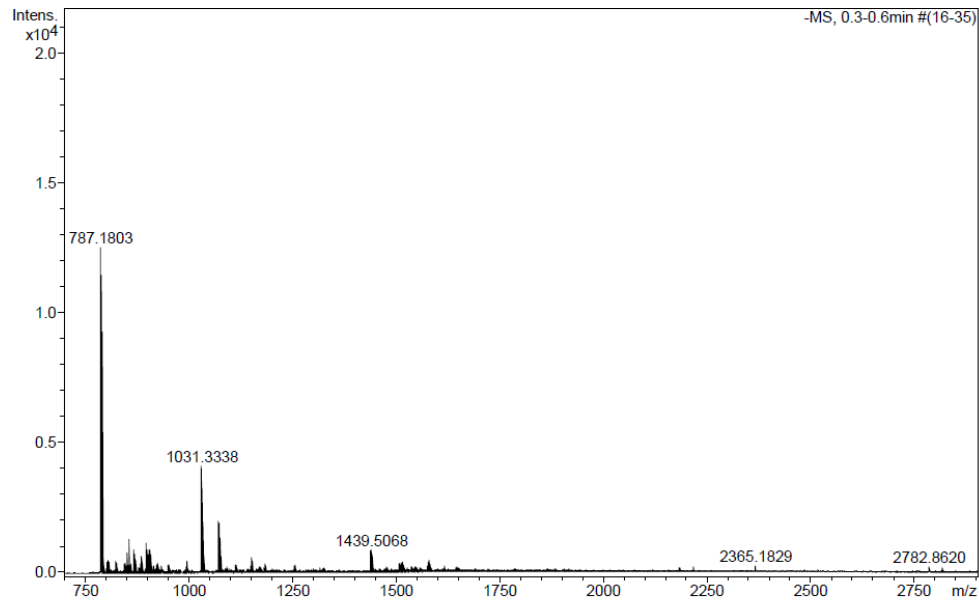


<sup>13</sup>C-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-400 MHz)

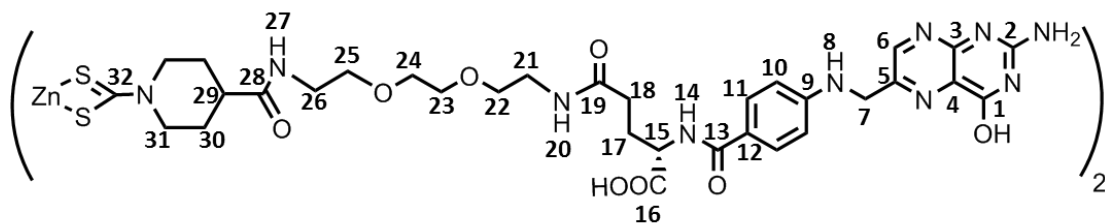




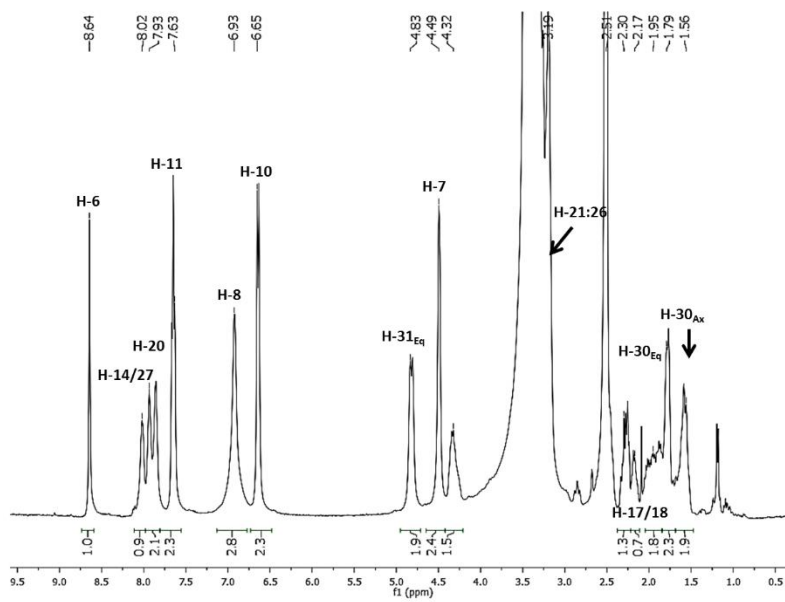
IR-ATR



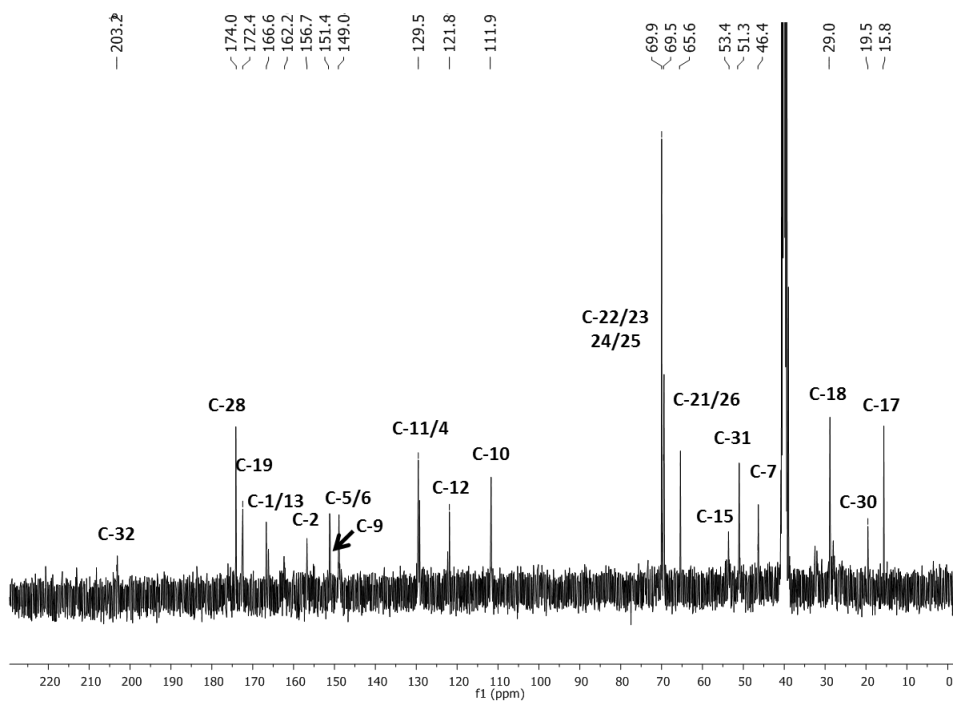
ESI-HRMS ( negative mode)



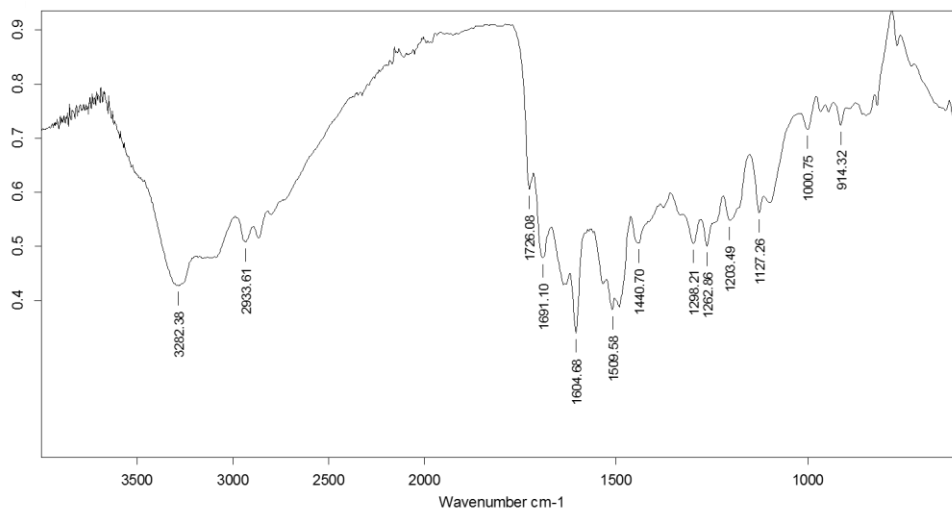
Zn(DtFolEh)



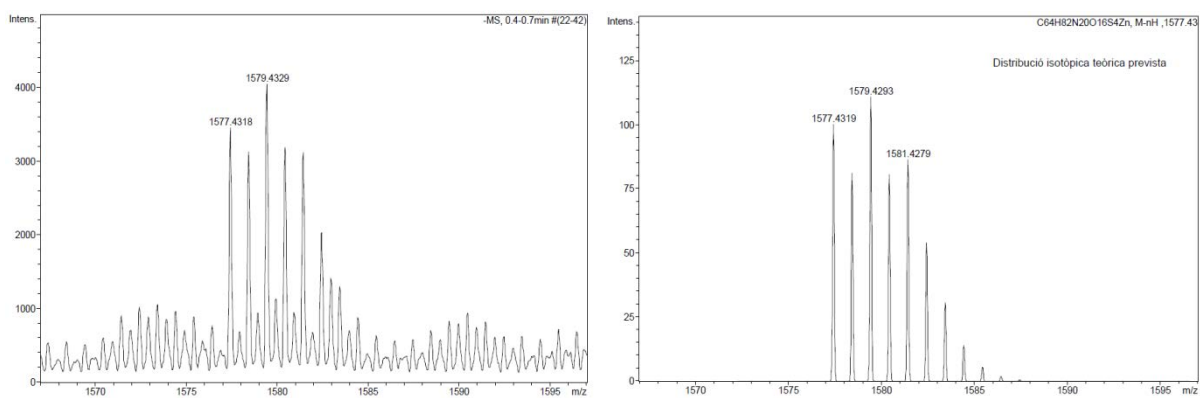
<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-400 MHz)



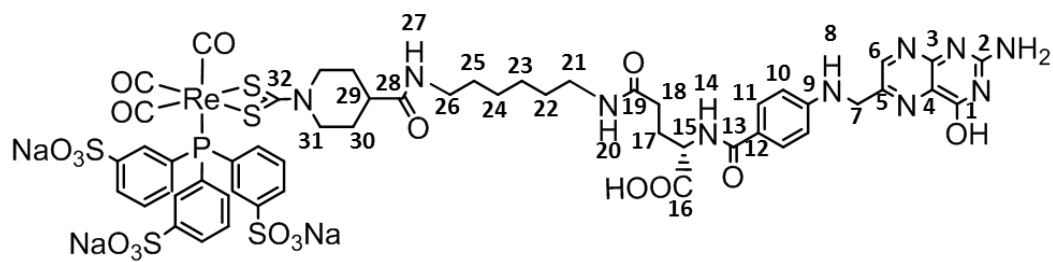
<sup>13</sup>C-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-400 MHz)



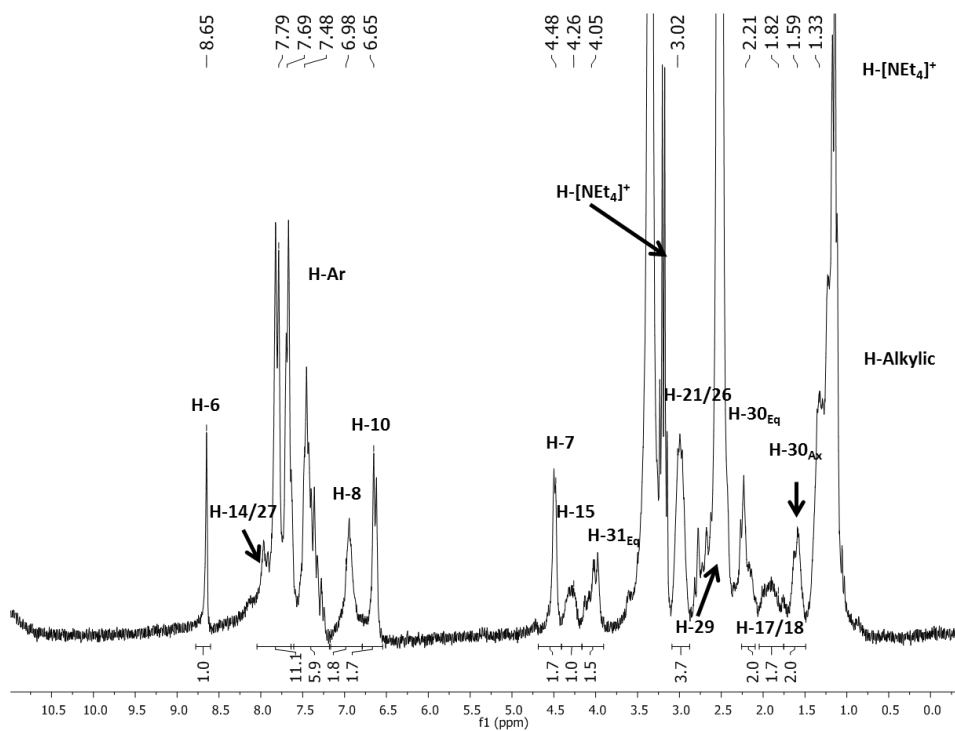
IR ( ATR )



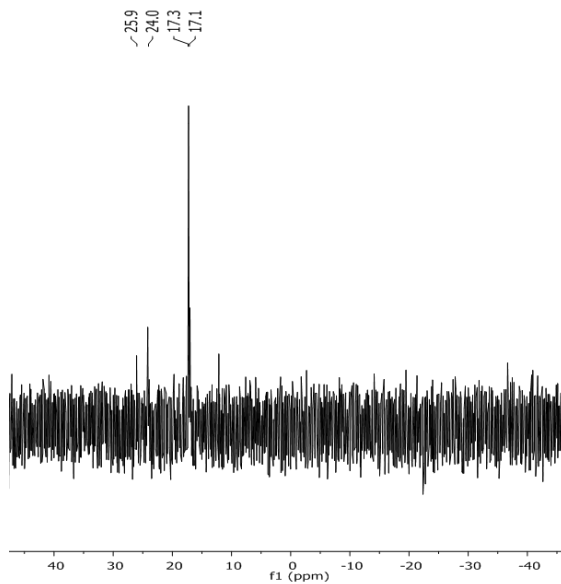
ESI-HRMS (negative mode)



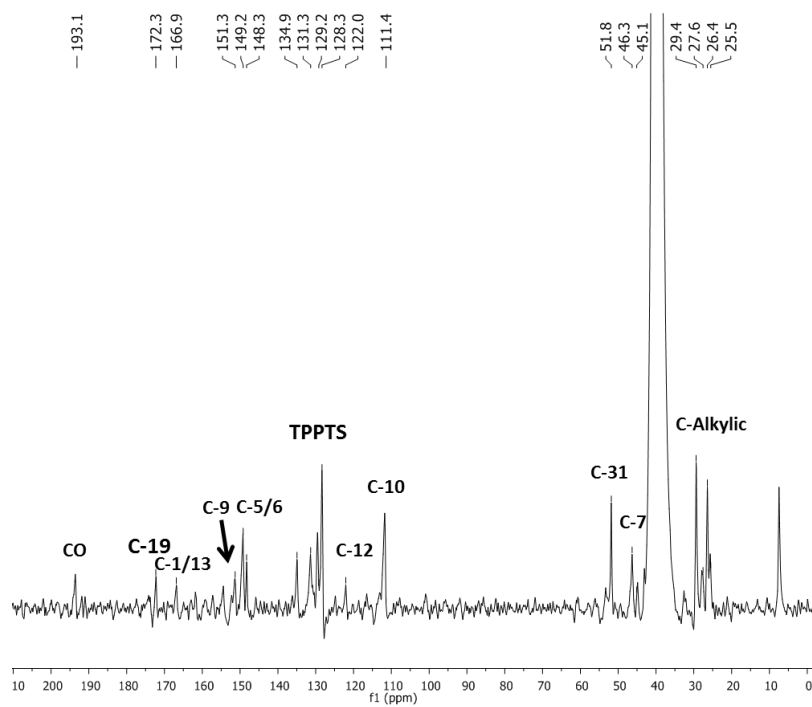
Re(DtFolAq)TPPTS



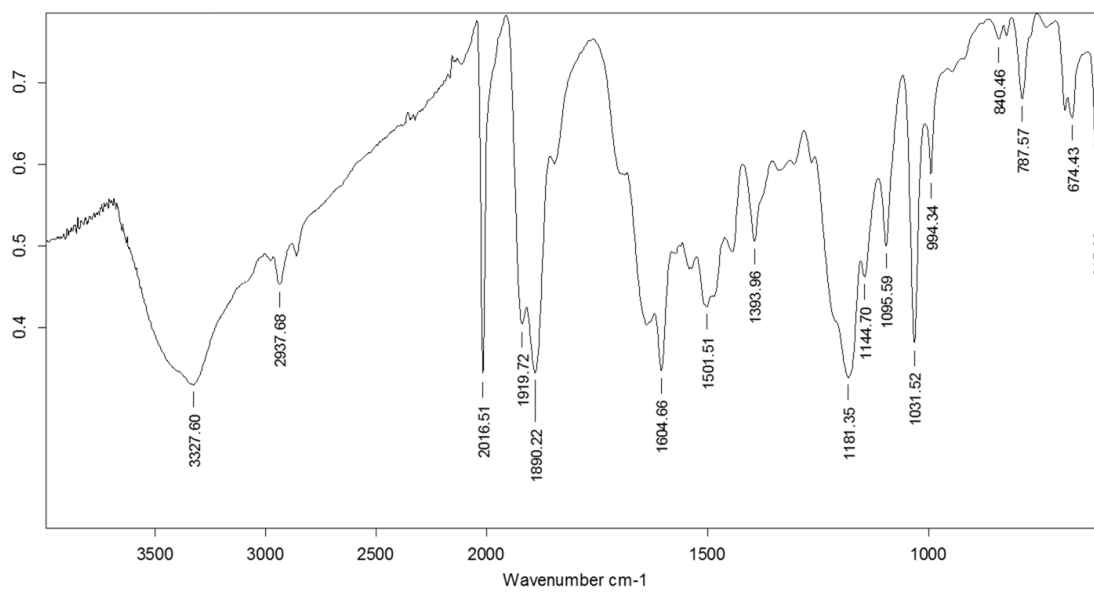
<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)



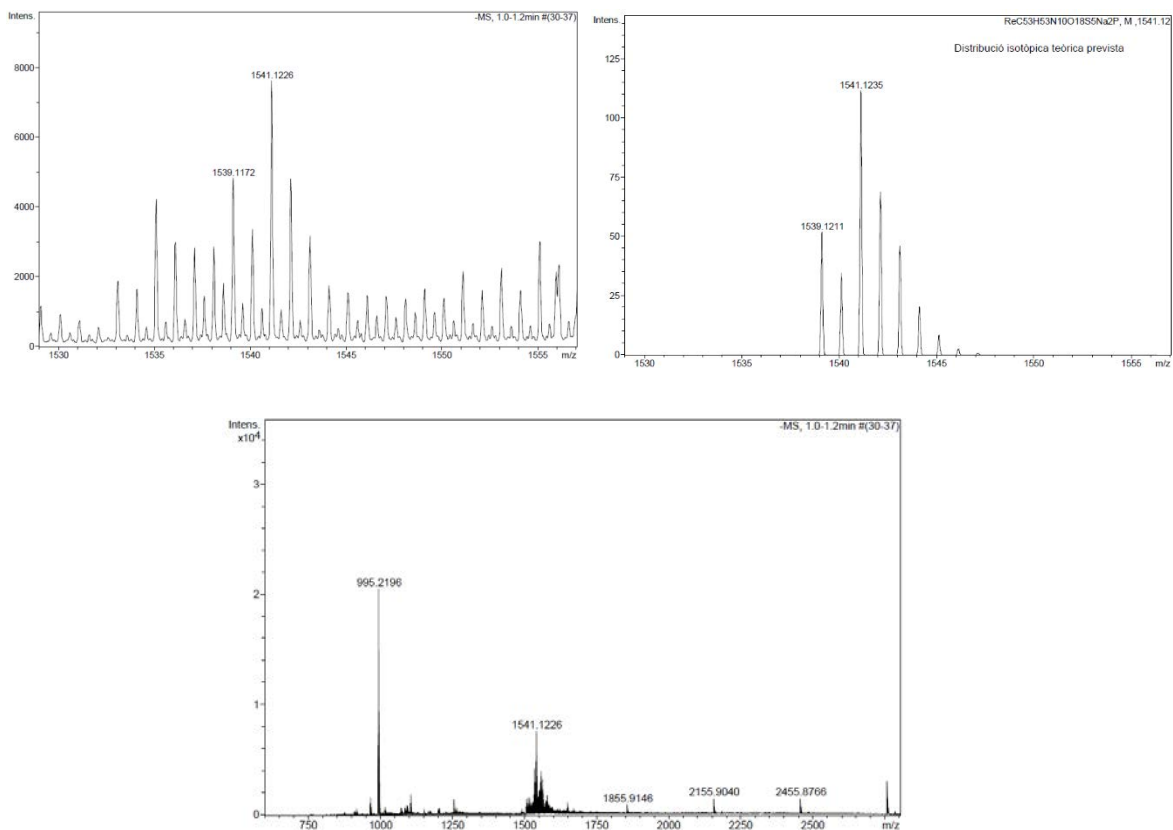
<sup>31</sup>P-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)



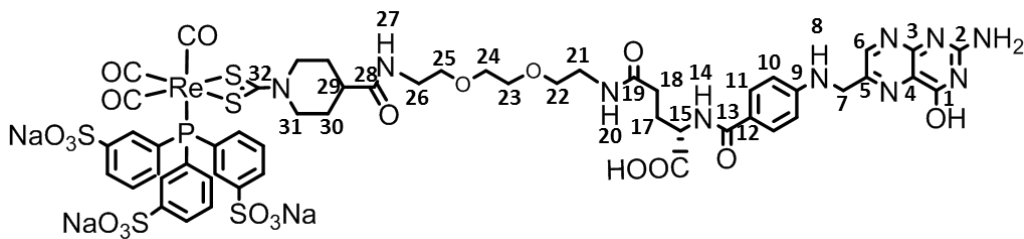
<sup>13</sup>C-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)



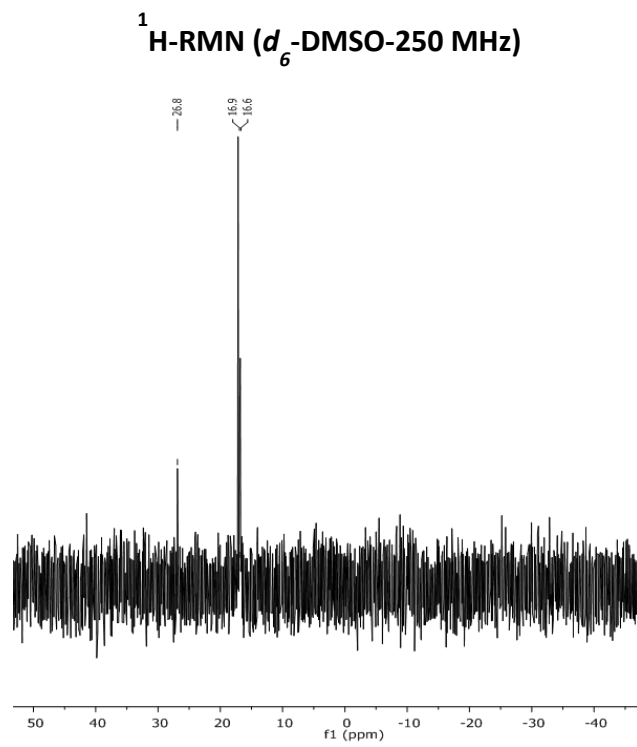
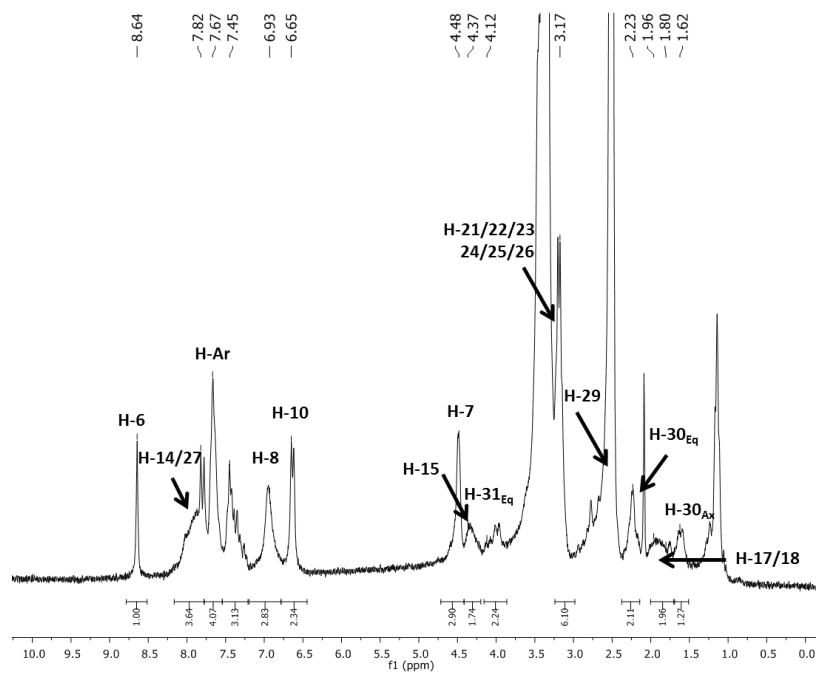
IR-ATR

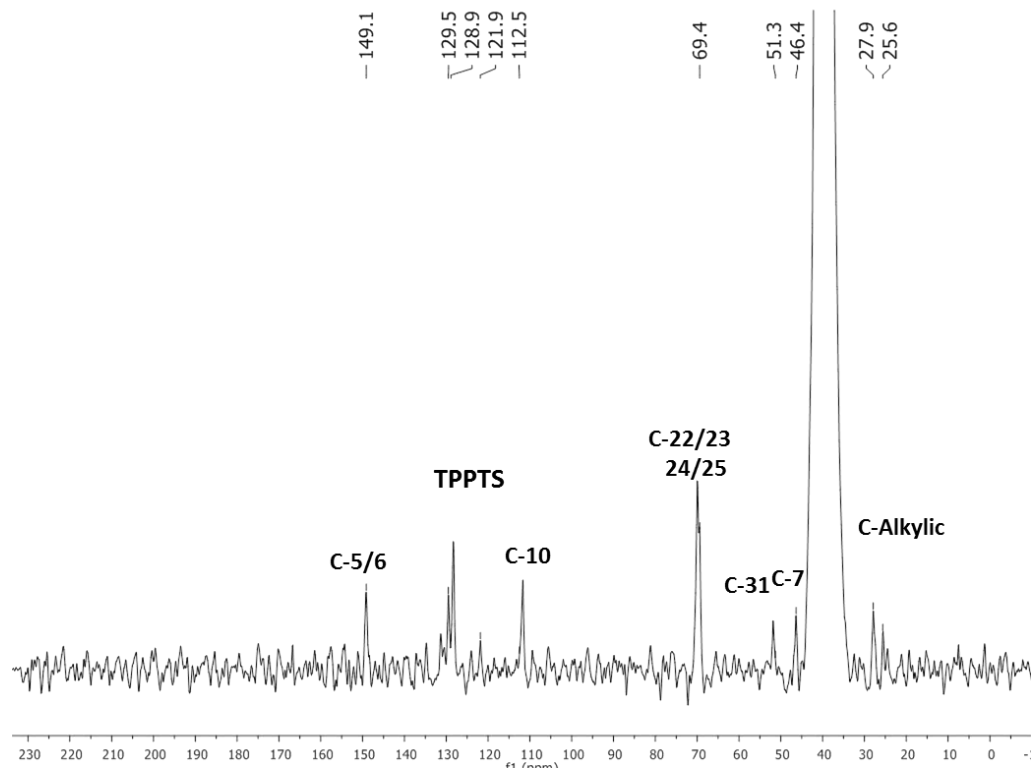


ESI-HRMS (negative mode)

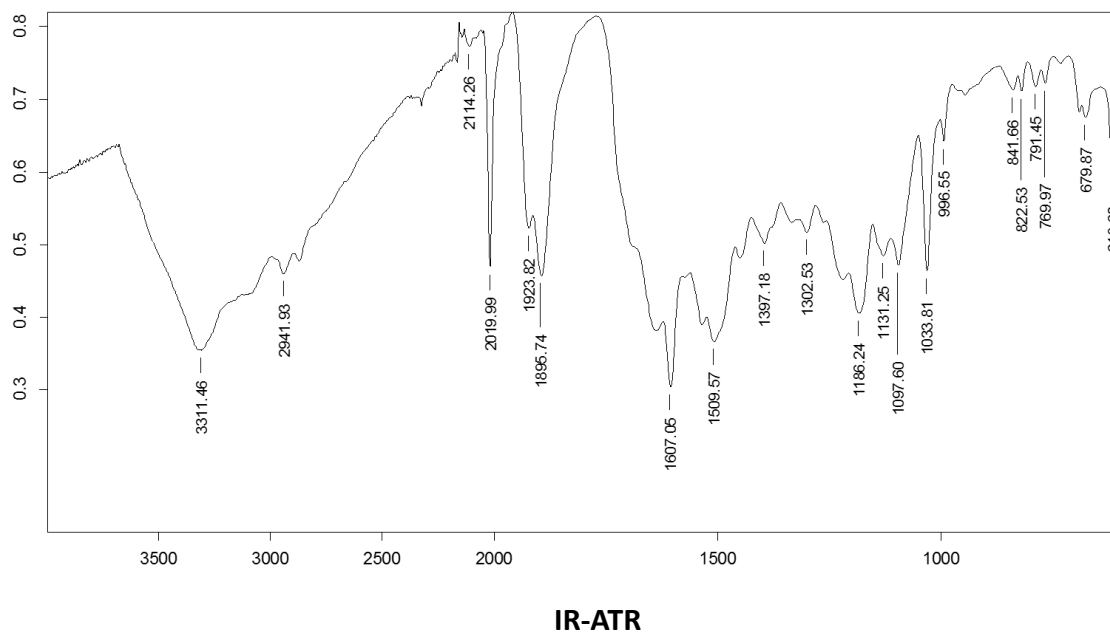


Re(DtFolEh)TPPTS

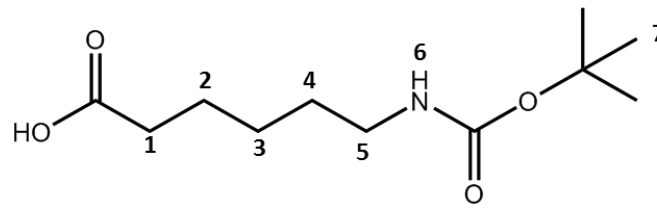
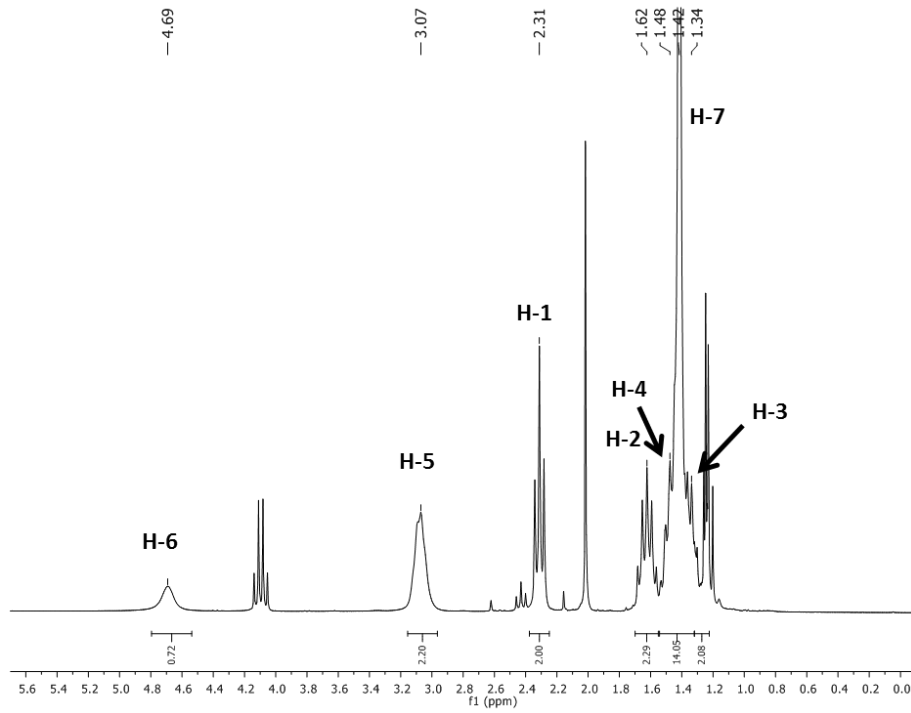
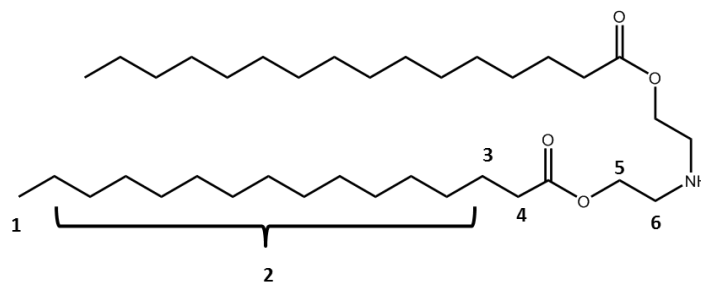


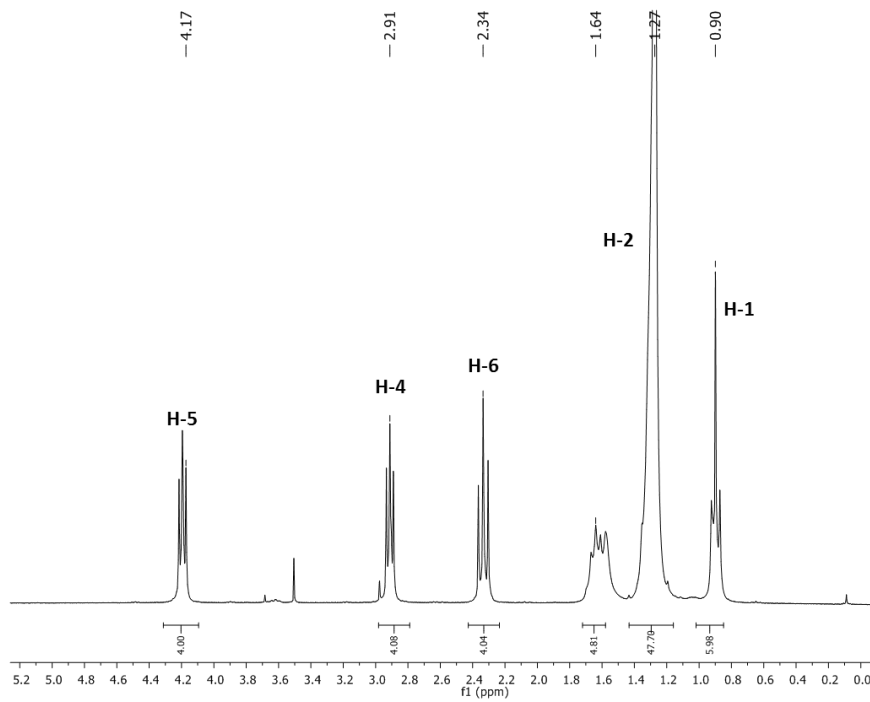


$^{13}\text{C}$ -RMN ( $d_6$ -DMSO-360 MHz)

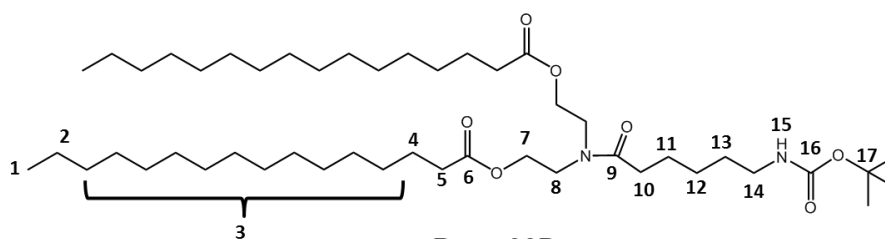




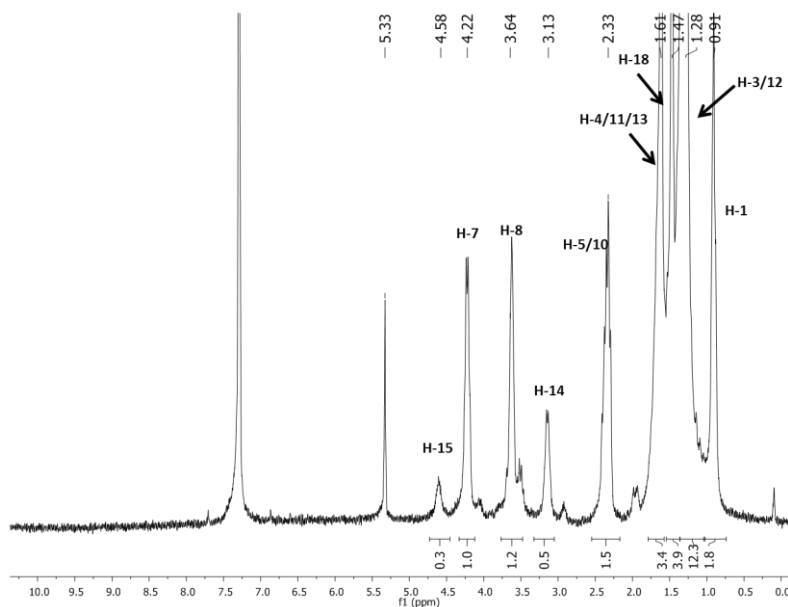
**Boc-Hex****<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)****PA**



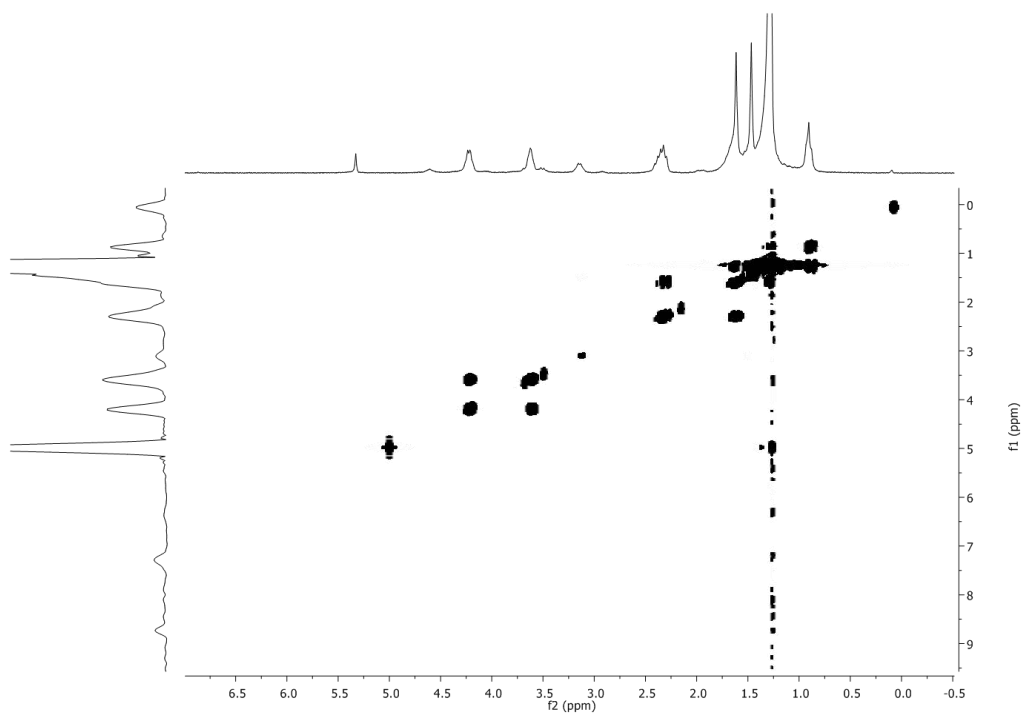
**1**  
 $^1\text{H-RMN (CDCl}_3\text{-250 MHz)}$



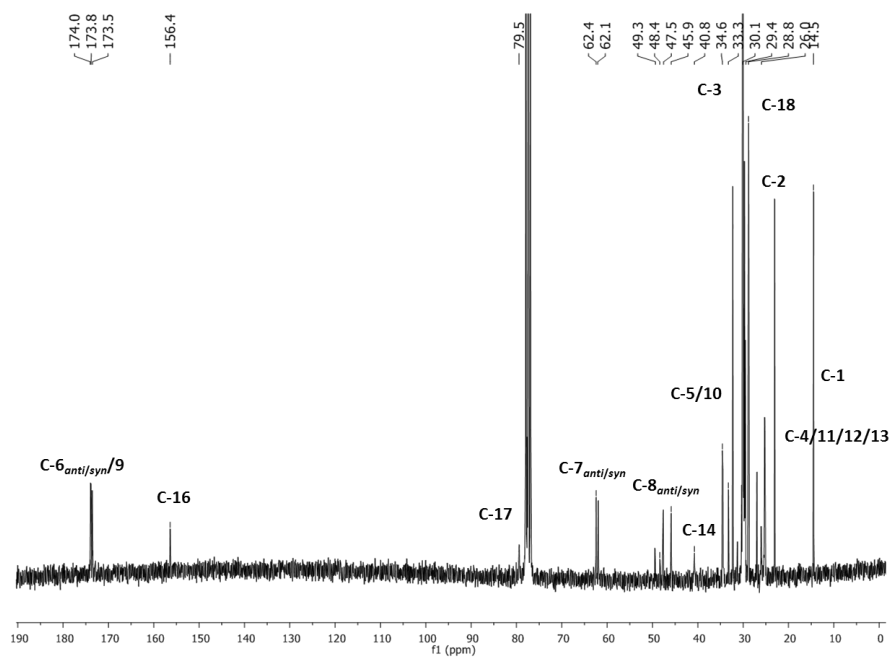
**Boc-HP**



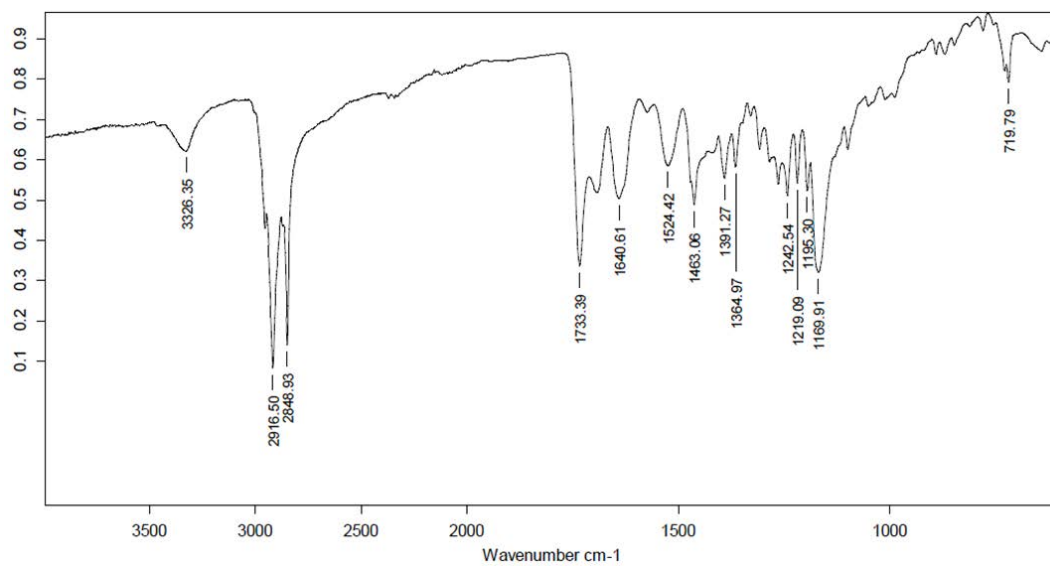
**1**  
 $^1\text{H-RMN (CDCl}_3\text{-250 MHz)}$



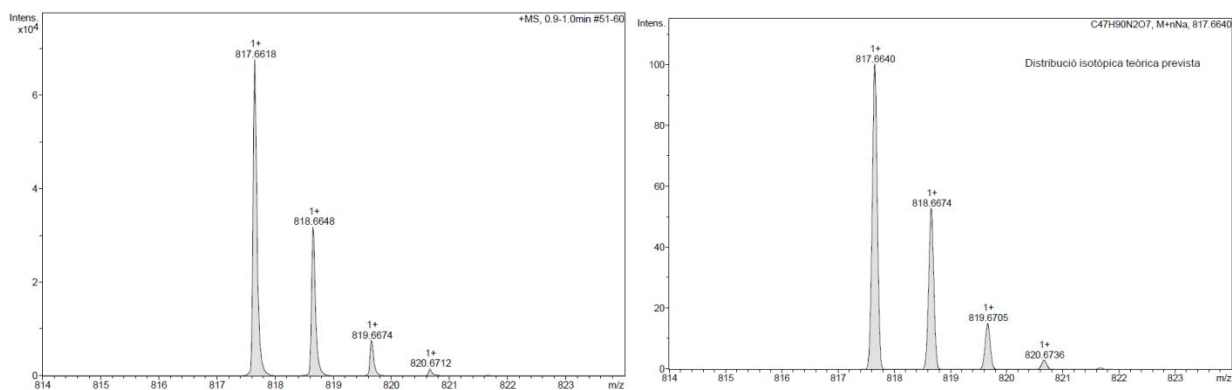
<sup>1</sup>H-COSY-RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)



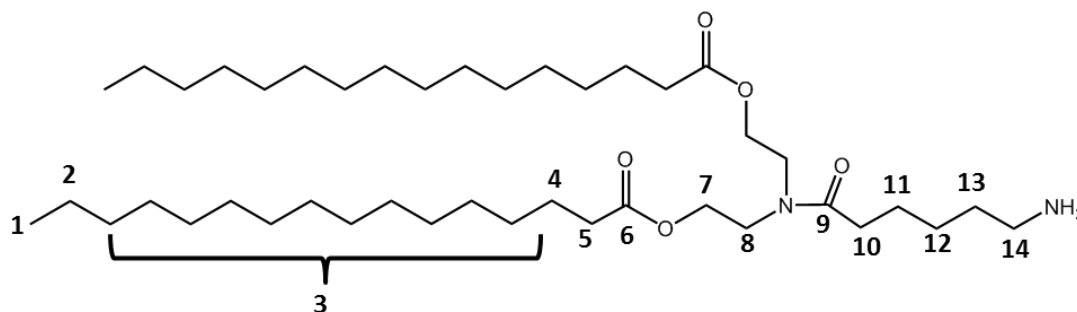
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-250 MHz)

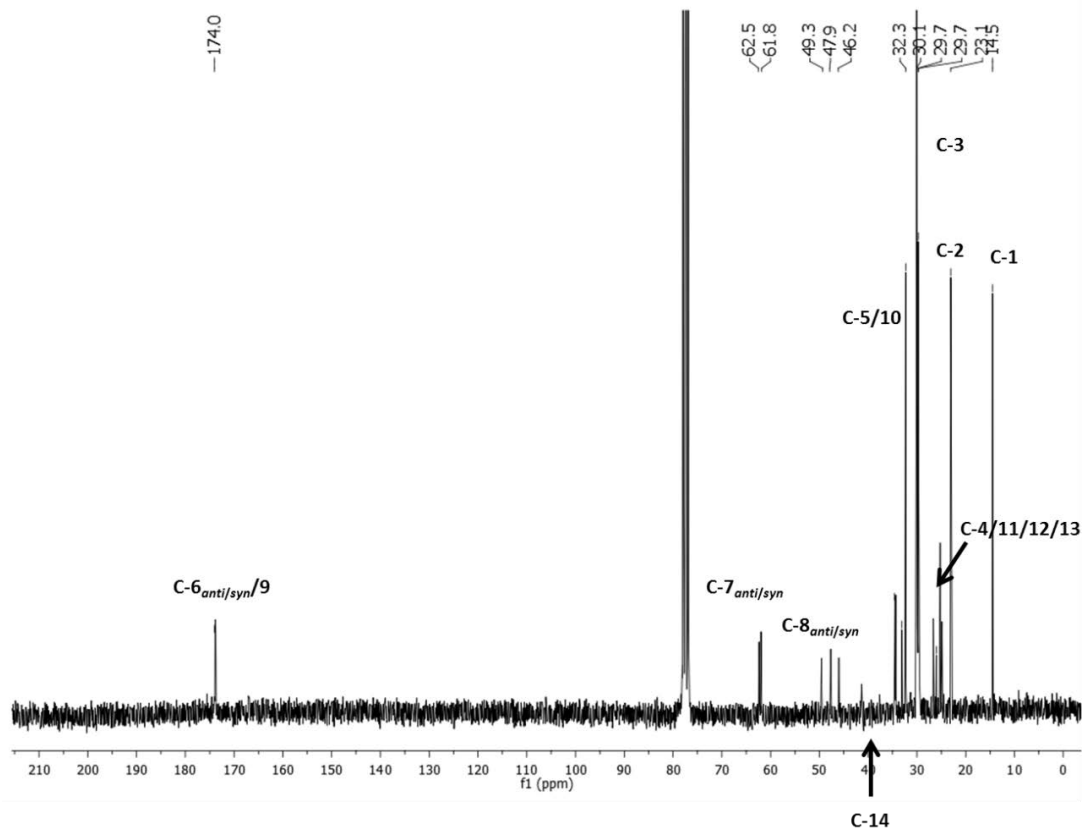
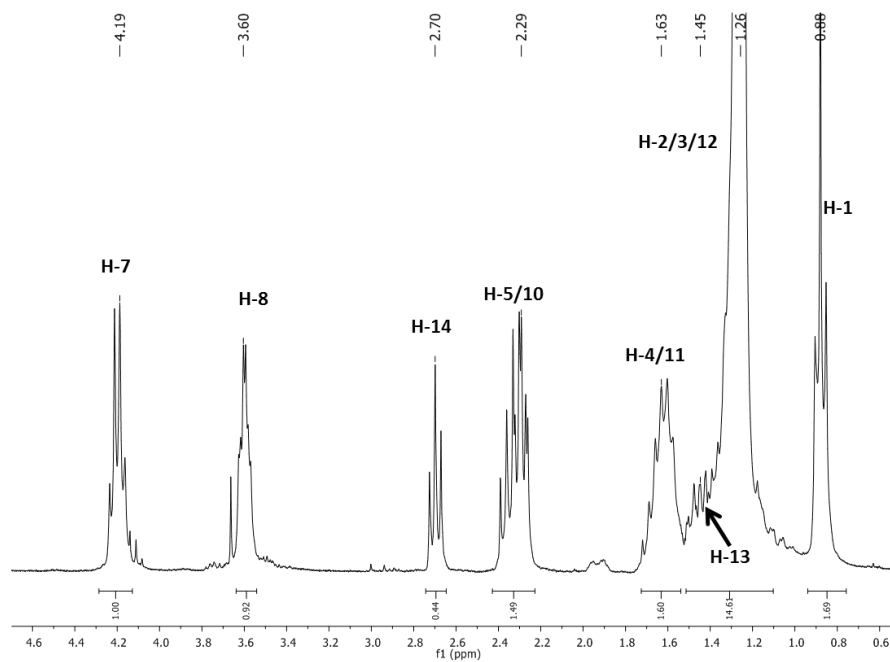


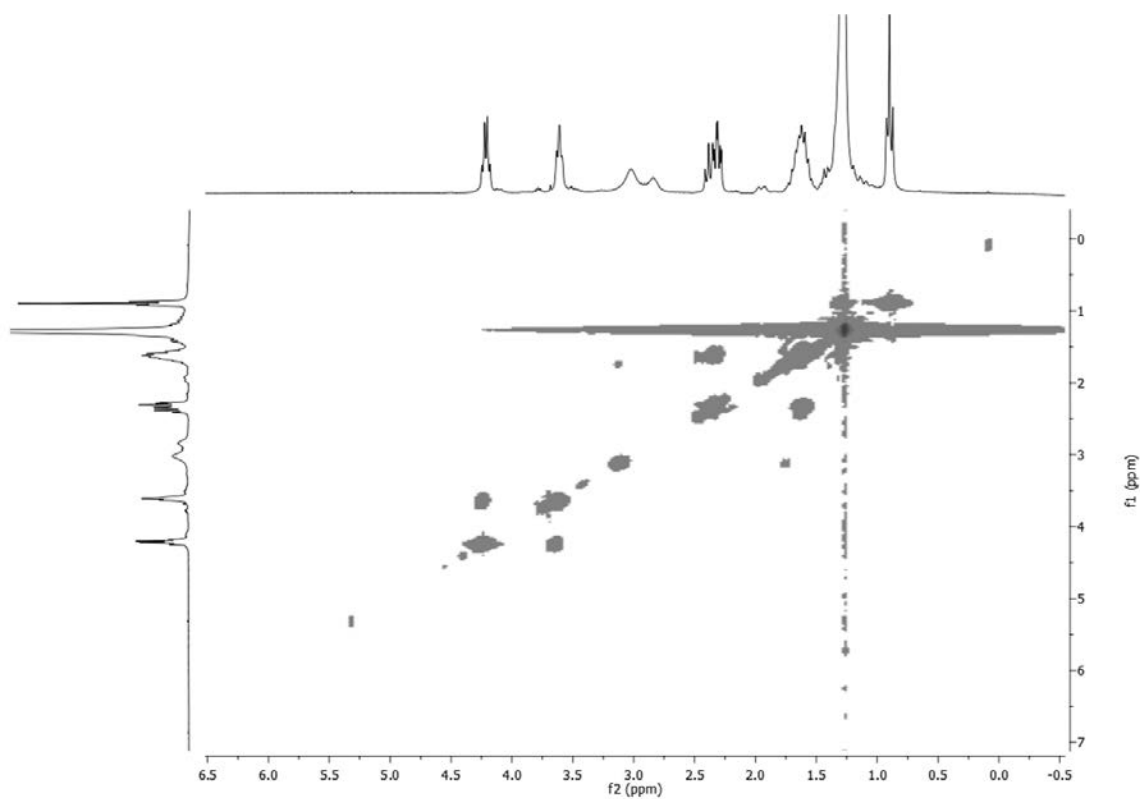
IR-ATR



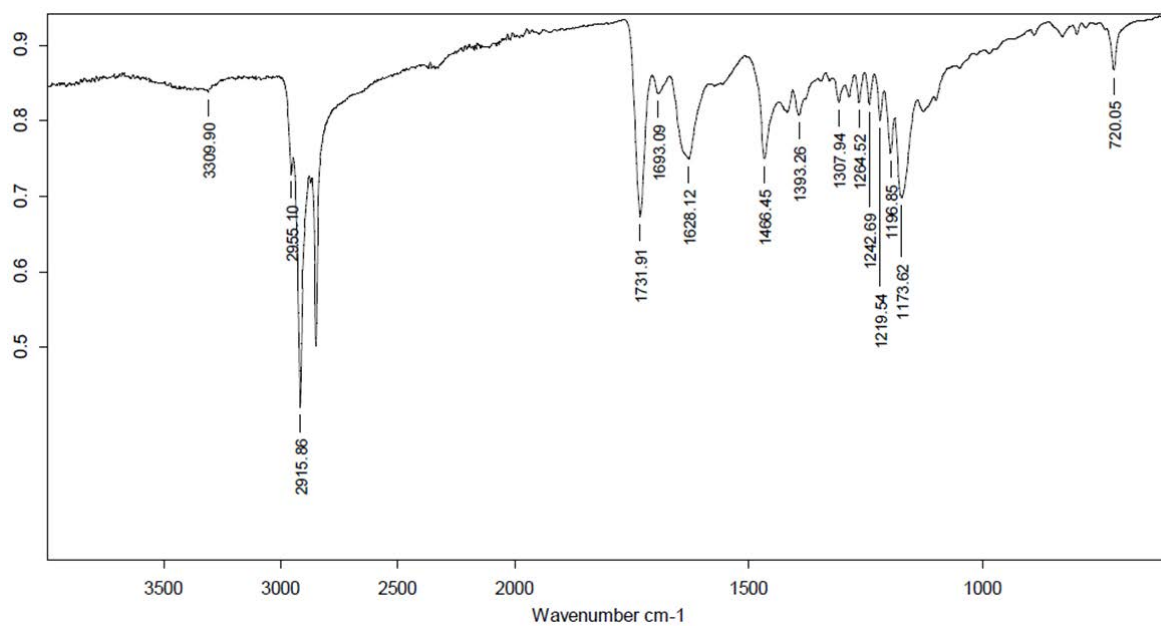
ESI-HRMS (positive mode)

NH<sub>2</sub>-HP

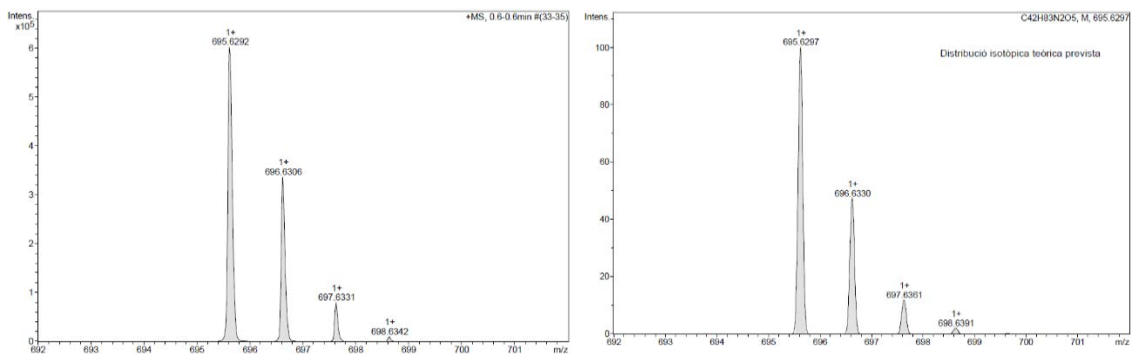




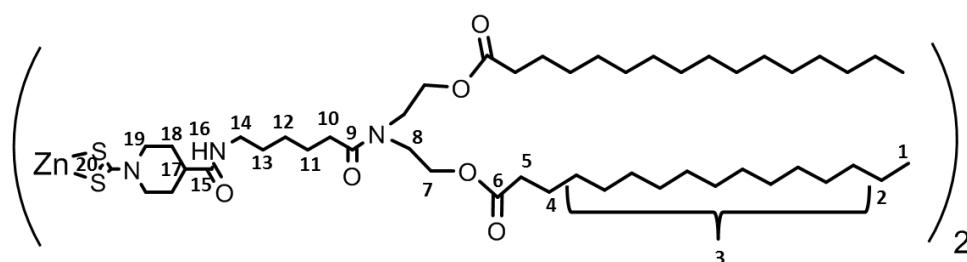
$^1\text{H}$ -COSY-RMN ( $\text{CDCl}_3$ -250 MHz)



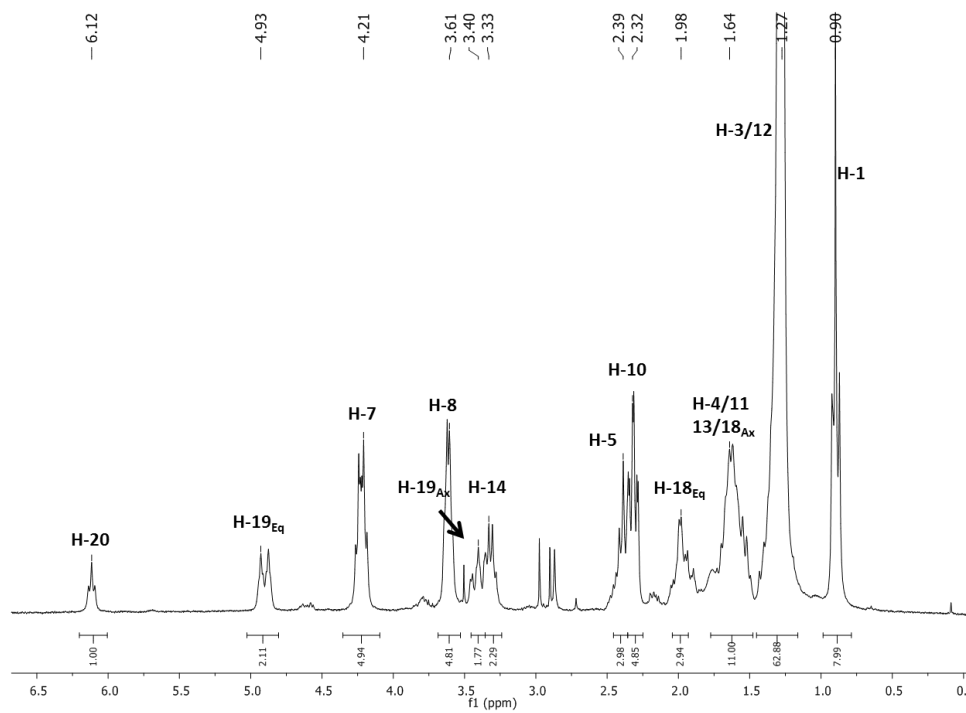
IR-ATR

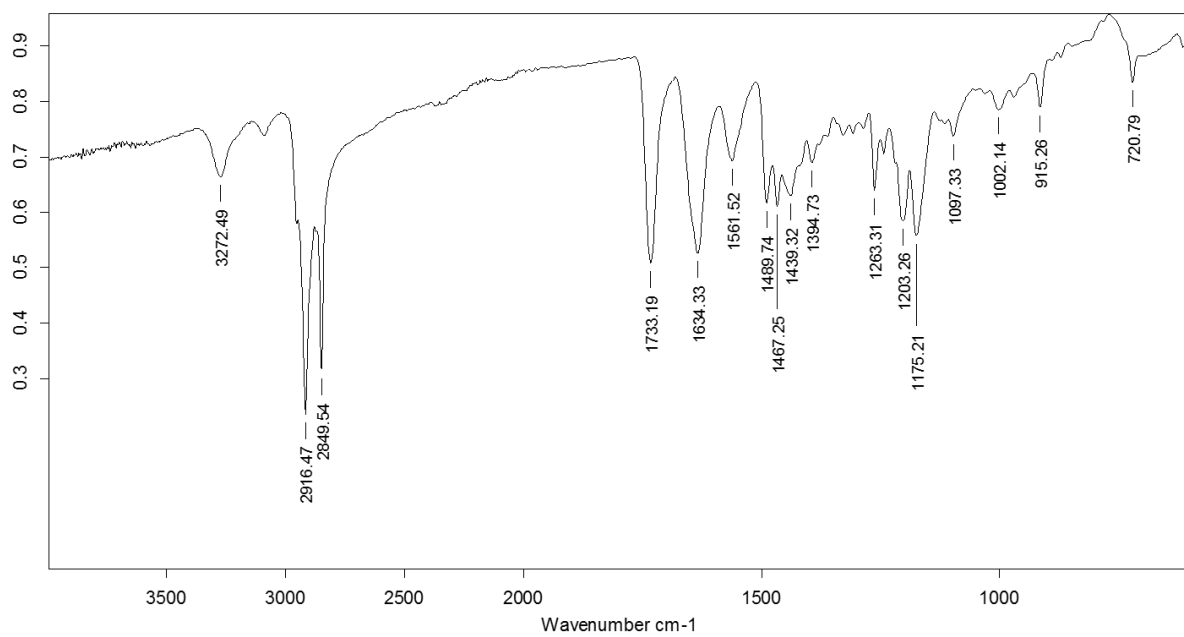
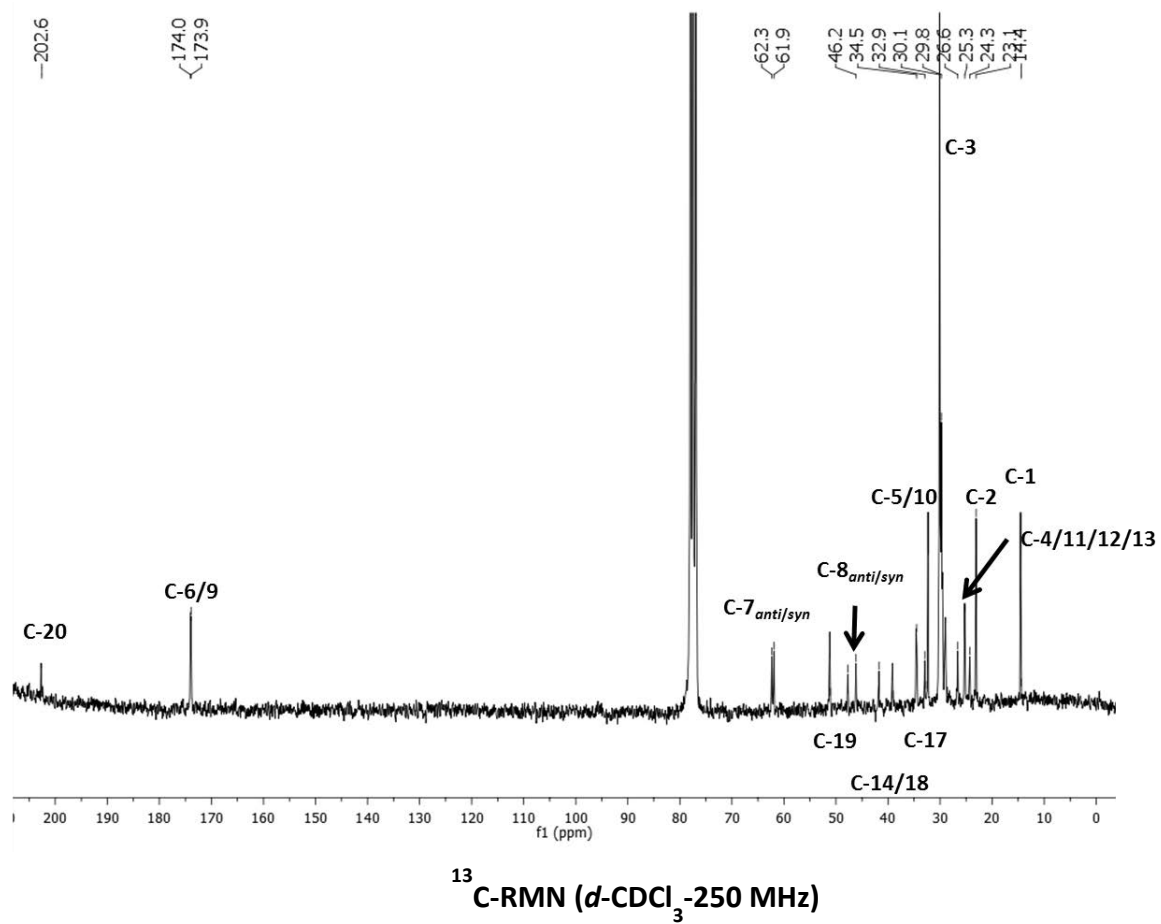


ESI-HRMS (positive mode)

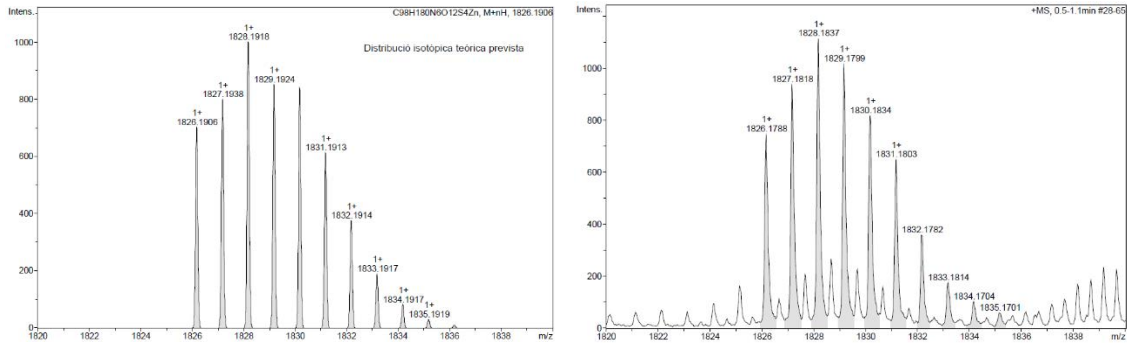


Zn(DtHP)

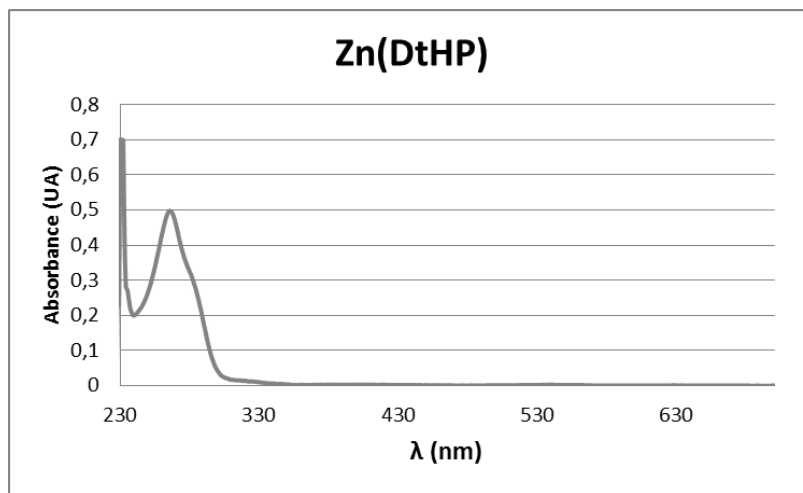
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub> -250 MHz)



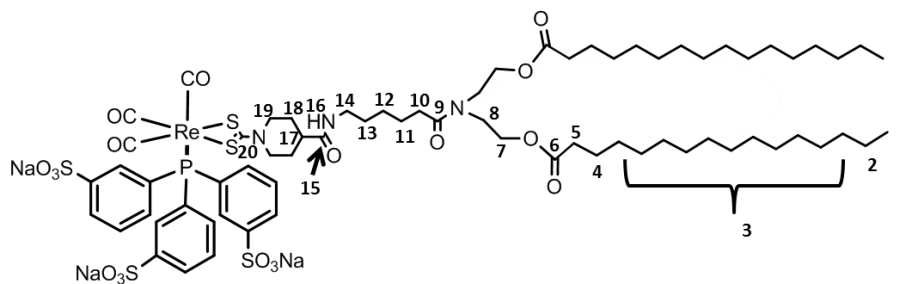




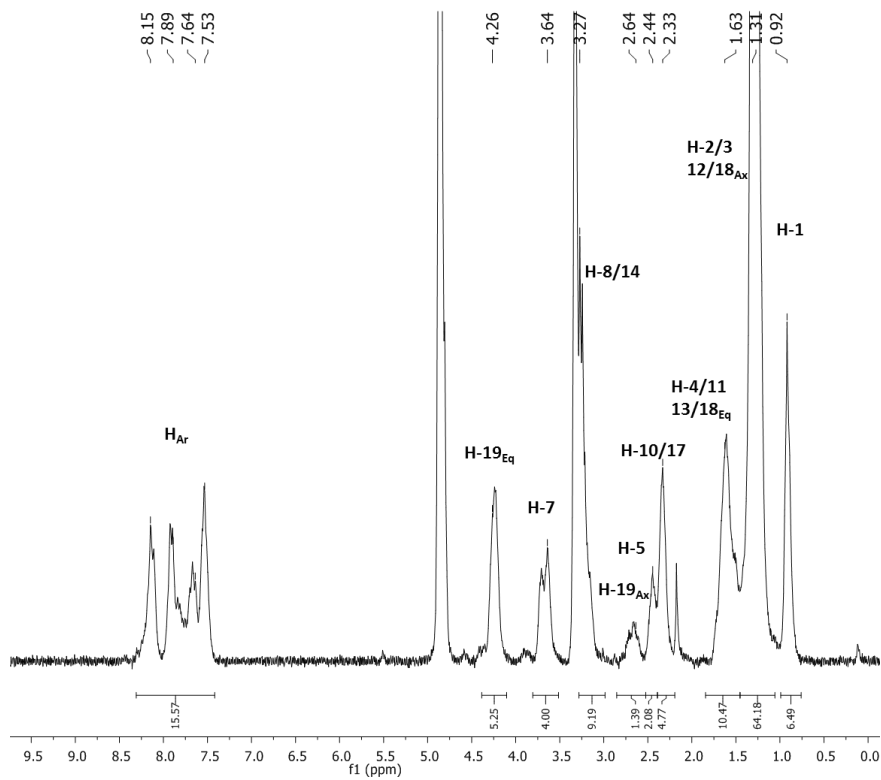
ESI-HRMS



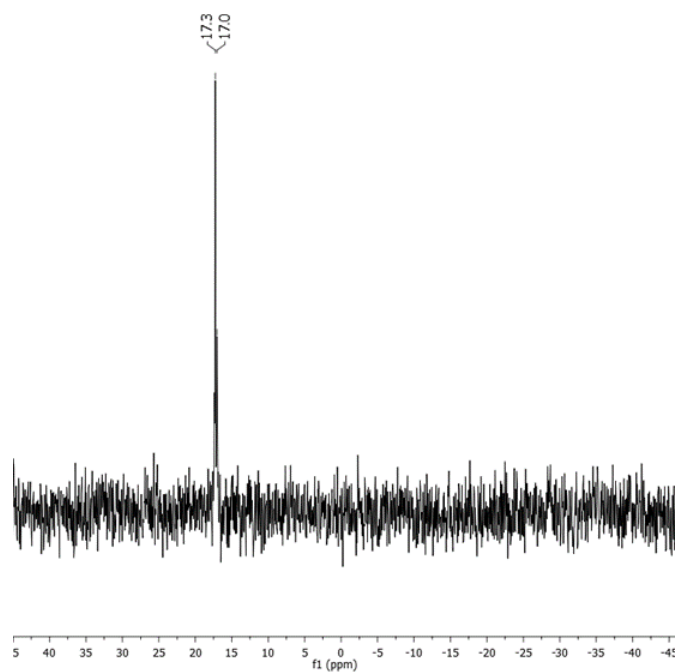
UV-Vis [Zn(DtHP)] = 0,1 mM



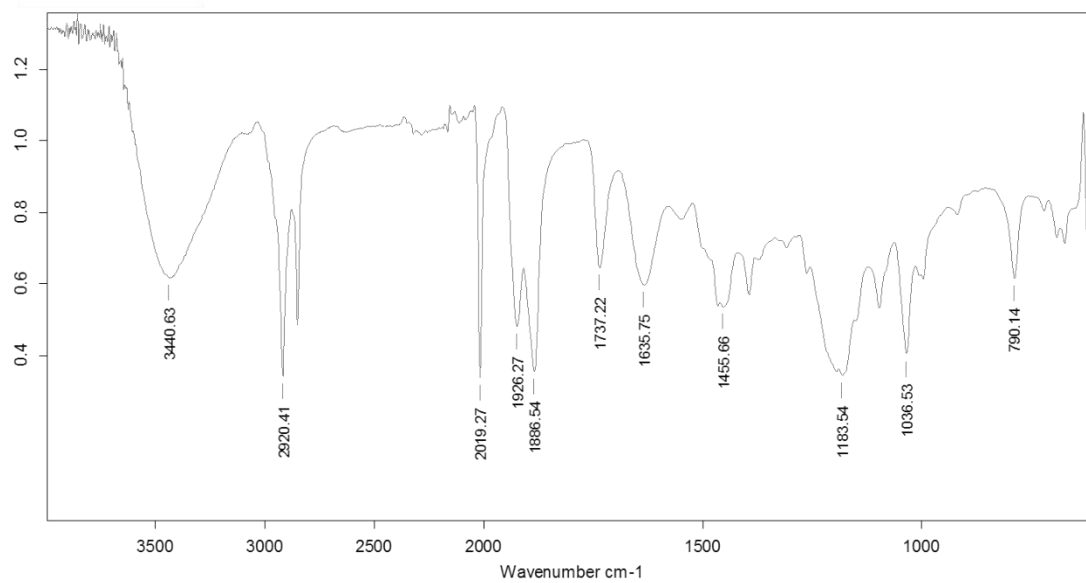
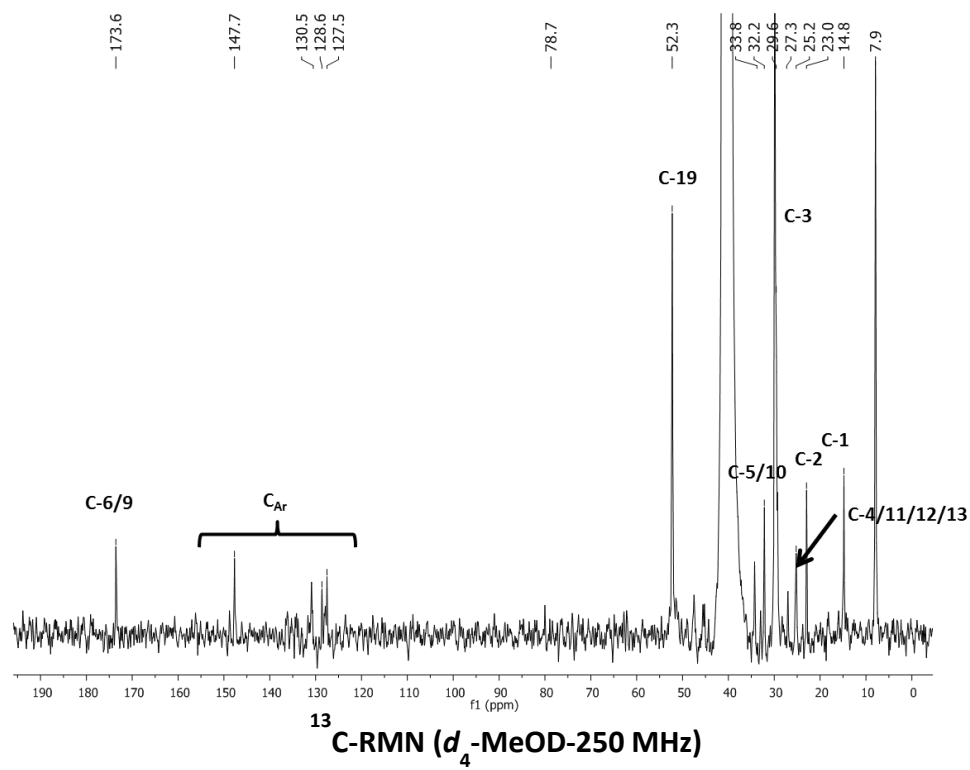
Re(DtHP)TPPTS

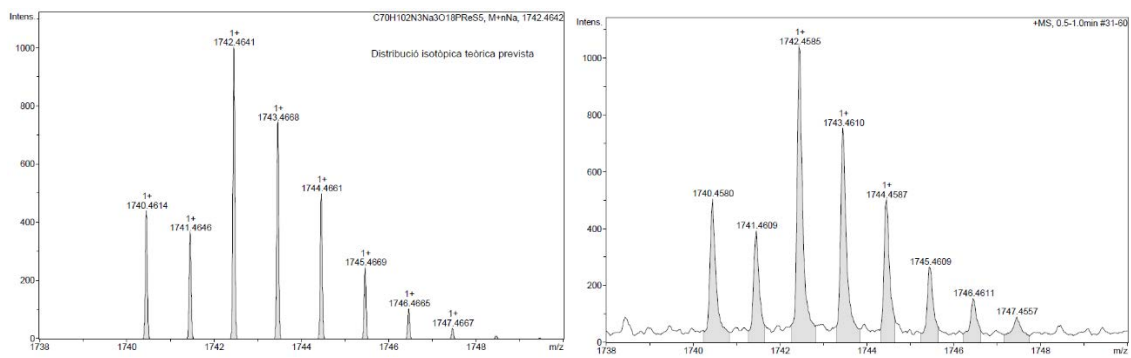


<sup>1</sup>H-RMN (*d*<sub>4</sub>-MeOD-250 MHz)

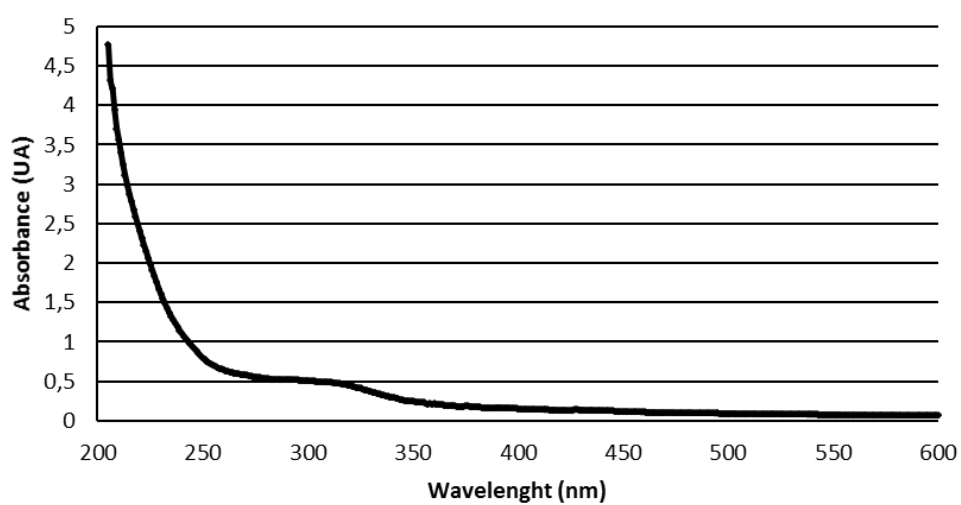


<sup>31</sup>P-RMN (*d*<sub>6</sub>-DMSO-250 MHz)





ESI-RMS (positive mode)

UV-Vis [Re(DtHP)TPPTS] = 50  $\mu$ M