



Facultad de Química, Universidad de la República.
PEDECIBA Química

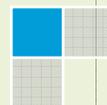
Síntesis de ligandos heterocíclicos como agentes bifuncionales para la marcación con ^{99m}Tc de péptidos para imagen molecular de la expresión del receptor de alfa-MSH

Tesis de Maestría en Química

Lic. María Fernanda García



Diciembre 2012



Tesis de Maestría en Química.

Facultad de Química

PEDECIBA Química

Directores:

*Dr. Williams Porcal, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Química, UdelaR*

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

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

*Laboratorio de Radiofarmacia Centro de Investigaciones
Nucleares. Facultad de Ciencias, UdelaR*

Indice

1	Introducción	6
1.1	Cáncer	7
1.1.1	Incidencia	7
1.1.2	El cáncer como enfermedad genética	8
1.2	La piel	9
1.2.1	Biología del melanocito y la pigmentación de la piel	10
1.2.2	MC1R	11
1.2.2.1	Estructura del MC1R.....	13
1.3	Cáncer de Piel: Melanoma	15
1.3.1	Progresión de Melanoma	17
1.3.2	Factores de Riesgo	18
1.3.3	Detección temprana de melanoma	18
1.3.4	Diagnóstico y clasificación	19
1.3.5	Factores Pronósticos.....	20
1.3.6	Técnicas de imagen en el diagnóstico de melanoma	20
1.4	Imagenología molecular y medicina nuclear	22
1.5	Radiofármacos	24
1.5.1	Radiofármacos peptídicos.....	24
1.5.1.1	Desarrollo del radiotrazador	26
1.5.2	Radiofármacos de Diagnóstico	29
1.5.3	Propiedades del Tecnecio-99m.....	30
1.5.3.1	Radiofármacos de ^{99m} Tc.....	32
1.5.3.2	Estrategias de marcación con ^{99m} Tc.....	32
1.5.4	Agente bifuncional HYNIC.....	34
1.5.5	HYNIC: grupos protectores	37
2	Antecedentes y justificación.....	40
3	Objetivos	47
3.1	Objetivos específicos.....	48
4	Síntesis Orgánica	49

4.1	Metodología experimental: Generalidades	50
4.2	Síntesis de Suc-HYNIC y sus derivados	52
4.2.1	Ácido 6-hidrazinonicotínico (1)	52
4.2.2	Ácido 6- <i>t</i> -(butoxicarbonil)hidrazinonicotínico (2, HYNIC-Boc).....	52
4.2.3	6-(2- <i>t</i> -Butoxicarbonil)hidrazinonicotinato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (3, Suc-HYNIC-Boc).....	53
4.2.4	Clorhidrato de 6-hidrazino nicotinato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (4, Suc-HYNIC)..	54
4.2.5	Ácido 6-(2-trifluoroacetil)hidrazinonicotínico (5, HYNIC-TFA).....	55
4.2.6	6-(2-Trifluoroacetil)hidrazinonicotinato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (6, Suc-HYNIC-TFA).	55
4.2.7	(<i>E</i>)-6-(2-benziliden)hidrazinonicotinato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (7, Suc-HYNIC-hidrazona).....	56
4.3	Síntesis de derivados de <i>N</i> -óxido de piridina	57
4.3.1	<i>N</i> -óxido de ácido 6-cloronicotínico (8).....	57
4.3.2	6-Cloronicotinato de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo (9).....	58
4.3.3	<i>N</i> -butil-6-cloronicotinamida (10)	58
4.3.4	<i>N</i> -óxido de <i>N</i> -butil-6-cloronicotinamida (11).....	59
4.4	Resultados y Discusión	61
4.4.1	Síntesis de Suc-HYNIC y derivados.....	61
4.4.2	Derivados de <i>N</i> -óxido de Piridina.....	72
5	Marcación y evaluación de análogos de α-MSH con ^{99m}Tc	78
5.1	Metodología experimental: Generalidades	79
5.2	Estudio de las condiciones de desprotección de los derivados de HYNIC	80
5.3	Síntesis de análogos de alfa- MSH derivatizados con HYNIC.	80
5.4	Ensayo <i>in vitro</i> de unión competitiva	81
5.5	Marcación con ^{99m}Tc de análogos de α -MSH-HYNIC.....	81
5.5.1	Condiciones de marcación	81
5.5.2	Purificación de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH	82
5.5.3	Coeficiente de partición o Log P	83
5.5.4	Estabilidad <i>in vitro</i>	83
5.5.5	Estudios <i>in vitro</i> de unión	84
5.5.6	Evaluación Biológica <i>in vivo</i>	84
5.6	Resultados.....	87
5.6.1	Estudio de las condiciones de desprotección de los derivados de HYNIC	87

5.6.2	Conjugación de análogos de alfa- MSH con Suc-HYNIC y sus derivados.....	91
5.6.3	Ensayo in vitro de unión competitiva	97
5.6.4	Marcación con ^{99m} Tc de HYNIC-cyc-MSH.....	97
5.6.4.1	Condiciones de marcación.....	97
5.6.4.2	Coeficiente de reparto o log P.....	99
5.6.4.3	Estabilidad <i>in vitro</i>	99
5.6.5.4	Estudios <i>in vitro</i> de unión.....	101
5.6.5.4	Evaluación biológica.....	102
5.7	Discusión	111
6	Conclusiones y perspectivas.....	115
7	Abreviaturas	119
8	Bibliografía	122
9	Agradecimientos	134

1 Introducción

1.1 Cáncer

El cuerpo humano está constituido por diferentes tipos celulares y tejidos. Las células normales crecen, se dividen, maduran y mueren en respuesta a un grupo de señales reguladoras. La estricta regulación de la dinámica celular y de sus funciones, aseguran el reemplazo de células muertas o dañadas, así como la creación de nuevas células en respuesta a las necesidades del organismo.

La palabra cáncer es un término que abarca un grupo diverso de enfermedades caracterizadas por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. En una célula cancerosa una o más señales regulatorias se interrumpen, lo que lleva a una proliferación celular alterada. El cáncer es causado por alteraciones a nivel del ADN que la célula no es capaz de reparar; dicha inestabilidad génica deriva en cambios morfológicos y proliferación celular descontrolada, que lleva a la formación de una creciente masa de células anormales llamada tumor. Los tumores pueden ser clasificados como benignos o malignos. Los tumores benignos son aquellos en los que las células permanecen localizadas. Sin embargo en el caso de los tumores malignos, las células pueden invadir el tejido circundante y diseminarse a otros órganos del cuerpo, formando tumores secundarios, llamados metástasis [1, 2].

Los cambios genéticos que subyacen al proceso de oncogénesis alteran varias propiedades fundamentales de las células, que les permiten evadir los controles de crecimiento normal hasta adquirir un fenotipo maligno. Las células no sólo no requieren señales externas inductoras del crecimiento celular, sino que evaden las señales de restricción celular. El proceso metastásico ocurre en múltiples etapas que requieren que las células cancerosas escapen del tumor primario, sobrevivan en la circulación sanguínea, alcancen un órgano blanco, extravasen el parénquima y continúen así su proliferación. Dicho proceso es el resultado de una interacción dinámica entre las células tumorales y el microambiente que las rodea [3].

1.1.1 Incidencia

El cáncer es una enfermedad causada por múltiples factores, entre los cuales se encuentran el ambiente, los hábitos alimenticios y factores genéticos, entre otros [4]. El cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte en el mundo. Según la American Cancer Society una de cada 8 muertes que ocurren en el mundo es por causa del cáncer, representando la segunda causa de muerte en países desarrollados y la tercera en países en vías de desarrollo [5]. Los países

Latinoamericanos donde se observan las tasas de mortalidad más elevadas son Uruguay, Barbados, Perú, Argentina y Chile. En Sudamérica los tipos de cáncer más frecuentes entre los hombres incluyen cáncer de pulmón, próstata, estómago y colorrectal. En las mujeres encontramos entre los más frecuentes y con mayor tasa de mortalidad, al cáncer de mama, cuello de útero, colorrectal, piel y pulmón [6].

1.1.2 El cáncer como enfermedad genética

El cáncer es en esencia un proceso genético, y el desarrollo del mismo generalmente requiere de varios pasos, cada uno afectado por múltiples factores. Algunos de estos factores son dependientes de la constitución génica del individuo y otras dependientes del entorno y hábitos de vida. Los genes asociados al desarrollo del cáncer se pueden dividir en dos grupos, proto-oncogenes y genes supresores de tumores [7].

Los proto-oncogenes son un grupo de genes que cuando mutan causan que las células normales se vuelvan cancerosas. Las mutaciones en los proto-oncogenes son típicamente dominantes, y la versión mutada del proto-oncogen se denomina oncogen. La mayoría son genes altamente conservados desde un punto de vista evolutivo, y están vinculados a funciones normales básicas de las células. Generalmente, los proto-oncogenes codifican proteínas que estimulan la división celular, inhiben la diferenciación celular y detienen la muerte celular. Los oncogenes frecuentemente presentan un aumento en la producción de dichas proteínas llevando a un incremento de la división celular, disminución de la diferenciación celular e inhibición de la muerte celular, todas estas características del fenotipo celular tumoral [8, 9].

Los genes supresores de tumores, están involucrados en el control del crecimiento celular, limitando el crecimiento y división celular inapropiada. Mutaciones en este tipo de genes, lleva a la pérdida o disminución de su función aumentando la susceptibilidad de desarrollar cáncer.

Otro grupo de genes que cuando son afectados contribuyen a la progresión del cáncer son los genes de reparación del ADN. Una inactivación de dichos genes lleva a un aumento en la tasa de mutaciones [10].

1.2 La piel

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. Esta constituida por tres capas: epidermis, dermis, e hipodermis (Figura 1.1).

La epidermis es la capa más superficial del cuerpo humano. El grosor de la epidermis varía desde 0,07 a 1,4 mm en palmas y plantas de los pies. Está formada por dos grupos principales de células, los queratinocitos y las células dendríticas. Los queratinocitos son las células más abundantes de la epidermis, se renuevan continuamente por mitosis desde la capa basal y sufren un desplazamiento hacia la superficie del epitelio por proliferación de las células de la capa basal. En su tránsito, los queratinocitos, pierden su núcleo y acumulan filamentos de queratina en su citoplasma. Los cambios estructurales que sufren los queratinocitos permiten la distinción de una organización estratificada del epitelio, a partir de lo cual se pueden distinguir el estrato basal, espinoso, granuloso y córneo [11].

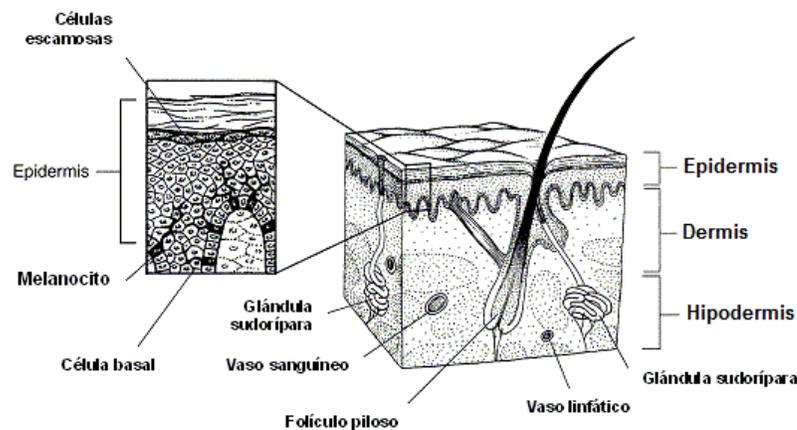


Figura 1.1: Estructura de la piel. El cuadro ampliado muestra un esquema de la unidad epidérmica de melanina. (Fuente: www.cancer.org)

La epidermis contiene dos grupos de células dendríticas, las células de Langerhans y los melanocitos. Las células de Langerhans se localizan en la piel en las capas superiores del estrato espinoso y ocasionalmente en la dermis. Una de las funciones principales de las células de Langerhans es la presentación de antígenos, por lo que estas células juegan un rol fundamental en la inmunidad de la piel. Los melanocitos, a diferencia de las células de Langerhans, se localizan

en la capa basal de la epidermis, en el folículo piloso, ojos, oído y meninges. Presentan en su interior unos organelos denominados melanosomas; responsables de la síntesis, almacenamiento y transporte del pigmento melanina.

Alrededor de un melanocito se agrupan aproximadamente unos 36 queratinocitos, que a través de las E-cadherinas conforman la unidad epidérmica de melanina [12]. Proyecciones dendríticas de los melanocitos permiten el paso de melanina a los queratinocitos basales, resultando en la pigmentación de la piel (Figura 1.1) [13]. Así, la acumulación de los melanosomas sobre el núcleo de la célula de los queratinocitos en proliferación, protegen el ADN nuclear del daño causado por la ionización o radiación que provocan los rayos ultravioleta del sol [14, 15]. Factores de crecimiento producidos por los queratinocitos, tales como: factor de crecimiento de fibroblastos básico, endotelina-1 y hormona estimulante de los melanocitos, se unen a sus receptores en los melanocitos y favorecen la supervivencia de los mismos, y la formación de dendritas para aumentar el paso de melanosomas a los queratinocitos.

1.2.1 Biología del melanocito y la pigmentación de la piel

La principal función del melanocito epidérmico es la producción del pigmento melanina. En la síntesis de melanina el aminoácido tirosina es modificado por la enzima tirosinasa a DOPA y ésta, a su vez es oxidada a DOPA quinona. A partir de este precursor pueden ser sintetizados dos tipos de melanina, las eumelaninas (pardo-negruzcas) y las feomelaninas (pardo-rojizas), éstas últimas por adición de cisteínas, y las eumelaninas por polimerización de quinonas.

Bajo condiciones fisiológicas la síntesis, almacenamiento y transporte de melanina en el melanocito, es realizada por el melanosoma. Los melanosomas son organelos grandes (500 nm) y su estructura se correlaciona con el tipo de melanina que producen, si generan eumelanina son elípticos y contienen una matriz fibrilar y si producen feomelanina son redondeados y con matriz globular. Los melanosomas se originan a partir de precursores endosomales que luego atraviesan por una serie de etapas de maduración [16]. El desarrollo del melanosoma involucra 4 etapas distinguibles por microscopía electrónica, que van desde una etapa I con pre-melanosomas no pigmentados, una estriación (II), deposición de melanina (III), hasta completa melanización (IV). Finalmente los melanosomas son transportados por las dendritas del melanocito hacia los queratinocitos circundantes [17].

La pigmentación basal de la piel depende del tipo, número y tamaño de los melanosomas transferidos a los queratinocitos, lo cual es determinado genéticamente. Sin embargo, los melanocitos de la piel también pueden mostrar la capacidad de adaptar sus capacidades melanogénicas a un número de estímulos extracelulares, generadas por el organismo como factores parácrinos y endócrinos, o por el ambiente externo, como la radiación ultravioleta. Por ejemplo, la regulación de la síntesis de melanina, en particular eumelanina, es estimulada en primer lugar por radiación ultravioleta, lo que genera fotoproductos de ADN que llevan a la liberación de factores autócrinos y parácrinos.

1.2.2 MC1R

Se han identificado más de 100 locus involucrados en la pigmentación de la piel, siendo el receptor de la melanocortina 1 o MC1R uno de los principales. El MC1R humano es un receptor transmembrana, que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G o GPCR, también conocidos como receptores transmembrana de siete dominios. En los mamíferos está relacionado, por las características de su secuencia y de unión a ligando, a cuatro receptores adicionales de melanocortinas (MC2R a MC5R), caracterizados cada uno de ellos por diferentes patrones de expresión y funciones fisiológicas [18, 19, 20]. MC1R se expresa principalmente en los melanocitos, a pesar de que se ha detectado en varios tipos de células adicionales, incluyendo las células del sistema inmunológico, lo que sugiere que podría estar implicado en efectos antiinflamatorios [21].

La activación de la vía de MC1R por unión de un ligando agonista, resulta en una cascada de señalización AMP cíclico dependiente que estimula la expresión del factor de transcripción MITF (Figura 1.2). Dicho factor es considerado el principal regulador del melanocito y de la melanogénesis, ya que activa una variedad de genes relacionados con la supervivencia del melanocito y activando la enzima tirosinasa TRP-1, enzima clave en la biosíntesis de melanina. [22] Los ligando agonistas del MC1R incluyen la hormona alfa-melanocito estimulante o α -MSH que es secretada por los queratinocitos y la hormona adrenocorticotrópica o ACTH. Por otra parte, la proteína de señalización agouti o *Asip* presenta una acción antagonista del MC1R [23].

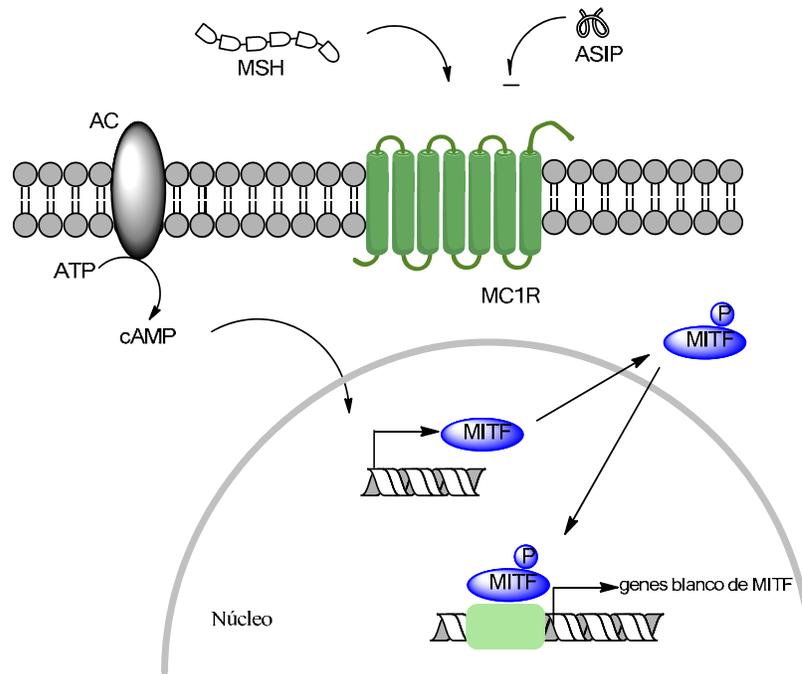


Figura 1.2: Esquema de la vía de señalización mediada por MC1R. EL MC1R presente en la membrana plasmática de los melanocitos es activado por melanocortinas en particular α -MSH. La activación de MC1R lleva a un aumento del nivel de cAMP vía adenilato ciclasa, que induce la expresión MITF. La síntesis de MITF y su transporte al núcleo regulan los genes requeridos para la melanogénesis [22, 23].

Si bien la actividad basal del MC1R se mantiene por la secreción de ligandos agonistas autócrinos o parácrinos, y/o por actividad constitutiva del receptor; los UVR representan el principal estímulo ambiental que conduce a la activación intensa del MC1R en los melanocitos, impulsado principalmente por la secreción de α -MSH por los queratinocitos [24, 25]. Como resultado, el MC1R aumenta la cantidad de eumelanina contenida en la piel y produciendo bronceado, que funciona como un filtro solar leve, protegiendo la piel del daño solar y el cáncer. Reduce también la generación especies reactivas del oxígeno y mejora los mecanismos de reparación del ADN en los melanocitos, manteniendo así su estabilidad genómica y de prevención de la transformación maligna de melanoma [26, 27].

Extensos estudios genéticos y funcionales en los seres humanos y en ratones han revelado que MC1R es un determinante importante no sólo de la pigmentación constitutiva en los mamíferos, sino también, de la pigmentación adquirida (como el curtido) y la sensibilidad UV en los seres humanos. Variantes polimórficas naturales de MC1R han sido asociadas con el fenotipo de cabello rojizo y piel clara [28], que se caracteriza por la incapacidad de bronceado y tendencia a

quemaduras ante la exposición a radiación UV. Así como también se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de piel inducido por UV, en particular, melanoma [29].

1.2.2.1 Estructura del MC1R

Las GPCRs son resistentes a la cristalización, por lo tanto la información estructural MCRs surge de modelados a partir de análisis de múltiples secuencias y microscopía electrónica de baja resolución de la estructura de bacteriorhodopsin y la estructura cristalina de la rodopsina [30]. MC1R es una proteína integral de membrana de 317 aminoácidos en el hombre y 315 aminoácidos en el ratón, con las características estructurales de los GPCRs, es decir, un dominio extracelular N-terminal, siete dominios transmembrana (TM), y un fragmento intracelular C-terminal (Figura 1.3). Algunos trabajos señalan que el MC1R parece experimentar dimerización constitutiva como parte de su estructura cuaternaria [31]. Variantes naturales de MC1R son capaces de formar homodímeros, y heterodímeros con la variante proteica de tipo salvaje, lo que tiene amplia gama de consecuencias funcionales incluyendo la modulación de propiedades farmacológicas tales como la afinidad de los ligandos y entre otras la eficacia de la señalización [20].

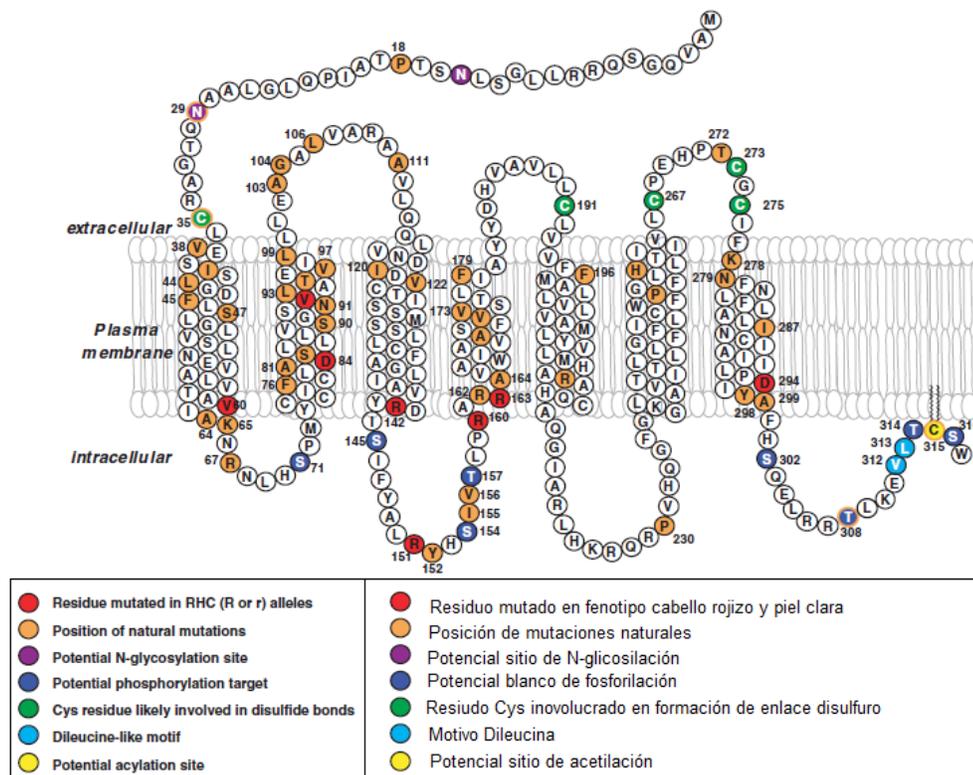


Figura 1.3: Estructura del MC1R. Adaptado de García Borrón, 2005 [20].

Dominio N-terminal

MC1R pertenece a una clase de proteínas de membrana que utilizan el primer dominio TM como una señal de anclaje no escindible, y que dirige el tráfico de la proteína hacia la membrana citoplasmática [32]. Una mutación a nivel de la Ser6 a Ala causa una disminución significativa de la afinidad para agonistas radiomarcados [33]. Un residuo de Cys cerca del límite de la región N-terminal y el dominio TM1, se conserva en todos MCRs y es necesario para la integridad estructural, ya que su mutación a Gly [34] o Ala [31] inactiva el receptor. Una probable explicación es su participación en la formación de un enlace disulfuro intramolecular con una Cys situada en el tercer bucle extracelular o, alternativamente, contribuir a la dimerización de receptores.

Bucles extracelulares

Los bucles extracelulares de MC1R son pequeños. El tercer bucle de los MCR está excepcionalmente conservado en comparación con la mayoría de los GPCR. Es rica en Pro y residuos Cys. Mutaciones de los residuos Glu269 y Thr272 a Ala, disminuye la afinidad de la unión de sus agonistas, lo que sugiere la participación de estos residuos en el reconocimiento de los ligandos [33]. La pérdida del enlace disulfuro intramolecular entre Cys267 y Cys275 suprime la función del receptor [34], lo que sugiere una función estructural importante, manteniendo unidos los dominios TM 6 y 7.

Bucles intracelulares

Los bucles intracelulares de los GPCR proporcionan las interfaces de unión para las proteínas relacionadas con señalización intracelular. Seis mutaciones a nivel del segundo bucle intracelular de MC1R, ocurren naturalmente en el ser humano, al menos cuatro de estos variantes son formas producen pérdida de función total o parcial, lo que subraya la importancia de esta región para la función MC1R. Otro elemento crítico para la función del receptor es el tripéptido ¹⁴¹DRY¹⁴³, característico de los receptores de la clase, y que se encuentra en la interfaz entre dominio transmembrana 3 y segundo bucle [35].

Dominios transmembrana

Para las GPCRs clase A, el sitio de unión al ligando consiste en una región formada por la contribución de varios fragmentos de TM. Modelos tridimensionales sugieren la existencia de una región altamente cargada que contiene Glu94 (TM2), Asp117 y Asp121 (TM3), e interactúa

con los residuos de Arg en la His-Phe-Arg-Trp (HFRW) farmacóforo presente en las melanocortinas [30, 36]. Un modelo de activación del receptor propone que la presencia de la carga positiva modificaría la conformación de TM2 y TM3, y el movimiento de TM3 efectuaría una alteración de la estructura de segundo bucle. La nueva conformación de esta región, que contiene la secuencia peptídica conservada DRY y otros residuos, permitiría un acople funcional con la proteína Gs [37].

Otro sitio de interacción con el ligando está formado por una serie de residuos aromáticos, situados cerca de la parte extracelular de los dominios TM4, 5 y 6, que también contribuyen a la unión por el ligando interactuando con los residuos aromáticos del farmacóforo [38].

Extremo C-terminal

La cola citosólica C-terminal de la MC1R contiene 19 aminoácidos, de los cuales seis son conservados en los MCRs. Dentro de GPCRs, este es un dominio involucrado en: (i) interacción del complejo ligando-receptor con proteína G (ii) disposición correcta del receptor y disponibilidad en la membrana plasmática (iii) señales de tráfico intracelular de la proteína. Además, esta región contiene a menudo Ser y Thr residuos cuya fosforilación media la internalización del receptor [20].

1.3 Cáncer de Piel: Melanoma

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel, desarrollando tumores con gran capacidad metastásica. Si bien es la forma menos frecuente de cáncer de piel (5 %), da cuenta del 75 % muertes por cáncer de piel [39]. El melanoma es una enfermedad que surge de la transformación maligna de un tipo celular, el melanocito. Los melanocitos se localizan predominantemente en la piel, pero también se lo puede encontrar en la retina, tracto gastrointestinal, leptomeninges y mucosas.

Su estudio ha cobrado particular interés en las últimas décadas debido a un aumento notorio en su incidencia y mortalidad en países como Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda. En Estados Unidos el riesgo acumulado de desarrollar melanoma a lo largo de la vida pasó de 1 cada 1500 en el año 1935 a 1 cada 74 en el 2000, y ocupa el quinto lugar en la incidencia de cáncer en hombres y el sexto lugar en mujeres, siendo, en cada sexo, responsable de 4% del total de los tumores

malignos [40, 41]. El impacto de esta enfermedad puede evidenciarse con los datos difundidos por la International Agency of Cancer Research, en los cuales los mayores registros de incidencia de melanoma se observan en Queensland Australia, con una tasa de 55.8 casos por 10^5 en hombres y 41.1 casos por 10^5 en mujeres [42].

En Uruguay la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, ha registrado una incidencia de melanoma para el periodo 2002-2006, de 4.52 casos en hombres y 3.49 en mujeres (por cada 100.000 habitantes), presentando un promedio anual de mortalidad de 87 fallecimientos (1.9 casos en hombres y 0.89 en mujeres por 100.000 habitantes) en el periodo 2004-2008 [43, 44]. Globocan 2008 ubica a El Salvador, Honduras, Argentina y Uruguay entre los países con mayor incidencia en melanoma de América Latina (figura 1.4).

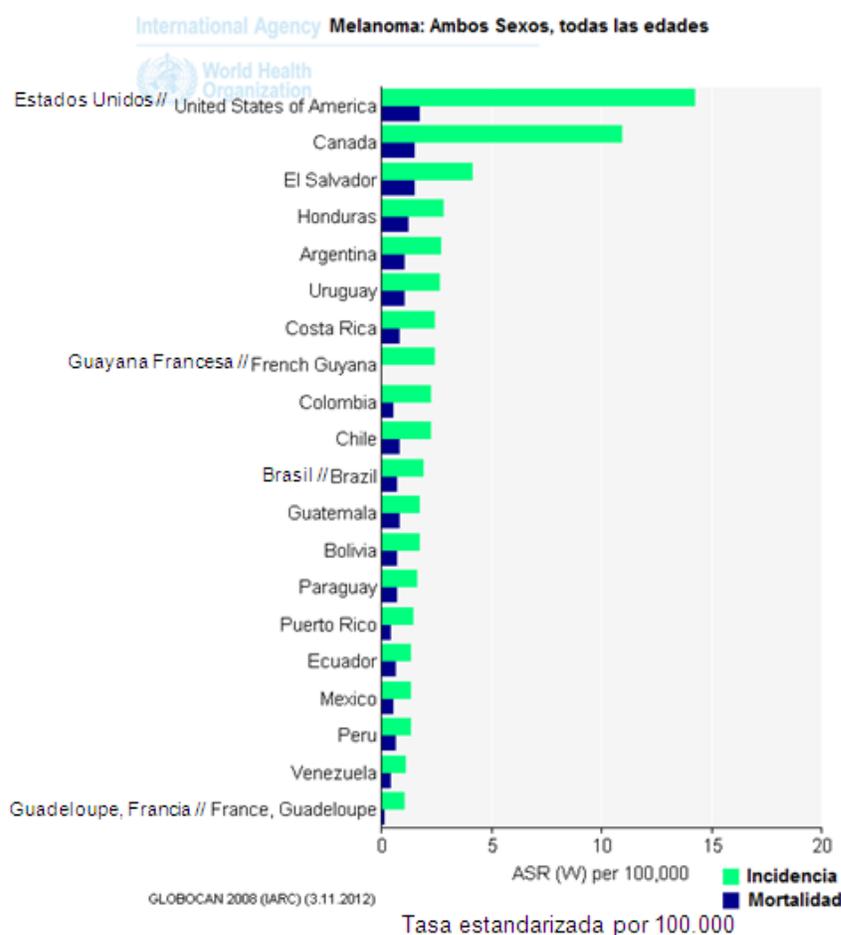


Figura 1.4: Melanoma, incidencia y mortalidad en las Américas. (Adaptado de Globocan 2008)

La causa en el aumento de incidencia se cree está relacionado en parte por una mejora en los métodos de detección, y por un aumento en la exposición a la radiación ultravioleta solar. El pronóstico de la enfermedad está muy relacionado con el grado de avance de la enfermedad al momento de su detección.

1.3.1 Progresión de Melanoma

Aunque la patogénesis del melanoma es compleja, es probable que implique interacciones entre los factores ambientales, la acumulación de alteraciones genéticas secuenciales, la activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores, y alteración del sistema de reparación de ADN. Tres pasos se han propuesto en la progresión tumoral del melanoma maligno. En un tumor en estadio temprano, el melanoma puede ser confinado a la epidermis y solo mostrar un crecimiento radial (o lateral) del crecimiento. Cuando el melanoma progresa, se puede convertir en melanoma microinvasor, en la que las extensiones microscópicas invaden la dermis papilar superficial. Melanomas más avanzados pueden progresar a la fase de crecimiento vertical, que se caracteriza por el crecimiento invasivo con participación discernible profundamente en la dermis (Figura 1.5) [45, 46].

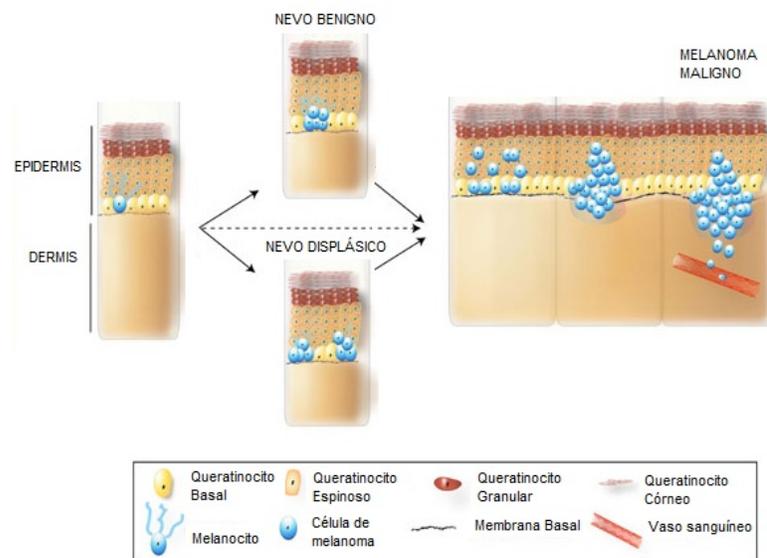


Figura 1.5: Progresión del melanoma maligno. (Fuente: J Lomas, 2008)

1.3.2 Factores de Riesgo

La transformación de los melanocitos a las células tumorales se produce tanto en pacientes genéticamente predispuestos y normales. Se estima que aproximadamente entre un 5 - 10% de los casos de melanoma presentan una predisposición genética debida a la transmisión de un gen de susceptibilidad. Los principales genes identificados son el gen supresor de tumor denominado p16 (CDKN2A) y el oncogen CDK4. Ambos genes relacionados con el control del ciclo celular, siendo p16 el más frecuentemente implicado (25% de los casos) [47, 48]. En Uruguay, un estudio de susceptibilidad hereditaria en 14 familias uruguayas con historia de melanoma familiar, confirma mutaciones a nivel de CDKN2A [49]. Sin embargo, variaciones en genes de gran prevalencia y baja penetrancia, como el MC1R (conocidas como variantes de cabello pelirrojo), podrían ser de mayor importancia en determinar la susceptibilidad de la población general [50]

La lista de factores fenotípicos relacionados con el desarrollo de melanoma es larga. Algunos de ellos son individuos de piel muy blanca, de cabello rubio o pelirrojo, con pecas, lunares y lunares displásicos, presentan incapacidad de broncearse y sufren quemaduras ante la exposición solar.

Se estima que un 65% de los melanomas son relacionados con la exposición solar, tanto así que el reciente aumento de las tasas de incidencia ha sido atribuido parcialmente al incremento de la cantidad de luz solar (rayos UV-B de 290-315 nm de longitud de onda) que alcanza la superficie del planeta, como consecuencia posiblemente de la alteraciones de los niveles de ozono atmosférico. Un estudio reciente ha comprobado que la exposición a radiación UV artificial, también aumenta el riesgo de padecer melanoma [51].

Otros factores de riesgo incluyen, padecimiento Xeroderma Pigmentoso, inmunosupresión, exposiciones químicas, etc.

1.3.3 Detección temprana de melanoma

El diagnóstico del melanoma depende en primer lugar de la detección de la lesión a nivel de la piel y de la confirmación patológica mediante la realización de una biopsia de piel. La detección inicial muchas veces surge del propio paciente que consulta a su médico por notar lesiones pigmentadas en la piel, y otras veces por la detección a nivel de atención primaria, que al notarlo deriva al paciente a un dermatólogo. La mayoría de las personas tienen lunares (nevus), y casi todos son inofensivos. La señal más importante para detectar el melanoma es identificar algún

lunar nuevo en la piel o uno existente, que haya cambiado en tamaño, forma o color. Una guía para distinguir entre un lunar normal y uno que no lo sea, es la observación de las siguientes características: lunares que presentan asimetría, borde irregular, más de dos colores, diámetro mayor a 5 mm y evolución en el tiempo (Figura 1.6). Otras señales de advertencia son la inflamación, sangrado y cambio de sensibilidad [52].

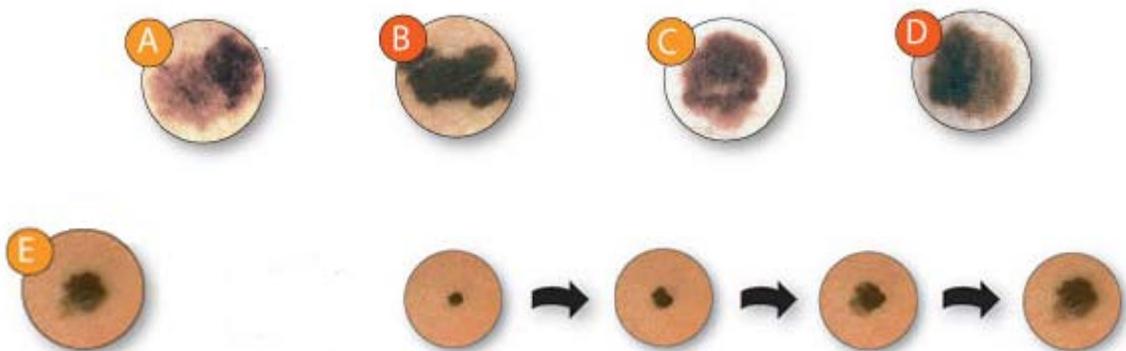


Figura 1.6: Criterios para la detección temprana de melanoma cutáneo. (Fuente: The American Academy of Dermatology)

1.3.4 Diagnóstico y clasificación

El diagnóstico por un especialista dermatólogo, buscará la identificación de la lesión, confirmación histopatológica y estadificación de la enfermedad, con el fin de abordar el tratamiento. Históricamente una clasificación histopatológica divide a los melanoma según el grado de invasión en 4 grupos principalmente: melanoma con diseminación superficial, melanoma nodular, lentigo maligno melanoma y lentiginosis acral [53].

Una vez confirmado el melanoma se aplican otros criterios de clasificación. El sistema TNM (T: tamaño del tumor ; N: afectación o no de los ganglios linfáticos regionales ; M: presencia o no de metástasis a distancia), por ejemplo, es un sistema de estadificación que permite clasificar la progresión del cáncer. Con este fin utiliza el tamaño y la extensión del tumor primario, grado de afectación linfática, y la presencia de metástasis. Criterios aprobados internacionalmente [54] establecen la siguiente clasificación: estadio I y II, se compone de los pacientes sin metástasis regionales o distantes. En el estadio III, los pacientes tienen metástasis ya sea en los ganglios

linfáticos regionales o en los sitios intralinfáticos. Por último el estadio IV, los pacientes tienen metástasis viscerales.

Un sistema de clasificación más reciente, agrupa a los melanomas en subtipos según las características moleculares de los distintos melanomas. La clasificación molecular de la enfermedad permite guiar acciones terapéuticas específicas de acuerdo al tipo de tumor [55].

1.3.5 Factores Pronósticos

El pronóstico del melanoma está muy relacionado con el grado de avance de la enfermedad al momento de su detección. El espesor tumoral, la ulceración y el índice mitótico, son importantes indicadores de la supervivencia en aquellos con enfermedad menos avanzada. Por ejemplo, pacientes con un estadio IA, con lesión menor de 1 mm de grosor, sin ulceración tienen una supervivencia de 93 % a los 10 años. Los pacientes con enfermedad en estadio IIC (es decir, lesión de más de 4 mm de espesor con ulceración) tienen una supervivencia de 53% a los 5 años y un 39 % a 10 años. Pacientes con un estadio IIIA, lesión de cualquier grosor, sin ulceración, con metástasis microscópica) tienen un 70% a los 5 años la tasa de supervivencia, mientras que un estadio IIIC, con metástasis y ganglios linfáticos afectados tienen un 33% de supervivencia a los 5 años. En los pacientes con estadio IV de la enfermedad, el sitio de la metástasis y el nivel de lactato deshidrogenasa son los factores pronósticos más importantes. Los pacientes que tienen metástasis en la piel o en los sitios distantes se clasifican en el grupo M1a. Estos pacientes tienen una tasa de supervivencia al año de 62%. Los pacientes con metástasis en los pulmones se clasifican en el grupo M1b y tienen una supervivencia del 53% al año, mientras que aquellos con metástasis en sitios viscerales tienen peor pronóstico con una tasa de supervivencia del 33% al año. Dos niveles elevados de lactato deshidrogenasa en 24 h, clasifican a un estadio IV en el grupo M1c independientemente del sitio de metástasis [56, 57].

1.3.6 Técnicas de imagen en el diagnóstico de melanoma

En vista de la relación existente entre el grado de avance y la expectativa de vida, la identificación precoz y resección del melanoma primario ofrecen las mejores posibilidades de cura, mientras que el melanoma metastásico es casi siempre fatal.

En dermatología, una de las herramientas de diagnóstico más utilizadas para la identificación de alteraciones pigmentadas es la dermatoscopia. Es una técnica de diagnóstico por imagen no

invasiva aplicada a las lesiones de la piel, fundamentalmente tumores cutáneos pigmentados, que permite la observación de una serie de parámetros en cada lesión que traducen una estructura histopatológica. Una vez identificada la lesión el diagnóstico es confirmado mediante una biopsia y su estudio histopatológico.

Una caracterización más extensa comprende biopsia del ganglio centinela, así como distintas técnicas de imagen en busca de sitios de metástasis. Cuando la vía linfática es invadida por el tumor la gravedad de la enfermedad aumenta, esto hace que el estudio de las vías y ganglios linfáticos sea de gran importancia. Históricamente, la forma de evaluar los ganglios linfáticos de una región del cuerpo era removerlos todos con cirugía y examinarlos microscópicamente. La evaluación de los ganglios vecinos experimentó un gran progreso con la "técnica del ganglio centinela". La misma consiste en una inyección subdérmica o intradérmica de una sustancia de contraste (colorante y/o material radiactivo) en la vecindad del melanoma. Luego, se busca con un método de detección externa, cuál es el grupo ganglionar que recibe la linfa procedente del tumor, y así identificar el o los ganglios a remover con cirugía mínima radioguiada (en el caso de uso de n radiotrazador). Este ganglio llamado "centinela" es analizado microscópicamente: si se halla comprometido por tumor, se sigue adelante y se remueven los ganglios de esa región anatómica "vaciamiento ganglionar". Si el ganglio centinela se halla libre de melanoma, se presupone que el resto de los ganglios en esa región también estará libre de metástasis, y no se requiere extender la cirugía. En Uruguay la técnica de linfocentellografía para la detección de melanoma maligno fue desarrollada en 1984, utilizando como radiotrazadores ^{99m}Tc -coloide de Azufre y de Renio [58]. Posteriormente en nuestro medio, en el año 1996, se propuso y desarrolló la evaluación centellográfica en pacientes con melanoma utilizando un radiocoloide de uso habitual en perfusión miocárdica, el ^{99m}Tc -MIBI [59]. Debido a su alto valor pronóstico, la detección del ganglio centinela con linfocentellografía y las biopsias radioguiadas son procedimientos utilizados de rutina en melanoma cutáneo [60, 61].

El uso reciente del radiofármaco ^{18}F FDG (2-Desoxi-2-fluoro-D-glucosa), un análogo de glucosa, en PET-CT es un método bien aceptado para el diagnóstico oncológico. Sin embargo, la sensibilidad de dicha técnica para el diagnóstico de melanoma en estadios iniciales es de un 30% [62]. En estadios III y IV, es una modalidad útil, en particular para ayudar a detectar metástasis en tejidos blandos, ganglios linfáticos y metástasis viscerales [63]. Sin embargo, resultados falsos negativos se han informado en lesiones pequeñas con un diámetro $> 0.3\text{-}0.5$ cm, por ejemplo,

metástasis subcutánea [64] o metástasis de pulmón [63], además de resultados falsos positivos en presencia de lesiones inflamatorias [65].

Es así que sería deseable el desarrollo de nuevas modalidades de imágenes moleculares específicas, adaptadas para la evaluación *in vivo* y no invasiva de pacientes con melanoma en el diagnóstico de extensión lesional y monitoreo terapéutico.

1.4 Imagenología molecular y medicina nuclear

La imagen molecular comprende la visualización, la caracterización y medición de los procesos biológicos a nivel molecular y celular, en seres humanos y en otros organismos vivos. Para ello genera imágenes en dos o tres dimensiones. Las técnicas utilizadas incluyen imágenes obtenidas mediante el empleo de radiotrazadores, resonancia magnética nuclear, imágenes ópticas, ultrasonido y otras [66].

Uno de los grandes campos de aplicación de las imágenes moleculares es la oncología. La imagenología molecular combina métodos de imagen no invasiva, con herramientas de biología molecular y celular. Inicialmente, la imagenología en medicina nuclear se basaba en una visualización estructural y anatómica. Más adelante, avances en biología molecular, medicina nuclear y radiofarmacia, entre otras disciplinas, hicieron posible visualizar procesos celulares y bioquímicos. Actualmente, la búsqueda de nuevos radiotrazadores, se basa en la búsqueda de moléculas dirigidas específicamente a blancos o marcadores moleculares, que permitan la caracterización del tejido *in vivo*.

Las técnicas de imagenología molecular PET y SPECT son modalidades de imagen que utilizan moléculas marcadas radioactivamente y que se distribuyen en el organismo luego de su administración. Las imágenes son formadas por detección externa de la radiación emitida.

La cámara gamma es un dispositivo de captura de imágenes que consta de un equipo de detección de radiación gamma. A partir de varias proyecciones o cortes bidimensionales se puede realizar una reconstrucción tridimensional que es lo que se denomina un SPECT. Para el uso de centellografía gamma y SPECT, las moléculas son marcadas con radionucleidos emisores gamma puros (Figura 1.7).

En el caso de PET la molécula es marcada con un radionucleido emisor de positrones, los que por aniquilación producen 2 fotones en direcciones opuestas de 511 KeV. Los detectores de un tomógrafo PET están dispuestos en anillo alrededor del paciente, la detección en coincidencia de los fotones generados en cada aniquilación permiten la construcción de la imagen (Figura 1.8).



Figura 1.7: Esquema del proceso de adquisición de una imagen SPECT

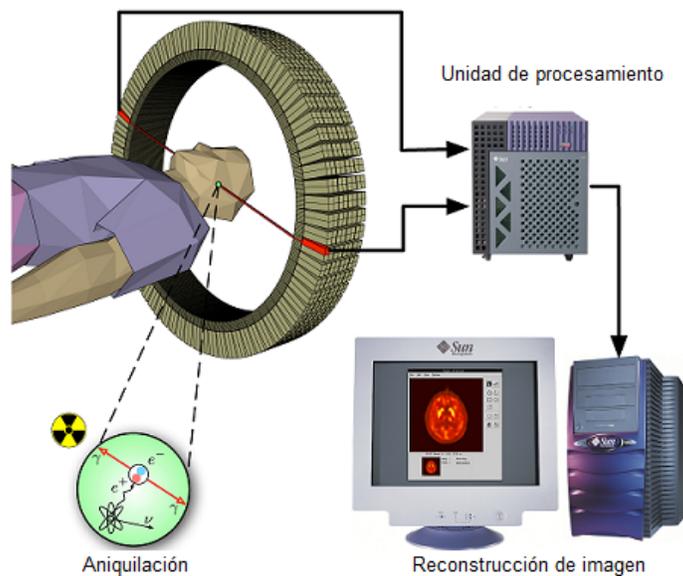


Figura 1.8: Esquema del proceso de adquisición de una imagen PET

En la medicina clínica es tan importante conocer la fisiología, como la morfología en condiciones normales y patológicas. Técnicas como la CT y la RM, que han sido determinantes para el diagnóstico morfológico. Es así que la imagen molecular tiende a la fusión de técnicas como la TC y la RM, junto con el PET y SPECT, combinando la información funcional con la anatómica [67].

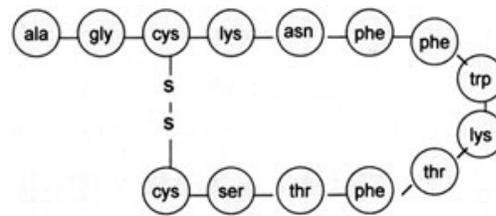
1.5 Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura, y que por su forma farmacéutica y tipo de radiación, es apto para ser administrado en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia en medicina nuclear. La gran mayoría son moléculas orgánicas e inorgánicas de composición definida, y son administrados por vía venosa. También pueden ser macromoléculas marcadas radioactivamente, como anticuerpos monoclonales o sus fragmentos.

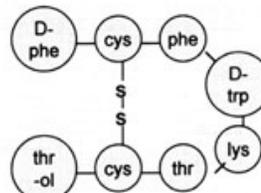
1.5.1 Radiofármacos peptídicos

El uso de radiopéptidos en oncología nuclear, es un paso importante en el camino hacia la imagenología molecular. Los péptidos son moléculas de gran importancia biológica debido a su participación en gran parte de los procesos fisiológicos. Están involucrados en el control y modulación de la función celular, comunicación inter-celular, así como también son claves en la activación o supresión de vías de señalización intracelular mediante interacciones no covalentes con proteínas receptoras. Si bien existen algunos péptidos nativos que se utilizan actualmente como drogas (insulina, calcitonina y oxitocina), los agentes peptídicos con aplicación terapéutica generalmente son análogos peptídicos que mimetizan el ligando nativo, es decir que su farmacóforo imita al del péptido nativo en el espacio tridimensional y que retiene la capacidad de interactuar con su diana biológica, y producir un efecto biológico agonista o antagonista [68].

Los radiopéptidos son herramientas atractivas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer debido a que una variedad de tumores sobreexpresan receptores para péptidos reguladores u hormonas peptídicas. Los mejores ejemplos que ilustran estos conceptos son los análogos de somatostatina radiomarcados, que actualmente se emplean en la clínica para el diagnóstico y terapia de tumores que sobreexpresan receptores de somatostatina (Figura 1.9) [69, 70]



Somatostatina Humana



Octreotide

Figura 1.9: Ejemplo de análogo de la somatostatina humana

Los radiopéptidos presentan algunas ventajas respecto de los anticuerpos radiomarcados. Por ejemplo, tienen menor respuesta inmunogénica, rápida distribución y gran especificidad por su blanco molecular. Además pueden ser sintetizados, modificados específicamente de forma de aumentar su estabilidad y propiedades farmacocinéticas, sin las limitaciones impuestas por los sistemas de producción biológicos. Los péptidos al eliminarse más rápido de la circulación que los anticuerpos (elevado peso molecular), logran relaciones de captación blanco/no blanco mayores. Cuando se comparan con moléculas pequeñas los péptidos presentan elevada especificidad y mayor afinidad, baja acumulación en órganos, baja toxicidad y una mayor tolerancia a las modificaciones químicas sin perder afinidad por su blanco. Sin embargo los fármacos peptídicos presentan algunas desventajas como ser su baja estabilidad metabólica consecuencia de la rápida degradación por peptidasas. Esto origina efectos biológicos de corta duración y baja biodisponibilidad oral por lo que deben ser administrados de manera subcutánea o por vía intravenosa [71, 72].

Existen algunos requisitos para el uso de péptidos como radiofármacos, en primer término es conveniente que el receptor o molécula blanco se encuentre sobre-expresado o tenga expresión única para la enfermedad. El radioligando debe retener la afinidad y en el caso de aplicaciones radioterapéuticas su internalización es necesaria para lograr mayores tiempos de residencia. Otro

aspecto importante a tener en cuenta es la estabilidad metabólica, no solo de la secuencia peptídica sino también del péptido radioconjugado [73].

1.5.1.1 Desarrollo del radiotrazador

Un radiopéptido específicamente dirigido está constituido por un péptido biológicamente activo acoplado a un agente quelante bifuncional o AQB, en el caso de radiometales, o a un grupo próstetico en el caso de la incorporación de halógenos radioactivos como el fluor o yodo. La biomolécula funciona como transportadora del radionucleido al sitio donde se ubica el blanco molecular específico (Figura 1.10). Su localización está basada en interacciones con su receptor específico, y son principalmente, sus propiedades químicas las que condicionan la ruta metabólica del radiofármaco dentro del organismo. Un agente quelante es una molécula que puede ser unida covalentemente a la molécula vector y que también es capaz de quelar al radiometal, la elección del mismo queda determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radiometal. La elección del radioisótopo depende de las aplicaciones médicas que se pretenden para el radiofármaco. La ventaja principal de esta estrategia es la posibilidad de conservar la afinidad del péptido por su receptor mediante un cuidadoso diseño e incorporación del radionucleido.

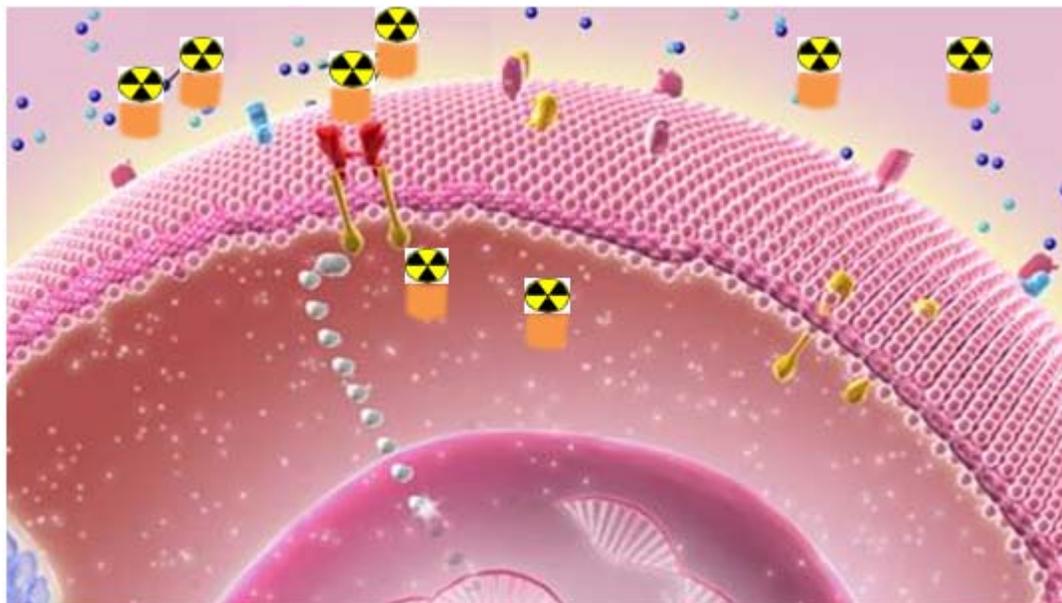


Figura 1.10: Agente de imagen molecular

Entonces, el paso inicial en el desarrollo de un radiofármaco peptídico, una vez definido el blanco molecular, comienza con el hallazgo o diseño de la molécula biológicamente activa. Esta etapa del proceso puede ser abordada mediante distintas estrategias de síntesis [74]:

- (a) Diseño racional de la biomolécula peptídica: donde ya se conoce la estructura del ligando o donde se tiene conocimiento de la estructura del receptor o su sitio de unión. En base a información estructural del sitio de unión es posible seleccionar aquellos compuestos cuya interacción sea más probable, para luego ser sintetizado y evaluado en ensayos biológicos
- (b) Química combinatoria: involucra la síntesis rápida de un gran número de moléculas diferentes, pero estructuralmente relacionados. Se basa en reacciones de moléculas orgánicas sencillas, con puntos de diversidad y su unión sistemática en todas las combinaciones posibles.
- (c) Librería de fagos: consiste en la selección de péptidos sin necesidad de un conocimiento estructural del receptor o blanco. Las secuencias peptídicas son seleccionadas de una gran población de fagos que exponen este tipo de moléculas en su superficie. El procedimiento de selección consiste en unir los fagos a una diana de interés inmovilizada. Los fagos no adheridos son eliminados con varios lavados y posteriormente los fagos unidos son seleccionados.

Una vez identificada la secuencia peptídica de reconocimiento, distintas estrategias permiten mejorar la afinidad, estabilidad metabólica y farmacocinética del precursor.

1.5.1.1.1 Optimización de la afinidad

Una estrategia puede ser la modificación del compuesto inicial mediante sustituciones de un aminoácido por otro. Otro enfoque es la creación de compuestos multiméricos, en los cuales una molécula presenta varios sitios de unión. El aumento de afinidad en estos casos puede ser debido a una unión cooperativa, que aumente la afinidad (para moléculas capaces de unir a dos blancos moleculares al mismo tiempo), o debido a un aumento aparente de la concentración de ligando [74].

1.5.1.1.2 Optimización de la estabilidad metabólica

Los péptidos lineales tienen muy baja estabilidad metabólica. Una variedad de peptidasas presentes en sangre, hígado y riñón, degradan al péptido en minutos antes de realizar su función. Dichas enzimas pueden clasificarse en dos grupos, las exopeptidasas y las endopeptidasas. Las primeras degradan el enlace amida N- o C- terminal, mientras que las endopeptidasas hidrolizan enlaces amida dentro de la secuencia peptídica.

Existen varias estrategias para evitar la degradación enzimática. Una de ellas es la ciclación de la estructura peptídica, de esta forma el extremo N-terminal es conjugado con el C-terminal, impidiendo la degradación por exopeptidasas. Además, en el caso de péptidos cíclicos con un tamaño de ciclo pequeño, puede limitar el acceso de las endopeptidasas, ya que las mismas requieren una conformación más extendida para su acción. El problema de esta estrategia es que la secuencia biológicamente activa queda fija en una conformación espacial, lo que puede llevar a una disminución, o en el mejor de los casos, a un aumento de la afinidad por el receptor. Un ejemplo de análogos peptídicos cíclicos que mejoraron su estabilidad son los péptidos RGD específicos para integrinas [73].

Otro abordaje para aumentar la estabilidad, se enfoca en la sustitución de aminoácidos naturales por sus análogos enantioméricos D o por aminoácidos no naturales. Algunas endopeptidasas tienen sitios de degradación específico, por ejemplo la tripsina es específica por Arg y Lys, mientras que la quimotripsina es específica por Trp, Tyr y Phe, entonces la sustitución de estos por sus análogos no naturales inhiben su acción enzimática [75].

Otra estrategia atractiva y ampliamente utilizada incluyen modificaciones a nivel del enlace amida, consiste en el reemplazo del enlace peptídico por un enlace sustituto. Enlaces isósteros estratégicamente colocados también puede mejorar las propiedades de biodisponibilidad y transporte [67]. Generalmente, los isósteros no restringen conformaciones globales, pero tienen influencia sobre la estructura secundaria a través de diferentes enlaces de hidrógeno y longitud de la cadena peptídica. Esta estrategia ha sido utilizada para estabilizar análogos de neurotensina.

1.5.1.1.3 Optimización de la farmacocinética

A veces es necesario mejorar propiedades del metabolismo del péptido relacionadas con su depuración sanguínea, vías de eliminación, unión a proteínas, etc. Frecuentemente no toda la

secuencia peptídica es necesaria para el reconocimiento del blanco, por lo tanto, existen fragmentos de la secuencia que toleran modificaciones. Los abordajes que permiten variación de las propiedades farmacocinéticas incluyen conjugación de carbohidratos, adición de fragmentos de polietilenglicol o aminoácidos hidrofílicos [75]. Los efectos de dichas modificaciones dependen mucho de las características de la estructura líder, por lo que sus efectos no son fácilmente predecibles. En ocasiones la propia estrategia de marcación puede servir para modificar la farmacocinética, ejemplos de estos cambios se observan con el uso de agentes quelantes como el DTPA o DOTA. Marcaciones con ^{99m}Tc de péptidos derivatizados con HYNIC modifican sus propiedades farmacocinéticas según los coligandos que utilizan [77].

1.5.2 Radiofármacos de Diagnóstico

Dependiendo de sus aplicaciones médicas, los radiofármacos se pueden dividir en dos clases: de diagnóstico y de terapia. Los radiofármacos de diagnóstico en el caso de la centellografía gamma contienen radionucleidos que emiten radiación gamma con una energía entre 30 y 300 KeV. En el caso de los radiofármacos para PET, los radionucleidos utilizados son emisores de positrones por ejemplo ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O [72].

En general, los radiofármacos de diagnóstico no presentan actividad farmacológica debido a que se administran en cantidades trazadoras en el rango nano y pico molar. Su objetivo principal es obtener de una forma no invasiva la descripción detallada de la morfología de acuerdo a la función en estudio sin tener efectos farmacológicos. Requieren que su pureza radioquímica o PRQ sea mayor a 90%, puesto que la inyección de una mezcla diversa de especies del radionucleido disminuye la captación en el órgano blanco, y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos [78].

Los radiofármacos de diagnóstico son predominantemente complejos metálicos. Los mismos son de particular interés por su amplio rango de propiedades químicas y nucleares (tipo de radiación, período de semidesintegración, gran capacidad de coordinación, etc). Entre éstos el ^{99m}Tc es el más ampliamente utilizado en medicina nuclear, si bien se usan también el ^{111}In , ^{67}Ga entre otros. También se pueden incorporar isótopos no metálicos a moléculas orgánicas, como es el caso de ^{18}F y ^{125}I [79, 80]

1.5.3 Propiedades del Tecnecio-99m

La elección del radioisótopo depende ampliamente de las propiedades físicas y nucleares, disponibilidad y costos. Uno de los isótopos con mayor utilidad en medicina nuclear es el metaestable ^{99m}Tc con un período de semidesintegración ($T_{1/2}$) de 6.01 h, decae por transición isomérica mediante la emisión de un fotón gamma de 142 Kev al isótopo relativamente estable ^{99}Tc ($T_{1/2} = 2,5 \times 10^5$ años).

El ^{99m}Tc es un radioisótopo perteneciente al Grupo VII B correspondiente a la 2ª serie de los metales de transición. El tecnecio presenta múltiples estados de oxidación que van desde -1 a +7, siendo los más estables el estado +7 (TcO_4^-) y +4 (TcO_2). Posee un índice de coordinación de 4 a 9. La química del tecnecio es dominada por la formación de complejos en los cuales el metal deficiente de electrones actúa como aceptor de electrones provenientes de átomos o grupos funcionales capaces de donar electrones.

En solución acuosa, el ^{99m}Tc está presente en la forma más estable como anión pertecneiato $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Debido a que el tamaño y la carga son similares a las del I^- , la biodistribución del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es similar a la observada para el anión del yodo. Sin embargo, debido a la estabilidad y poca reactividad del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, el mismo no puede ser quelado o incorporado directamente a una molécula, motivo por el cual es necesaria una previa reducción del estado de oxidación con agentes reductores adecuados [81].

El ^{99m}Tc es producto del decaimiento β^- del ^{99}Mo ($T_{1/2} = 66$ h), y es obtenido a partir de generador. En 1958 científicos del Brookhaven National Laboratory crearon el primer generador. Un generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc está basado en la adsorción del radionucleido padre ^{99}Mo en una columna de alúmina, mientras que el ^{99m}Tc se obtiene por decaimiento del ^{99}Mo . El ^{99m}Tc se obtiene en forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ por elución de la columna con una solución salina. La producción comercial de generadores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc es llevada a cabo mediante fisión nuclear de ^{235}U o por irradiación neutrónica del ^{98}Mo [82] (Figura 1.11). El suministro de ^{99m}Tc a través de generador, permite la disponibilidad permanente a bajo costo del radionucleido en cualquier servicio de medicina nuclear, en comparación con otros radionucleidos. En la figura 1.11 se muestra un esquema del decaimiento radiactivo del ^{99}Mo y del ^{99m}Tc .

El ^{99m}Tc se obtiene del generador como el anión pertechnetato, $^{99m}\text{TcO}_4^- (+7)$, para que sea incorporado por un agente quelante, debe ser reducido a un estado de oxidación menor con mayor reactividad química. Una vez reducido a estados de oxidación menores, el Tc es capaz de unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación. Debido a que durante este proceso se puede obtener una mezcla de estados reducidos del Tc, es de gran importancia controlar las condiciones de reacción de modo de obtener en mayor proporción la especie de interés. También es importante evitar la formación de especies hidrolizadas del Tc como lo es el TcO_2 óxido hidratado, ya que además de disminuir el rendimiento del marcado, puede interferir en el procedimiento diagnóstico.

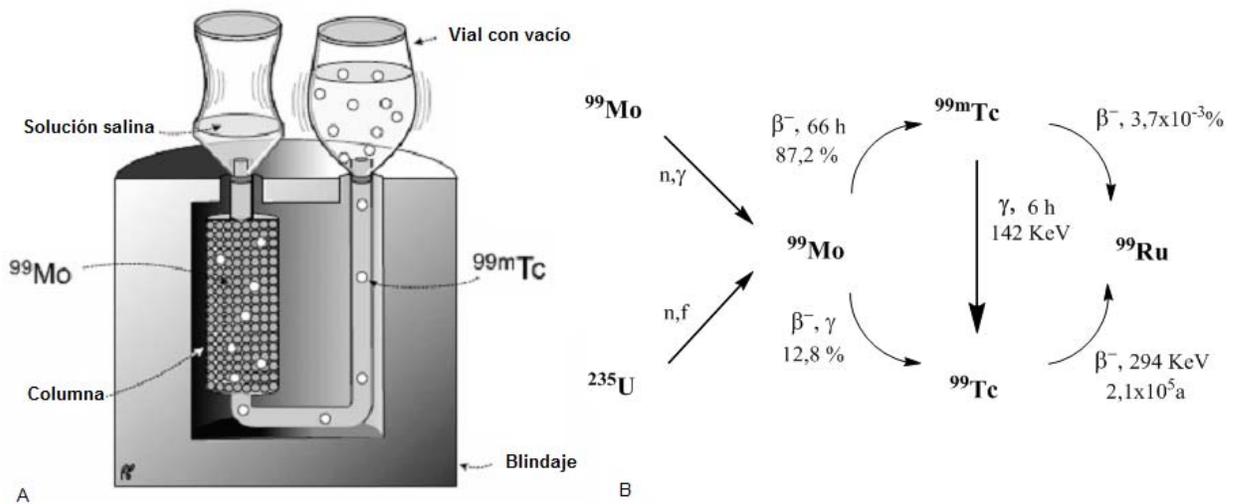


Figura 1.11: A) Generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc B) Decaimiento radiactivo del ^{99}Mo y del ^{99m}Tc

El agente reductor utilizado con mayor frecuencia es el Sn^{+2} , el mismo presenta baja toxicidad y buen poder reductor, obteniéndose elevados rendimientos de marcado. Se lo puede utilizar bajo la forma de cloruro, fluoruro, citrato o tartrato. Por lo tanto en la mayoría de las preparaciones con ^{99m}Tc , en el preparado final pueden estar presentes por lo menos tres especies radiactivas:

- ^{99m}Tc libre bajo la forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, que no ha sido reducido por el agente reductor empleado.
- ^{99m}Tc reducido que no reaccionó con el agente ligando y se encuentra como $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Compuesto de interés marcado con ^{99m}Tc

1.5.3.1 Radiofármacos de ^{99m}Tc

Los radiofármacos de tecnecio son utilizados en muchas aplicaciones diagnósticas. Debido a sus múltiples estados oxidación presenta una gran versatilidad química, haciendo posible la formación de complejos con características específicas. Pueden ser clasificados en productos de primera, segunda y tercera generación.

Los radiofármacos de primera generación se utilizan para determinar funciones fisiológicas básicas e inespecíficas. Consisten generalmente en formulaciones de un vial estéril y liofilizado, que contiene SnCl_2 como agente reductor y que son reconstituidos mediante la adición del pertecneciato. A modo de ejemplo pueden citarse el pirofosfato y el azufre coloidal para estudios óseos y hepáticos respectivamente.

Una segunda generación de radiofármacos surgió con la necesidad de diseñar complejos de tecnecio en los cuales la biodistribución y captación en el blanco dependen exclusivamente de su lipofilidad, tamaño y carga. Son compuestos diseñados tomando en consideración los conocimientos acerca de la química del ^{99m}Tc y la relación estructura-actividad para optimizar la captación en el órgano blanco. Esta generación incluye radiofármacos de uso corriente en la clínica para estudios de perfusión cerebral y de miocardio.

Posteriormente surgió el desarrollo de una tercera generación de radiofármacos que consistió en la marcación de moléculas y biomoléculas con una actividad biológica específica. Debido a que la captación por blanco molecular reside en que la molécula marcada sea biológicamente activa, las estrategias de marcación deben apuntar al mantenimiento de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de la molécula [83].

1.5.3.2 Estrategias de marcación con ^{99m}Tc

En la búsqueda de radiofármacos específicamente dirigidos a blancos moleculares, se han desarrollado distintas estrategias que permiten la unión del ^{99m}Tc a péptidos y proteínas. Dentro de las estrategias de marcado podemos distinguir entre: enfoque integrado, uso de agentes quelantes bifuncionales, o una estrategia híbrida [79].

El enfoque integrado, consiste en el reemplazo de un fragmento del ligando por un quelante no natural, de forma de que se produzcan alteraciones mínimas en el tamaño, conformación y

afinidad por el receptor. En esta estrategia la incorporación del metal quelado constituye parte importante del motivo de unión (Figura 1.12). Sin embargo, esta estrategia ha llevado a ligandos con menor afinidad, probablemente el cambio de enlaces C-C por enlaces del metal con -N, -O, -S tienen gran impacto en el tamaño y conformación llevando a una disminución de la afinidad [84].

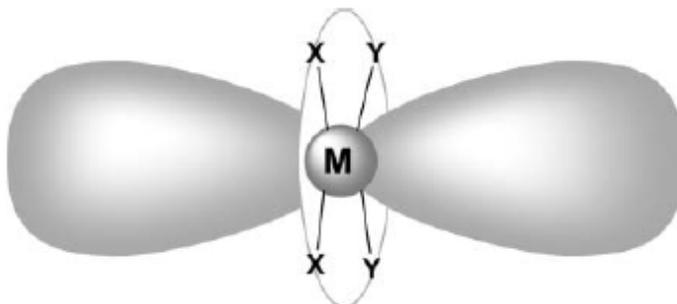


Figura 1.12: Esquema del enfoque integrado. (Fuente: S Liu, 2003)

La estrategia de agentes bifuncionales se basa en el uso de una biomolécula con afinidad por un receptor blanco, un AQB que sea capaz de unirse a la biomolécula y coordinar al metal, siendo opcional la utilización de un espaciador en el caso de querer preservar el sitio bioactivo o para modificar propiedades farmacocinéticas (Figura 1.13). La molécula vector puede ser una proteína, péptido, moléculas orgánicas, etc. La elección del AQB está determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radiometal. Este enfoque es uno de los más utilizados, debido a que permite conservar las propiedades de reconocimiento de la molécula vector, y elegir cuidadosamente el agente bifuncional. Esta estrategia también permite un enfoque indirecto, ya que es posible preformar el complejo de ^{99m}Tc con un AQB y posteriormente este complejo se conjuga a la molécula de interés [79, 80].

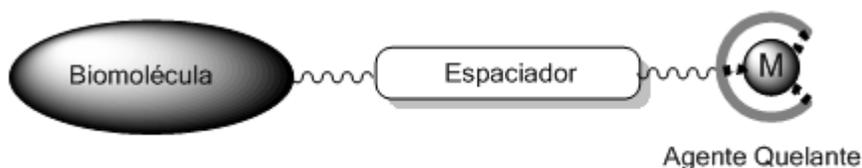


Figura 1.13: Esquema del enfoque bifuncional

El enfoque híbrido, el radiometal es quelado por una secuencia de tres péptidos (Gly,Gly,Gly; Cys,Gly,Gly; Gly,Cys,Cys o Cys,Gly,Cys) que presenten un grupo de átomos donadores de electrones. Esta secuencia peptídica puede ser parte de una estructura lineal, o ser parte de la conformación de un péptido cíclico (Figura 1.14) [80, 85].

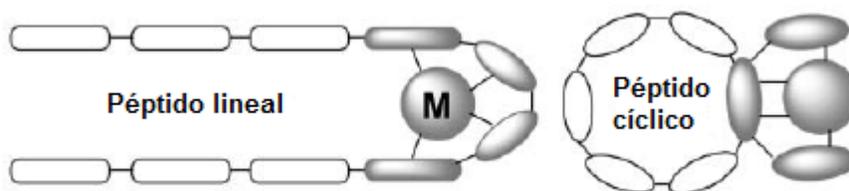


Figura 1.14: Esquema del enfoque integrado. (Fuente: S Liu, 2003)

1.5.4 Agente bifuncional HYNIC

El grupo 6-hidrazinonicotinil (conocido como HYNIC), un derivado del sistema heterocíclico piridina, es ampliamente utilizado como agente bifuncional, y ha sido conjugado a diferentes biomoléculas en el desarrollo de radiofármacos de ^{99m}Tc . Abrams y colaboradores fueron los primeros en describir la síntesis de HYNIC y la evaluación *in vivo* de bioconjugados de HYNIC [86]. Desde entonces se ha utilizado con éxito en la marcación de anticuerpos, y biomoléculas pequeñas como péptidos y nucleótidos; siendo un agente bifuncional que permite marcaciones rápidas, en condiciones moderadas y con elevada eficiencia [70, 87, 88]. HYNIC es conjugado a las biomoléculas mediante la formación de un enlace amida a través de la reacción del éster activado de un derivado de HYNIC con una amina presente en la biomolécula (Figura 1.15), o en el caso de péptidos mediante el acople directo.

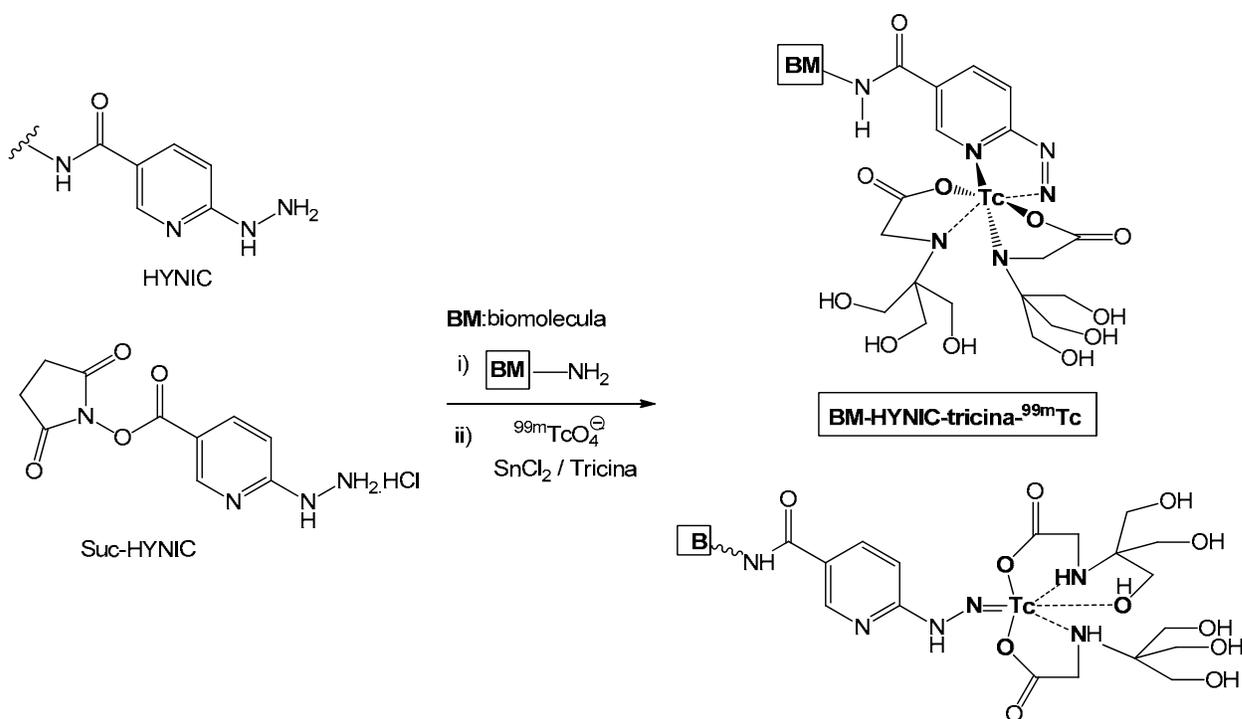


Figura 1.15: Uso de HYNIC como BFC. Representación de las estructuras propuestas para los radioconjugados formados utilizando tricina como coligando [79,80].

HYNIC puede coordinar al metal a través del átomo de N del anillo de piridina y/o átomo de N del grupo hidrazino, siendo además necesaria la utilización de coligandos para completar la esfera de coordinación del tecnecio. Algunos coligandos comúnmente utilizados se muestran en la Figura 1.16, donde la elección de los mismos permiten modificaciones en propiedades como la hidrofiliicidad y farmacocinética del compuesto [77]. El uso de distintos coligandos si bien ha permitido gran versatilidad de los complejos diseñados, también genera cierto grado de incertidumbre a la hora de determinar la estructura de la esfera de coordinación, y en como optimizar los complejos.

El uso de coligandos generalmente resulta en la formación de una mezcla de complejos de coordinación, mediante la formación de una mezcla de isómeros. De los coligandos más estudiados, se ha observado que el uso del tricina, coligando bidentado en un sistema de ligandos binario (Figura 1.17), es más favorable para la reducción y formación del complejo inicial con tecnecio. Sin embargo, se ha observado estabilidad relativamente baja en soluciones diluídas y la formación de varios complejos de tecnecio. Por otro lado, el uso de EDDA como coligando genera menor cantidad de complejos con mayor estabilidad, pero la eficiencia de marcación es

menor. Los derivados de trifenilfosfina si bien reducen el número de complejos, son voluminosos y aportan gran hidrofobicidad [89].

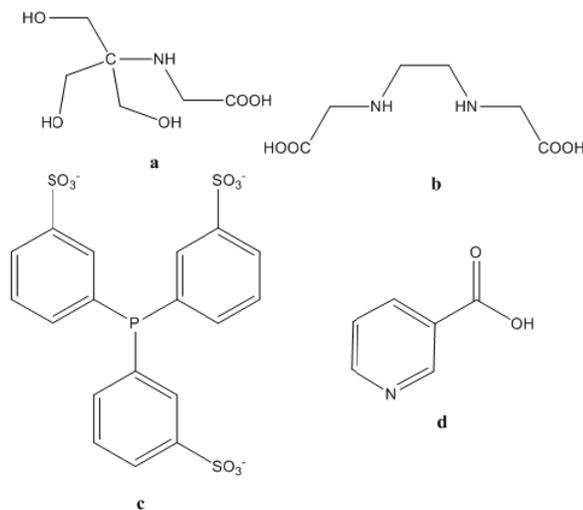


Figura 1.16: Coligandos más utilizados para la marcación de HYNIC con ^{99m}Tc: a) Tricina; b) EDDA; c) derivado hidrosoluble de trifenilfosfina; d) ácido nicotínico [79,80].

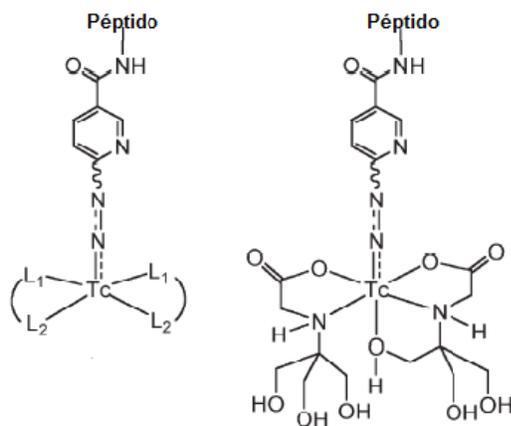


Figura 1.17: Algunas de las representaciones propuestas para complejos de ^{99m}Tc-HYNIC. Sistema de ligandos binario utilizando tricina como coligando. (Fuente: Liu, Shang, 2005)

Con el fin de reducir en número de complejos, Liu y colaboradores han evaluado sistemas ligandos ternarios utilizando tricina y trifenilfosfina como coligandos [Tc (HYNIC-BM)(tricina)(TPPTS)]. En dicho complejo ternario, HYNIC actúa como ligando monodentado debido a la presencia de los coligandos. Diferentes isómeros pueden formarse (Figura 1.18), por ejemplo, HYNIC puede actuar como ligando monodentado en presencia de una tricina tetradentada y trifenilfosfina monodentada, sin embargo en complejos macrocíclicos HYNIC puede participar como ligando bidentado desplazando el enlace de la trifenilfosfina y la tricina actuando como ligando tridentado. Además cuando HYNIC actúa de manera monodentada se pueden generar dos isómeros conformacionales debido a la libre rotación en el agente quelante. Esto podría explicar la presencia de los diferentes isómeros encontrados [90].

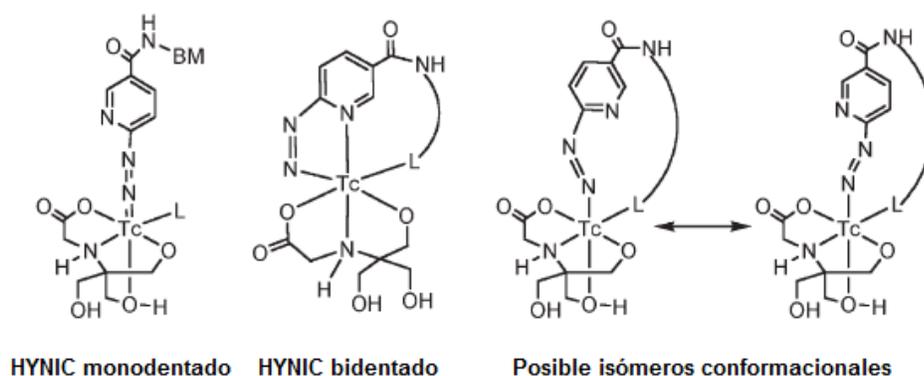


Figura 1.18: Sistema de ligando ternario de ^{99m}Tc : posibles estructuras utilizando tricina como coligando, L= trifenilfosfina. (Fuente: S Liu, 2005)

1.5.5 HYNIC: grupos protectores

El grupo hidrazino libre, presente en derivados de HYNIC como en conjugados HYNIC-bimolécula, tiene una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz. Debido a este tipo de reacciones, las cuales pueden provocar la descomposición del agente bifuncional, este debe ser almacenado a bajas temperaturas en frascos ámbar y preferentemente bajo la forma de una sal (generalmente clorhidrato o trifluoroacetato). Además, la elevada nucleofilia del grupo hidrazino libre puede dar reacciones con moléculas electrófilas. Por ejemplo, puede reaccionar con aldehídos y cetonas presentes en muchos materiales plásticos y en el caso del derivado Suc-HYNIC, el cual presenta un agrupamiento éster activado en su estructura, puede reaccionar consigo mismo conduciendo a reacciones de polimerización.

Varias proteínas han sido marcadas utilizando HYNIC como agente bifuncional, la reacción de conjugación con el agente bifuncional ocurre a través de la formación de un enlace amida, entre el grupo éster activo de un derivado de HYNIC con los grupos amino libre presentes en la proteína (ϵ -amino de los residuos de lisina o N-terminal) [86, 88]. Debido a que las reacciones de conjugación ocurren con un exceso molar de HYNIC, y de que el grupo hidrazino reactivo se pueda encontrar libre en solución acuosa, es muy probable que el éster activado también reaccione con el grupo hidrazino altamente nucleofílico, lo cual puede conducir a reacciones de polimerización de HYNIC. Por este motivo, es de vital importancia el uso de análogos de HYNIC que presenten el grupo hidrazino protegido (Figura 1.19), evitando de esta forma interferencia del grupo hidrazino durante la conjugación y permitiendo una protección contra la oxidación y el bloqueo del mismo por formación de una hidrazona debido a la presencia de aldehídos contaminantes.

Este tipo de reacciones no deseadas puede hacer muy difícil mantener la pureza y estabilidad del complejo HYNIC-biomolécula durante el proceso de síntesis. Para prevenir la descomposición o degradación del conjugado se han logrado sintetizar diferentes derivados de HYNIC los cuales presentan al grupo hidrazino adecuadamente protegido. Los principales grupos protectores utilizados son el *t*-butoxicarbonil (Boc) [92], trifluorometilcarbonil (TFA) [93] y agrupamientos hidrazona [93] (Figura 1.19). En este sentido, la formación de hidrazonas, en los conjugados HYNIC-biomolécula, tiene como ventaja que su formación puede darse eficientemente en un medio anhidro y posteriormente durante el proceso de radiomarcado en medio acuoso se lleva a cabo la desprotección y formación del complejo con ^{99m}Tc *vía* hidrazino libre en un solo paso [93]. El rendimiento de la formación del complejo entre el ^{99m}Tc con el ligando bifuncional y co-ligando depende ampliamente de la cinética de la hidrólisis de la hidrazona, así como de la concentración total del conjugado de HYNIC-biomolécula en la mezcla de reacción. Cuanto mayor sea el grado de hidrólisis de la hidrazona, mayor será el número de grupos hidrazino libres disponibles para coordinarse al ^{99m}Tc , por tanto aumentará el rendimiento de marcado del complejo formado con ^{99m}Tc . Sin embargo, la hidrólisis no necesita ser completa, dado que generalmente hay varios equivalentes del conjugado Biomolécula-HYNIC-hidrazona en exceso por equivalente de tecnecio en la reacción.

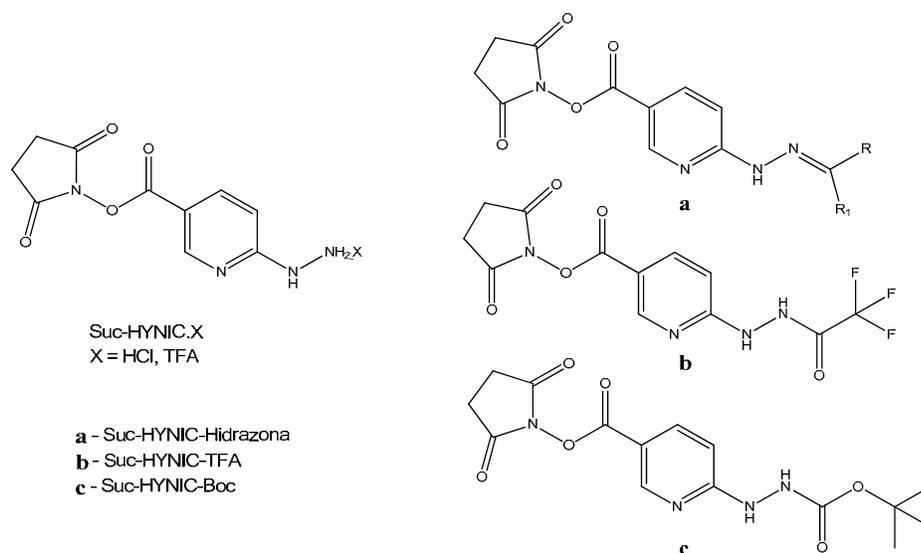


Figura 1.19: Derivados de HYNIC con grupo hidrazino protegido

El marcado de péptidos sintéticos con ^{99m}Tc vía HYNIC, es una estrategia ampliamente utilizada. Se han descrito varias estrategias de conjugación, marcación y mayor variedad de coligandos [77, 88]. Debido a que los péptidos pueden resistir temperaturas más elevadas y condiciones químicas más extremas que las proteínas, es posible pensar en estrategias de conjugación y marcación con el grupo reactivo hidrazino protegido. Algunos trabajos describen el acople directo sitio específico de HYNIC protegido con el grupo Boc durante la síntesis automática en fase sólida, siendo desprotegido en el último paso de síntesis del péptido durante la etapa de desanclaje de la resina en condición de ácido trifluoroacético [91]. Otro grupo describió que el análogo protegido con un grupo trifluorometilcarbonil puede ser marcado con ^{99m}Tc sin necesidad de exposición previa del grupo quelante, y que la formación de dicha protección ocurre como un producto secundario debido a las condiciones de desanclaje durante la síntesis del péptido en fase sólida [95].

2 Antecedentes y justificación

El melanoma, como se mencionó anteriormente, es uno de los cánceres humanos más agresivos. Este tipo de cáncer da cuenta del 5% de todos los cánceres de piel, sin embargo es el responsable del 75% de las muertes relacionadas con el cáncer de piel. Su tasa de incidencia ha presentado el mayor crecimiento en el mundo, observándose también un aumento en la incidencia y mortalidad en nuestro país. La sobrevida de los pacientes portadores de melanoma está directamente relacionada con un diagnóstico precoz y preciso de la enfermedad; así como también de una evaluación correcta de la terapéutica aplicada al paciente.

El diagnóstico primario de melanoma es clínico y confirmado mediante una biopsia del sitio de lesión. El uso de técnicas de imagen para evaluar la progresión de la enfermedad, se ha limitado al uso de agentes de imagen no específicos de melanoma. Entre ellos, el ^{99m}Tc -coloide es utilizado de rutina para el estudio del drenaje linfático del ganglio centinela. Mientras que el ^{18}F FDG se utiliza como agentes de imagen para detección de metástasis, en etapas avanzadas de la enfermedad [62, 61].

La sobreexpresión del receptor MCR1 en células de melanoma [96, 97], ha impulsado el desarrollo de varios análogos de α -MSH (hormona melanocito estimulante) radiomarcados para su uso como agentes específicos para imagenología molecular y como potenciales agentes terapéuticos oncológicos. El número de receptores funcionales oscilan entre 1.000-6.000 en células humanas de melanoma y 5.000-8.000 receptores en células de melanoma murino [98, 99]. Es así, que siguiendo el mismo principio que el empleado en el desarrollo de los análogos de la somatostatina radiomarcados [72], se han desarrollado varios análogos de α -MSH para su uso como potenciales agentes específicos para imagenología molecular y terapia de melanoma.

α -MSH es un tridecapéptido siendo su secuencia [Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂]. Tras la unión del agonista, el MC1R es rápidamente internalizado [98]. Estudios de relación de bioactividad y estructura mostraron que la secuencia His-Phe-Arg-Trp es la mínima secuencia requerida para mediar la función melanotrópica, y que la sustitución en Met⁴ y Phe⁷ por Nle y D-Phe respectivamente, resultó en un análogo muy potente (NDP-MSH) con una concentración inhibitoria de 0.21 nM y mayor estabilidad metabólica [100].

En la búsqueda de análogos más afines, específicos y estables, han surgido una variedad de análogos cíclicos (figura 2.1). Se ha visto que en comparación con sus precursores lineales, la fijación de la estructura secundaria en forma de un giro beta, permite una conformación menos flexible que aumenta la afinidad por el sitio de unión al receptor. Entre las estrategias más

utilizadas se encuentran, las ciclaciones a través de enlaces disulfuro intramolecular entre residuos de Cys, o mediante una lactama intramolecular entre residuos Glu o Asp y Lys [100], y basadas en metales de coordinación [102].

De los análogos desarrollados como potenciales agentes de imagen para SPECT, los radionucleidos que se han utilizado con mayor frecuencia han sido el ^{99m}Tc y ^{111}In . El ^{111}In es otro isótopo muy utilizado en centellografía, decae por captura electrónica con la emisión de fotones gamma de 173 KeV y 247 KeV (con 89 y 95 % de abundancia isotópica respectivamente). Su período de semidesintegración es de 67,9 h, y es producido por ciclotrón a través de la reacción nuclear $\text{Cd}(n,p)^{111}\text{In}$ [103, 104].

En este sentido, dichos análogos de α -MSH presentan como agentes quelantes DTPA y DOTA para coordinación de ^{111}In y MAG2 o una secuencia aminoacídica CysGlyCysGly para coordinar ^{99m}Tc [104]. Por ejemplo, análogos lineales de NDP conteniendo MAG2 o CysGlyCysGly como quelantes fueron marcados con ^{99m}Tc presentando relaciones captación tumoral 6.52 ± 1.11 y 4.17 ± 1.34 % A/g respectivamente a los 30 min. En otra oportunidad un análogo conteniendo 2 secuencias de MSH fue marcado con ^{111}In vía DTPA para la realización de un estudio clínico para imagen de melanoma, observándose una sensibilidad de detección del 89% [105]. Una variedad de análogos marcados con ^{111}In vía DOTA ha sido estudiada con el fin lograr elevada captación tumoral y una disminución de la captación inespecífica a nivel renal [104].

Otra estrategia que también ha sido utilizada, es la ciclación del péptido a través de la coordinación con átomos de Re y Tc. Dicha estrategia ha sido utilizada por Quinn y colaboradores, en la cual el ciclo es generado por coordinación del Re por tres residuos sulfhidrilos de las Cys^{3,4,10} y un N del enlace amida Cys⁴ [103]. Estos péptidos cíclicos de Re no solo han demostrado ser resistentes a la degradación proteolítica y química, sino que también presentan elevada bioactividad y eliminación renal más favorable. Sin embargo, en la búsqueda de análogos que reduzcan la captación inespecífica por el riñón surge otro análogo cíclico de Re que incorpora la sustitución de la Lys¹¹ por una Arg¹¹ (ReCCMSH(Arg¹¹), así como también se obtuvo el análogo estableciendo el ciclo con ^{99m}Tc durante la marcación. Comparaciones entre ^{111}In -DOTA-ReCCMSH(Arg¹¹), ^{111}In -DOTA-ReCCMSH, ^{99m}Tc CCMSH(Arg¹¹) y ^{99m}Tc CCMSH mostraron que los análogos con la Arg¹¹ presentaron la mayor captación a nivel tumoral, y la menor acumulación en riñones, obteniéndose claras imágenes micro-SPECT-CT en ratones con

melanoma (ver tabla 1.2). Cabe destacar, que ReCCMSH(Arg¹¹) y otros análogos, también ha sido marcado con una variedad de radionucleidos emisores de positrones como el ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu y ⁸⁶Y, utilizando distintos agentes quelantes como lo son DOTA, NOTA, CBTE2A [106, 107].

Otra variedad de péptidos ha sido desarrollada utilizando la estrategia de ciclación por una lactama intramolecular. Uno de ellos, desarrollado por Rasposinho, el análogo β-Ala³-Nle⁴-cyc-[Asp⁵-His-D-Phe⁷-Arg-Trp-Lys¹⁰]-NH₂, ha sido marcado con ^{99m}Tc mediante un complejo con tricarbonilo, ^{99m}Tc(CO)₃, que mostró buena captación tumoral y moderada captación inespecífica a nivel de riñones, hígado e intestinos lo que sugiere que la biodistribución está dominada por el carácter hidrofóbico del complejo (figura 2.1) [108]. Miao y colaboradores han trabajado variando el tamaño del ciclo de los análogos, logrando buena captación tumoral y menor captación a nivel de riñones de la que presentan los análogos ciclados mediante enlace disulfuro [109].

Radiopéptido cíclico-metal	Modelo Tumor	T (h)	%A/g Tumor	%A/g Riñón	Tumor/Riñón	Tumor/sangre	Tumor/músculo	Ref
SPECT								
[^{99m} Tc]CCMSH	B16/F1	1	10.9±0.5	22.6±2.7	0.48	6.8	63	[85]
[¹¹¹ In]DOTA-Re-CCMSH	B16/F1	2	11.4±2.9	8.98±0.8	1.3	163	228	[103]
[¹¹¹ In]DOTA-Re-CCMSH(Arg ¹¹)	B16/F1	2	17.3±2.5	8.7±1.3	2.0	16	576	[106]
[^{99m} Tc]CCMSH(Arg ¹¹)	B16/F1	1	14.0±2.6	11.7±1.4	1.2	16	61	[106]
[^{99m} Tc]pz1-βA-Nle-c(DHfRWK)	B16/F1	4	11.3±1.8	32.1±1.6	0.35	6.8	61.4	[108]
[¹¹¹ In]DOTA-c(K-Nle-EHfRWGRPVD)	B16/F1	2	9.5±1.4	16.2±1.9	0.59	106	68	[109]
[¹¹¹ In]DOTA-GE-c(K-Nle-EHfRWGRPVD)	B16/F1	2	10.4±1.4	13.1±2.5	0.8	74	173	[109]

Figura 2.1 Datos *in vivo* de análogos cíclicos de α-MSH para SPECT.

En resumen, a lo largo de varios años, se ha observado para los análogos que las distintas estrategias de ciclación, elección de agente quelante y radionucleido, afectan las propiedades farmacocinéticas y la captación tumoral, siendo necesario una disminución de la acumulación en los órganos de excreción. Sin embargo, a pesar de un aumento de la incidencia a nivel mundial no existen al momento agentes de imagen específicos para melanoma. Es así que sería deseable el estudio de análogos de MSH marcados con radionucleidos disponibles en nuestro medio, tales como son el ^{99m}Tc como agente SPECT y ¹⁸F como agente de imagen PET. En este sentido, por su costo, accesibilidad y tecnología ampliamente difundida, lograr el desarrollo de un

radiofármaco de ^{99m}Tc específico para diagnóstico de melanoma tendría gran aplicación en el sistema de salud.

Por otra parte, el radiofármaco PET 2-(^{18}F)-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (^{18}FDG), es sin duda uno de los radiofármacos más importante a nivel mundial en uso clínico, debido no solo a su aplicación en el estudio de patologías muy diversas, sino también a sus características metabólicas y a la rapidez de su síntesis [110, 111]. En este sentido, el número de radiofármacos PET utilizados principalmente en estudios de investigación presenta un constante crecimiento hasta la fecha, sin embargo unos pocos (como la ^{18}FDG o ^{11}C -metionina) presentan un uso en la práctica clínica habitual. La síntesis de estos radiofármacos presenta características peculiares que la diferencian notablemente de los procedimientos de preparación de radiofármacos en Medicina Nuclear [112].

Al trabajar con isótopos de vida media muy corta (20 y 110 minutos para ^{11}C y ^{18}F , respectivamente), debe considerarse en primer lugar el tiempo de síntesis para buscar procedimientos que reduzcan al máximo el número de pasos. Estos deben transcurrir con gran eficiencia y la reacción de incorporación del isótopo debe darse en los pasos finales de la metodología sintética. Así, se reduce tanto el tiempo total de síntesis como el número de sustancias obtenidas como producto secundario de la reacción. La síntesis se lleva siempre a muy pequeña escala (habitualmente pocos miligramos), lo que implica un exceso de precursor y por lo tanto es necesario utilizar un sistema de purificación adecuado del producto final, siendo un equipo HPLC lo más habitual. En el esquema general de síntesis, se debe contar con un compuesto (precursor frío) adecuado que tenga un centro reactivo sobre el que se produzca la sustitución o adición del isótopo emisor de positrones durante la síntesis, en el que los grupos que no deben reaccionar estén protegidos con algún sustituyente adecuado. En este esquema sintético surgen dificultades como obtener un precursor adecuado, conseguir una reacción directa con pocos productos secundarios y lograr un sistema de purificación que permita separar eficientemente el producto final deseado. El ^{18}F es el radionucleido que presenta mayor uso en PET, el cual cuenta con características nucleares y química excelentes [113, 114]. El flúor-18 puede obtenerse en dos formas químicamente diferentes: ión fluoruro o flúor molecular. El método más utilizado para marcar tanto biomoléculas (como péptidos o anticuerpos) como grupos prostéticos que posteriormente se unen a la biomolécula de interés, es mediante reacciones de sustitución nucleofílica, tanto alifáticas como aromáticas, con $^{18}\text{F}^-$ promovido

generalmente en presencia de un aminopoliéter (Kryptofix 2.2.2), lo cual requiere generalmente el desarrollo previo de una metodología de síntesis utilizando $^{19}\text{F}^-$ [114, 115].

Un claro ejemplo lo constituye la radiosíntesis de la $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Figura 2.2).

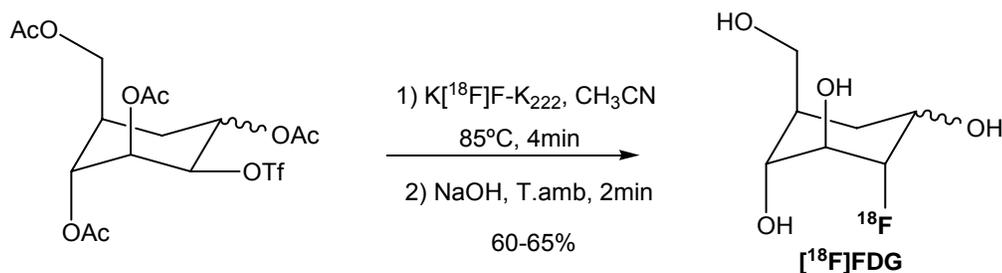


Figura 2.2: Esquema de la radiosíntesis de $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDG}$

Las reacciones de sustitución en derivados aromáticos requieren sustituyentes electrón aceptor (ej. grupos nitro-,ciano-, carbonilo) ubicados en posiciones *para* u *orto* a los grupos salientes (ej. grupos halogenos, nitro o trimetilamonio). Recientemente este tipo de reacciones ha sido llevada a cabo con buenos rendimientos en derivados heterocíclicos del sistema piridina [117, 118, 119].

En la Figura 2.3 se muestra la metodología de radiosíntesis utilizada para la preparación del $[\text{}^{18}\text{F}]\text{A-85380}$, un trazador para el receptor nicotínico. En este sistema heterocíclico, el desplazamiento nucleofílico de un buen grupo saliente, vía mecanismo de adición-eliminación, ocurre con mayor facilidad que en el anillo de benceno, particularmente en las posiciones 2 y 4, las cuales se encuentran activadas por al átomo de nitrógeno en el anillo. En este sentido, es sabido en la reactividad de sistemas heterocíclicos, que grupos salientes adecuadamente sustituidos en derivados como por ejemplo de *N*-óxido de piridina, son usualmente sustituidos bajo condiciones más suaves mediante un mecanismo de adición-eliminación vía un anión estabilizado por la función *N*-óxido [120, 121]. Así, la *N*-oxidación en estos sistemas heterocíclicos aumenta considerablemente la velocidad de reacción de los procesos de sustitución nucleofílica.

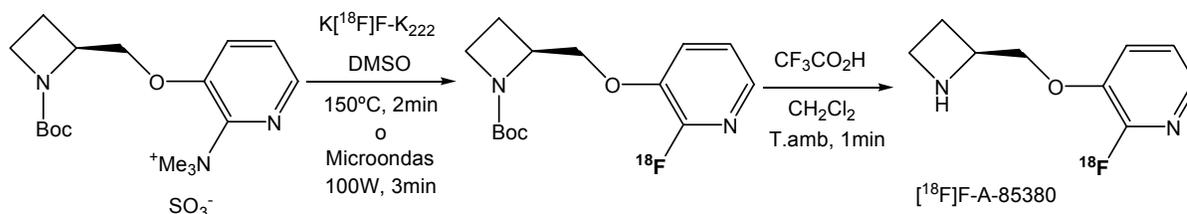


Figura 2.3: Ejemplo de marcación con ^{18}F de un derivado de piridina

Las sustituciones nucleofílicas son realizadas generalmente en solventes polar apróticos (como DMSO o acetonitrilo) bajo calentamiento convencional a elevadas temperaturas o mediante radiación de microondas durante cortos períodos de tiempo, lo cual es algo muy ventajoso tratándose de radionucléidos de corta vida media. En relación a esto, en los últimos años, la utilización de radiación de microondas en síntesis orgánica para aumentar las velocidades de reacción ha tenido una gran influencia tanto en la síntesis orgánica convencional como en la síntesis en fase sólida, dirigida a la obtención de moléculas bioactivas, fármacos y radiofármacos.

En base a lo anteriormente desarrollado, sería prometedor estudiar nuevas estrategias de marcación de análogos α -MSH con ^{18}F , mediante diseño de una metodología sintética adecuada que involucre derivados del sistema *N*-óxido de piridina como nuevos grupos protéticos. Estos podrían permitir en forma suave y eficiente tanto la incorporación del radionucleido ^{18}F como su unión con análogos de α -MSH, como aproximación al desarrollo de un radiofármaco PET dirigido al diagnóstico específico de melanoma.

3 Objetivos

El presente trabajo, tiene como objetivo general estudiar estrategias de marcación de análogos de la hormona alfa melanocito estimulante (α -MSH) con ^{99m}Tc , utilizando derivados del ligando bifuncional hidrazinonicotinamida (HYNIC), para su aplicación como potenciales radiofármacos de diagnóstico específicos para melanoma.

3.1 Objetivos específicos

- Se plantea inicialmente la síntesis de Clorhidrato de 6-hidrazinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (Suc-HYNIC) mediante una síntesis orgánica asistida por microondas. Así como también la obtención de otros análogos del ligando bifuncional HYNIC, como ser los derivados HYNIC-Boc, HYNIC-TFA, HYNIC-hidrazona y los éster activados (Suc-HYNIC) de estos tres derivados. Posteriormente se estudiarán condiciones de marcación con ^{99m}Tc de los análogos obtenidos como modelo de reactividad química, y en segundo lugar se estudiará el efecto del pH y la temperatura en el proceso de desprotección/marcación sobre estos derivados.
- En segundo lugar, como un estudio inicial en la aproximación al desarrollo de un radiofármaco PET se propone el diseño y la síntesis de derivados del sistema heterocíclico *N*-óxido de piridina adecuadamente sustituido para su unión a la biomolécula en estudio e incorporación del radionucleido ^{18}F mediante reacción de sustitución nucleofílica aromática.
- Finalmente se plantea la obtención de un análogo cíclico de α -MSH derivatizado con el agente bifuncional HYNIC. Se estudiarán condiciones de conjugación en solución de los derivados de HYNIC, con un análogo cíclico de α -MSH. Se estudiará la marcación con ^{99m}Tc de los análogos peptídicos obtenidos utilizando distintos coligandos, así como su evaluación *in vitro* e *in vivo*. En la evaluación biológica *in vitro* se realizaran ensayos en células B16 F1 con el fin de evaluar la unión del péptido por su receptor, así como también determinar el grado de internalización y externalización del mismo. Con el fin de determinar la estabilidad de los derivados marcados y su comportamiento *in vivo*, se plantearon estudios de biodistribución y adquisición de imágenes centellográficas y SPECT en un modelo de melanoma murino inducido con células B16 F1.

4 Síntesis Orgánica

4.1 Metodología experimental: Generalidades

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales de obtención y análisis espectroscópico de los compuestos (intermedios y finales) obtenidos por síntesis orgánica convencional, así como también mediante la aplicación de energía de microondas.

Los disolventes utilizados fueron purificados y secados por métodos convencionales. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales: Ácido 6-cloronicotínico, hidrato de hidrazina (50-60% N_2H_4), di-ter-butil dicarbonato (97%), DCC (99%) (Sigma-Aldrich), y Éter Sulfúrico (Química Gamma), TFA (Sigma-Aldrich). Cloroformo y Metanol seco (Sigma-Aldrich).

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por Cromatografía en Capa Fina. Se utilizó sílica gel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo y éter de petróleo, éter etílico y éter de petróleo, y diclorometano y metanol. Los métodos de revelado utilizados fueron: a) exposición a la luz ultravioleta (254 nm), b) exposición a vapores de yodo y c) asperjado con una mezcla de etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (v/v/v) y posterior quemado. Para las cromatografía en columna se utiliza sílicagel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker).

Los experimentos con radiación de microondas fueron realizados en un sistema multimodo WX-4000 de EU Chemical Instrument Co, con un rango de potencia de 100 – 1000 W. Se utilizaron reactores de Teflón sellados con una capacidad de 60 mL y 20mL. La temperatura fue monitoreada mediante una fibraóptica protegida con una cubierta de teflón, insertada directamente en el medio de reacción. Las mezclas de reacción fueron agitadas con un sistema magnético de rotación ubicado debajo de la cavidad del microondas. . La temperatura y presión fueron monitorizados con el software comercial brindado por el fabricante

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y Tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descriptos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s:

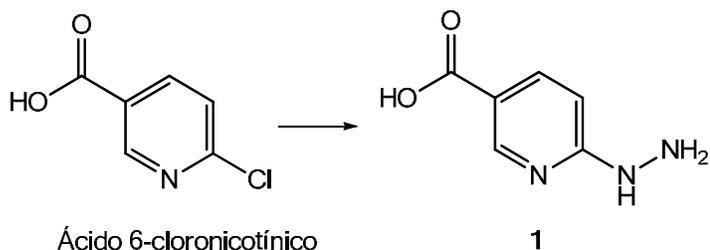
singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha.

La espectrometría de masa fue realizada utilizando equipos LC/MSD-Serie 100 Hewlett–Packard con el método de Ionización por Electrospray (IES-EM), equipo Shimadzu QP-2010 mediante impacto electrónico (IE-EM). Los espectros de masa de alta resolución (AR-EM) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Daltonics modelo MicrO TofQ, con el modo ESI+. Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Electrothermal 9100.

4.2 Síntesis de Suc-HYNIC y sus derivados

4.2.1 Ácido 6-hidrazinonicotínico (1)

Una mezcla de Ácido 6-cloronicotínico (1.0 g, 6.35 mmol), hidrazina monohidrato (3.17 g, 66 mmol) y H₂O (3.2 mL) es colocada en un reactor de teflón cerrado herméticamente y calentada a 160 °C durante 5 min. (Potencia máxima = 300 W, P máx = 5 atm). Posteriormente la mezcla se enfría, se acidifica a pH 5.5 por el agregado lento de HCl 12 M, y el precipitado formado se filtra a vacío, se lava con etanol, éter y se coloca en desecador durante 24 hs obteniéndose 0.89 g (92%) un sólido color crema. El producto obtenido se utiliza en el próximo paso sin otra purificación.

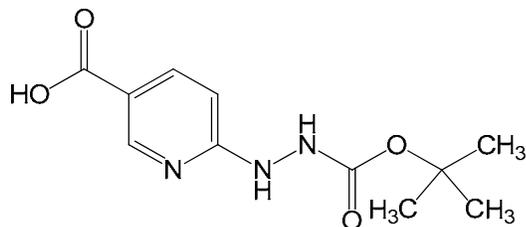


¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 6.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 7.86 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-4), 8.35 (sa, 1H, NH), 8.53 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 105.87 (C-5), 114.94 (C-3), 139.07 (C-4), 151.09 (C-2), 160.61 (C-6), 167.26 (COOH). IES-EM, *m/z*: 154.1 (M⁺ +H).

4.2.2 Ácido 6-*t*-(butoxicarbonil)hidrazinonicotínico (2, HYNIC-Boc)

A una solución de **1** (0.150 g, 0.98 mmol) en una mezcla de agua (1 mL), *t*-BuOH (1 mL), y NaOH (0.045 g, 1.13 mmol) se añade di-*tert*-butil dicarbonato (0.224 g, 1.03 mmol). El tubo de reacción es sellado, colocado en la cavidad del horno microondas y se aplica una potencia de 100 W durante 5 min (T_{max}=60 °C). Seguidamente la mezcla se enfría y el volumen de reacción es reducido a la mitad a través de destilación a presión reducida. Posteriormente la fase acuosa se acidifica a pH 5 mediante la lenta adición de HCl 1 N, para su extracción con AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida

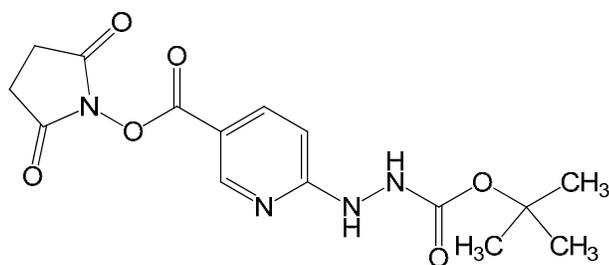
para dar un sólido de color amarillo. Finalmente el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (SiO_2 , Éter de petróleo:EtOAc (1:1)), obteniéndose **3** como un sólido amarillo pálido (0.148 g, 60 %).

**2**

$^1\text{H RMN}$ (Acetona- d_6) δ (ppm): 1.45 (s, 9H, CH_3), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-4), 8.15 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, NH), 8.73 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-2). **$^{13}\text{C RMN}$** (Acetona- d_6) δ (ppm): 27.54 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 79.72 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 104.94 (C-5), 117.30 (C-3), 138.76 (C-4), 150.80 (C-2), 155.76 (NHCO), 163.23 (COOH), 165.99 (C-6). **ESI-EM**, m/z : 254.2 ($\text{M}^+ + \text{H}$). **IE-EM** (70 eV) m/z : 294 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2 - (\text{CH}_3)_3\text{C}$, 29%), 277 (18%), 250 (25%), 236 (15%), 180 (29%), 136 (89%). PF: 274-276 °C.

4.2.3 6-(2-*t*-Butoxicarbonil)hidrazinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (**3**, Suc-HYNIC-Boc)

A una solución de *N*-hidroxisuccinimida (0.109 g, 0.949 mmol) en THF seco (8 mL) se le añade **2** (0.240 g, 0.949 mmol) y dicitohexilcarbodimida (0.195 g, 0.949 mmol), la mezcla se homogeniza y se la irradia con energía de microondas (400 W, 8 min, $T_{\text{máx}} = 80$ °C). Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y la dicitohexilurea precipitada es removida por filtración, y el disolvente destilado a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (SiO_2 , mezcla de Éter de petróleo:EtOAc) para dar un sólido color crema (0.273 g, 82 %).

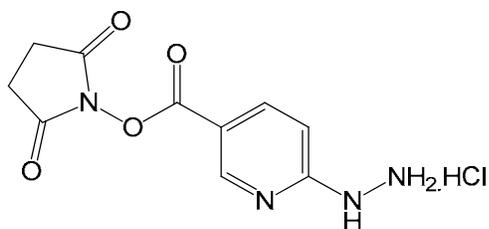


3

$^1\text{H RMN}$ (Acetona- d_6) δ (ppm): 1.46 (s, 9H, CH_3), 2.95 (s, 4H, CH_2), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 8.18 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 1.6$ Hz 1H, H-4), 8.38 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, NH), 8.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2); $^{13}\text{C RMN}$ (Acetona- d_6) δ (ppm): 25.45 (CH_2), 27.52 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 79.98 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 105.50 (C-5), 111.75 (C-3), 138.88 (C-4), 151.82 (C-2), 155.53 (CONN), 161.04 (COON), 169.84 (CON), 177.10 (C-6). **AR-EM:** calculado $(\text{M}+\text{H})^+$, $m/z = 351.1305$, hallado $(\text{M}+\text{H})$, $m/z = 351.1331$. PF: 148-150°C.

4.2.4 Clorhidrato de 6-hidrazinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (4, Suc-HYNIC)

Se disuelve **3** (0.100 g, 0.286 mmol) en una solución de Dioxano/HCl (4 mL), la cual se prepara mediante barboteo del HCl (g) en Dioxano durante 10 min. Se deja reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 20 h. El precipitado formado es filtrado y lavado repetidamente con éter etílico anhidro y colocado en desecador durante 20 h. El producto de interés se obtiene como un sólido amarillo pálido (0.078 g, 95%).



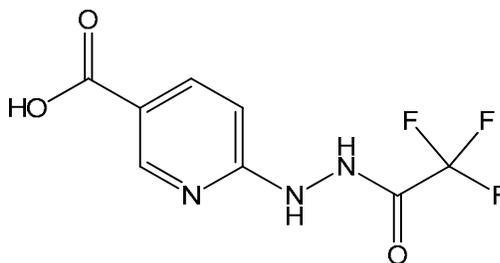
4

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 4H, CH_2), 7.03 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 8.22 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4$ Hz 1H, H-4), 8.86 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-2), 10.62 (sa, 1H, NH). $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 25.98 (CH_2),

109.23 (C-5), 112.63 (C-3), 139.15 (C-4), 151.05 (C-2), 159.47 (C-6), 161.08 (C=OO), 170.14 (C=ON),
AR-EM, calculado (M+H)⁺, m/z = 251.0780, hallado m/z: 251.0761 (M⁺ + H).

4.2.5 Ácido 6-(2-trifluoroacetil)hidrazinonicotínico (5, HYNIC-TFA).

Una disolución de **1** (0.1 g, 0.65 mmol) en ácido trifluoroacético (2 mL), se homogeniza y se la irradia con energía de microondas durante 10 min a 80°C (100 W). Luego de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, el exceso de ácido trifluoroacético es destilado a presión reducida y seguidamente se añade una mezcla de hexano y AcOEt 9:1 (5 mL). Finalmente el precipitado obtenido es lavado con hexano y éter sulfúrico, obteniéndose el producto deseado como un sólido color crema (0.144 g, 89%). El producto obtenido se utiliza en el próximo paso sin otra purificación.



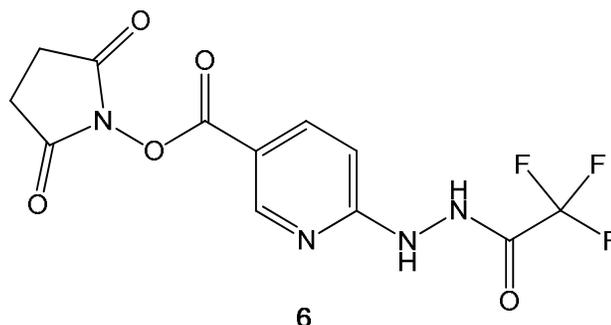
5

¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 6.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-5), 8.09 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 8.64 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2), 9.92 (sa, 2H, NH). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 109.23 (C-5), 113.01 (C=O_{CF₃}, q, *J* = 297 Hz), 118.91 (C-3), 139.59 (C-4), 148.02 (C-2), 158.18 (C=O_{CF₃}, q, *J* = 31 Hz), 158.58 (C-6), 166.29 (COOH). **AR-EM**, calculada m/z: 250.0440 (M+H)⁺, hallada m/z: 250.0442 (M+H)⁺. **IE-EM**: 249 (M⁺, 21%), 180 (100%), 152 (25 %), 138 (20.5%), 123 (34%), 69 (42%). PF: 114-116°C.

4.2.6 6-(2-Trifluoroacetil)hidrazinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (6, Suc-HYNIC-TFA).

Se disuelve el derivado Suc-HYNIC-Boc **3** (0.1 g, 0.29 mmol) en ácido trifluoroacético (2 mL), la mezcla se homogeniza y se la irradia con energía de microondas durante 10 min a 80°C (100 W). Luego de enfriar la mezcla de reacción, el exceso de ácido trifluoroacético es destilado a

presión reducida y seguidamente se añade una mezcla de hexano y AcOEt 9:1 (5 mL). El precipitado formado es lavado con la misma mezcla, aislándose por filtración el producto de interés como un sólido amarillo verdoso (0.088 g, 89%). El producto obtenido se utiliza en siguientes experimentos sin otra purificación.

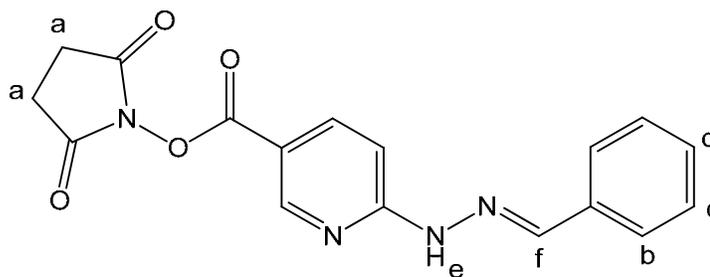


¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 2.88 (s, 4H, CH₂), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 8.16 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 8.80 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2), 10.03 (s, 1H, NH), 11.78 (sa, 1H, NH). **¹³C NMR** (DMSO-d₆) δ (ppm): 25.72 (CH₂) 107.19 (C-5), 111.87 (C=OCF₃, q, *J* = 287 Hz), 129.16 (C-3), 139.40 (C-4), 152.11 (C-2), 156.14 (C=OCF₃, q, *J* = 36 Hz), 161.25 (C=OO), 161.95 (C-6), 170.91 (C=ON). **AR-EM**, calculada *m/z*: 369.0423 (M+Na)⁺; hallada *m/z*: 369.0409 (M+Na)⁺. **EI-EM** *m/z*: 346 (M⁺, 7 %), 277 (5.7 %), 232 (100 %), 122 (35 %).

4.2.7 (*E*)-6-(2-benziliden)hidrazinonicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (**7**, Suc-HYNIC-hidrazona).

A una disolución de **1** (0.148 g, 0.967 mmol) en DMF seca (4 mL) se le añade benzaldehído (0.104 mL, 1.04 mmol) y se coloca durante 45 minutos a 60 °C con agitación. Seguidamente se agrega DCC (0.20 g, 0.980 mmol), *N*-Hidroxisuccinimida (0.113 g, 0.983 mmol) y la mezcla se coloca con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. La DCU formada se filtra y se lava con 3mL de AcOEt. A continuación se añade H₂O (40 mL) y se lleva a cabo extracciones con AcOEt (8 x 10.0 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se le agregan 3 mL de una mezcla Hexano: AcOEt (1:1) y el precipitado formado se filtra, se lava con la misma mezcla y se coloca en

dsecador durante 24 h, obteniéndose la hidrazona de interés **4** (como isómero geométrico *E*) (0.240 g, 73%) como un sólido color crema.



7

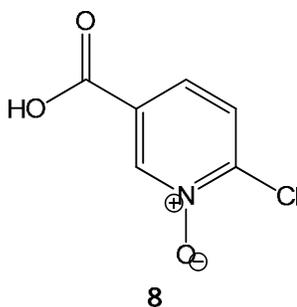
¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 2.89 (s, 4H, H-a), 7.39-7.48 (m, 4H, H-c + H-d+ H-5), 7.74-7.76 (m, 2H, H-b), 8.19 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 8.9 Hz, H-4), 8.20 (s, 1H, H-f), 8.81 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-2), 11.86 (s, 1H, H-e).

¹³C RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 24.7 (C-a), 105.9 (C-5), 126.8 (C-b), 128.8 (C-c) 129.1 (C-d), 135.0 (C=N), 138.9 (C-4), 143.0 (C-f), 152.9 (C-2), 160.4(COO), 167.2 (C-6), 170.9 (CON).

4.3 Síntesis de derivados de *N*-óxido de piridina

4.3.1 *N*-óxido de ácido 6-cloronicotínico (**8**)

A una solución de H₂O₂ 30 % (2.5 mL) enfriada exteriormente con baño de hielo/agua, se le añade ácido trifluoroacético (5 mL), y seguidamente ácido 6-cloronicotínico (0.150 g, 0.955 mmol). La mezcla se homogeniza y se deja reaccionando a temperatura ambiente durante 24 hs. Se reduce el disolvente destilando a presión reducida, y por agregado de 10 mL de AcOEt precipita un sólido marrón. El precipitado obtenido es filtrado y lavado con éter etílico para dar el producto deseado como un sólido color crema (0.083 mg, 76 %).

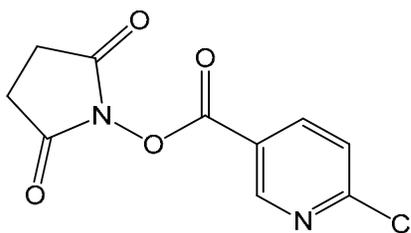


8

$^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 7.73 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-4), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 8.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2).

4.3.2 6-Cloronicotinato de *N*-hidroxisuccinimidilo (9)

A una disolución de *N*-hidroxisuccinimida (0.292 g, 2.54 mmol) en THF seco (6 mL) se le añade Ácido 6-cloronicotínico (0.400 g, 2.54 mmol) y dicitclohexilcarbodimida (0.523 g, 2.54 mmol), la mezcla se homogeniza y se la irradia con energía de microondas durante 15 min a 120°C (300 W). Luego de enfriar la mezcla de reacción se destila el disolvente a presión reducida. Por agregado de una mezcla AcOEt/Hexano (1:1) precipita un residuo blanco, que finalmente es purificado por cromatografía en columna (SiO_2 , mezclas de Éter de petróleo:EtOAc) para rendir el derivado de interés como un sólido blanco (0.188 g, 28 %).



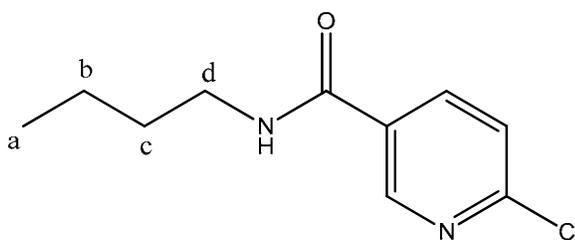
9

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm) : 2.95 (s, 4H, CH_2), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 8.35 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 9.13 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 25.09 (CH_2), 120.42 (C-3), 123.90 (C-5), 139.76 (C-4), 152.50 (C-2), 151.7 (C-6), 158.5 (C=OO), 168.42 (C=ON).

4.3.3 *N*-butil-6-cloronicotinamida (10)

A una disolución de *N*-hidroxisuccinimida (0.1461 g, 1.27 mmol) en THF seco (6 mL) se le añade Ácido 6-cloronicotínico (0.200 g, 1.27 mmol) y dicitclohexilcarbodimida (0.261 g, 1.27 mmol), la mezcla homogeniza y se la irradia con energía de microondas (300 W, 10 min, 120 °C). Se controla evolución de la reacción mediante cromatografía en capa fina (Sílica, AcOEt/Éter de petróleo (1:1)) para comprobar la formación del derivado precursor **9**. Seguidamente se añade *N*-butilamina (0.138 mL, 1.39 mmol), y se aplica una potencia de 300W en la cavidad del horno de microondas durante 5 minutos ($T_{\text{máx}} = 70^\circ\text{C}$). Finalmente se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente, la dicitclohexilurea precipitada es removida por filtración, y el disolvente destilado a

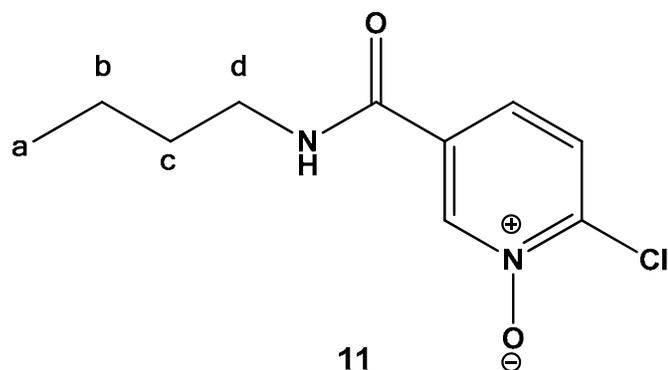
presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (SiO_2 , mezclas de Éter de petróleo:EtOAc) para rendir el derivado **10** como un sólido blanco (0.219 g, 82 %).

**10**

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0.97 (t, $J = 7.2$ hz, 3H, H-a), 1.42 (m, 2H, H-b), 1.63 (m, 2H, H-c), 3.48 (m, 2H, H-d), 6.26 (s, 1H, NH), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 8.10 (dd, $J = 8.4$ hz, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-4), 8.74 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 13.04 (CH_2CH_3), 19.73 (CH_2CH_3), 31.19 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 39.58 (CH_2NH), 123.90 (C-5), 129.2 (C-3), 137.89 (C-4), 146.76 (C-2), 153.65 (C-6), 164.87 (C=O). **EI-EM** m/z : 212 (M^+ , 7 %), 170 (24 %), 140 (100%), 112 (25 %).

4.3.4 N-óxido de N-butil-6-cloronicotinamida (11)

Se disuelve **10** (0.620 g, 2.9 mmol) en 10 mL de ácido trifluoroacético, se coloca el balón de reacción en baño de hielo y se añade lentamente una solución de peróxido de hidrógeno 30% (10mL). Posteriormente se incuba a 75 °C durante 8 h y luego se deja reaccionando durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. El ácido trifluoroacético es destilado a presión reducida. Se neutraliza con NaOH 1 M y se realizan extracciones con CH_2Cl_2 (5 x 10 mL), se neutraliza la fase orgánica, se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y el disolvente es destilado a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (SiO_2 flash, mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para rendir el compuesto **11** como un sólido blanco (0,305 g, 46 %).



¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 0.90 (t, *J* = 7.2 hz, 3H, H-a), 1.32 (m, 2H, H-b), 1.50 (m, 2H, H-c), 3.26 (m, 2H, H-d), 7.70 (dd, *J* = 6.4 hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 8.73 (t, 1H, NH), 8.80 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-2). **¹³C (DMSO-d₆)** δ (ppm): 13.43 (CH₂CH₃), 19.83 (CH₂CH₃), 30.87 (CH₂CH₂CH₂), 39.90 (CH₂NH), 124.58 (C-4), 127.53 (C-5), 131.97 (C-3), 139.42 (C-2), 142.7 (C-6), 162.01 (C=O). **EI-EM** *m/z*: 228 (M⁺, 27%), 211 (17%), 172 (34%), 156 (100%), 140 (61%), 112 (20%).

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Síntesis de Suc-HYNIC y derivados

Con el objetivo de sintetizar tanto Suc-HYNIC como sus derivados en nuestro laboratorio de forma rápida y eficiente, se estudiaron distintas condiciones de reacción basadas en la aplicación de radiación de microondas, utilizando un reactor comercial multimodo, con el fin de mejorar los rendimientos y reducir tiempos de reacción.

Muchos trabajos científicos publicados recientemente presentan el uso de la radiación de microondas como una gran ventaja frente al calentamiento en placas eléctricas o baños de aceite, debido a los cortos tiempos de reacción necesarios, además de la simplicidad del equipamiento. Hay que tener en cuenta que, aunque la longitud de onda de esa radiación va desde 1 cm hasta 1 m la mayoría de este rango está dedicado al radar y las telecomunicaciones por lo que, para evitar interferencias, las longitudes de onda de los hornos microondas están restringidas entre 12.2 cm hasta 33.3 cm, es decir 2.45 GHz o 900 MHz.

El mecanismo de actuación de la radiación de microondas consiste en provocar la rotación de los dipolos o iones de cada reactivo, haciendo que las moléculas polares o iónicas se alineen y luego relajen en el campo oscilante de la radiación electromagnética. Cuando la energía de la rotación de esos dipolos o iones se disipa se produce el calentamiento del material. El calentamiento eficiente permite, en un amplio espectro de reacciones, reducción de tiempo de reacción, mayor conversión, disminución de la cantidad de disolvente y/o reactivos, logrando un enfoque más amigable con el medio ambiente [122].

Para la síntesis del clorhidrato de 6-hidrazino nicotinato de *N*-hidroxi-succinimidilo **4**, la metodología de trabajo se basó en una técnica modificada de la síntesis desarrollada por Abrams y colaboradores [86]. En base a los antecedentes en nuestro grupo de trabajo [123], la optimización del proceso surge a partir de la secuencia de 4 reacciones que se muestran en la figura 4.1.

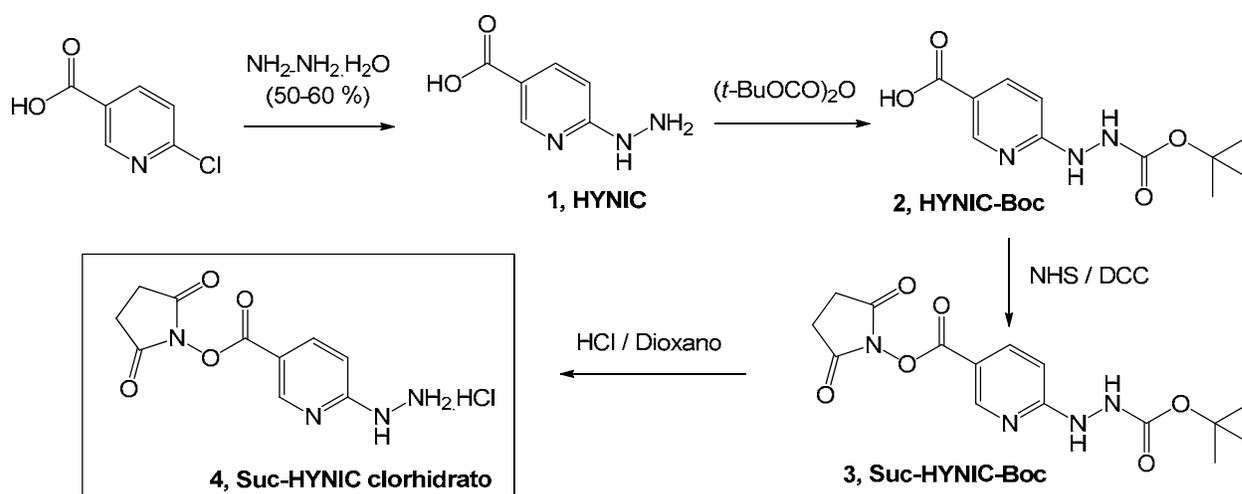


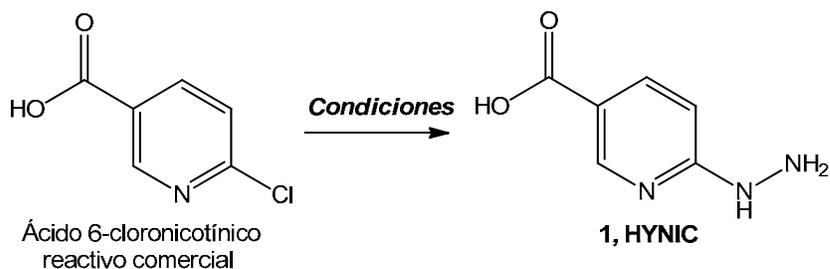
Figura 4.1: Metodología sintética para la obtención de Suc-HYNIC clorhidrato 4.

El primer paso de la síntesis consistió en una $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ sobre el ácido 6-cloro nicotínico, donde el halógeno es desplazado por el nucleófilo hidrazina. Las distintas condiciones de reacción ensayadas y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.1. Se optimizaron las condiciones de reacción alcanzando un rendimiento del 92% cuando se calentó a 160°C bajo radiación de MO durante 5 min (Entrada 4, Tabla 4.1.) en un reactor de teflón sellado.

En estas condiciones pudimos disminuir la cantidad de hidrazina monohidrato utilizada en las condiciones descritas inicialmente por Abrams. y col. (Entrada 1, Tabla 4.1), mejorando el procedimiento de purificación del producto final y trabajando con una menor cantidad (4 veces menos) de un agente altamente tóxico como la hidrazina.

Seguidamente el grupo hidrazino en **1** es protegido mediante el grupo Boc, a través de reacción del grupo hidrazino con el anhídrido de Boc $(\text{Boc})_2\text{O}$. Las condiciones de reacción estudiadas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2. Dado el bajo rendimiento obtenido utilizando las condiciones descritas por Abrams y col (entrada 1, Tabla 4.2) y la naturaleza zwitteriónica de HYNIC, se ensayó una condición típica de protección de aminoácidos, utilizando $(\text{Boc})_2\text{O}$ en condiciones básicas en presencia de una mezcla de $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ [124]. Bajo estas condiciones logramos obtener el producto de interés con buen rendimiento luego de su purificación (entrada 2, Tabla 4.2). Realizando esta reacción mediante calentamiento por

radiación de microondas se redujo el tiempo de reacción a 5 min con similar rendimiento (entrada 3, Tabla 4.2).



Entrada	Reactivos ^a	Condiciones ^b	Rendimiento(%) ^c
1	6-Cl-Nic (1 eq), NH ₂ NH ₂ (20eq)	reflujo, 240 min	83
2	6-Cl-Nic (1 eq), NH ₂ NH ₂ (5eq)	MO, 100°C, 20min	40
3	6-Cl-Nic (1 eq), NH ₂ NH ₂ (5eq)	MO, 120°C, 30min	67
4	6-Cl-Nic (1 eq), NH ₂ NH ₂ (5eq)	MO, 160°C, 5min	92

Tabla 4.1: Condiciones estudiados para la obtención de HYNIC 1. En la tabla se muestra la relación molar de los reactivos y condiciones de calentamiento..^a Ácido 6-cloronicotínico: 6-Cl-Nic. ^b MO (calentamiento por microondas). ^c El % de rendimiento obtenido luego del procesamiento de reacción

Entrada	Reactivos	Condiciones ^a	Rendimiento (%) ^b
1	1 / (Boc) ₂ O / Et ₃ N / DMF	T amb, 16h	20
2	1/(Boc) ₂ O / NaOH/H ₂ O- <i>t</i> -BuOH	T amb, 3h	60
3	1 / (Boc) ₂ O / NaOH // H ₂ O- <i>t</i> -BuOH	100 W, 5min	60

Tabla 4.2: Condiciones estudiados para la obtención de HYNIC-Boc 2. ^a Calentamiento por microondas, T amb (Temperatura ambiente). ^b Se informa % de rendimiento obtenido luego del proceso de purificación.

La etapa de síntesis de Suc-HYNIC-Boc **3** consistió en la activación del grupo ácido carboxílico en **2** por la formación del agrupamiento éster, mediante reacción de HYNIC-Boc en presencia de NHS y DCC. En la Tabla 4.3 se presentan las condiciones estudiadas y los resultados obtenidos. En las condiciones clásicas descritas por Abrams y col. para esta reacción (entrada 1, Tabla 4.3) se obtiene el compuesto **3** en moderado rendimiento luego de 16 h de reacción a temperatura ambiente. Cuando se llevó a cabo la síntesis asistida por radiación de microondas se logró aumentar los rendimientos y disminuir drásticamente los tiempos de reacción (entradas 3 y 4, Tabla 4.3). La mejor condición de reacción encontrada fue irradiando la mezcla de reacción a 400 W de potencia durante 5min en presencia de THF como disolvente de reacción. También

observamos que llevando a cabo la reacción a T amb durante 4 h en THF se obtuvo el derivado 3 en muy buen rendimiento (entrada 2, Tabla 4.3).

La elección de este disolvente radica en la facilidad de eliminar del medio de reacción la dicitohexilurea formada como producto secundario de reacción, ya que esta es insoluble en THF. En la Figuras 4.2-4.4 se muestran los espectros de ^1H -RMN, HSQC y HBMC correspondiente al derivado 3, donde se observan las señales correspondientes a los distintos tipos de protones y carbonos presentes en la molécula.

Entrada	Reactivos	Condiciones ^a	Rendimiento (%) ^b
1	2 /DCC/NHS	T.amb, 16 h, DMF	38
2	2 /DCC/NHS	T.amb, 4h, THF	84
3	2 /DCC/NHS	200W, 20 min, THF	50
4	2 / DCC/NHS	400 W, 8min , THF	82

Tabla 4.3: Condiciones estudiados para la obtención de Suc-HYNIC-Boc. En la tabla se muestran reactivos, medio de reacción, condiciones de calentamiento. ^b Calentamiento por microondas, T amb (Temperatura ambiente). ^b Se informa % de rendimiento obtenido luego del proceso de purificación.

En el espectro de ^1H -RMN se puede apreciar claramente el patrón característico para los protones aromáticos Hb-d, presentes en un anillo de piridina (sistema electrónico π deficiente) disustituido con un grupo electrón donador por efecto resonante (posición 6 del anillo) y con un grupo electrón aceptor por efecto resonante (posición 3 del anillo). El Hd resulta claramente el protón que aparece más blindado a 6.84 ppm, por lo tanto a campos más altos (desplazamientos más bajos), por el efecto electrónico sobre el anillo heterocíclico del grupo hidrazino protegido. En el otro extremo se encuentra el Hb más desblindado a 8.81 ppm (campos más bajos o desplazamientos más altos), por efecto tanto electrónico del anillo de piridina, efecto resonante e inductivo del heteroátomo (Figura 4.5), como por el efecto electrónico del grupo éster. Por otra parte, las señales como singuletes a 1.46 ppm (integración 9H) y a 2.95 ppm (integración 4H), corresponden al agrupamiento Boc y Suc, respectivamente.

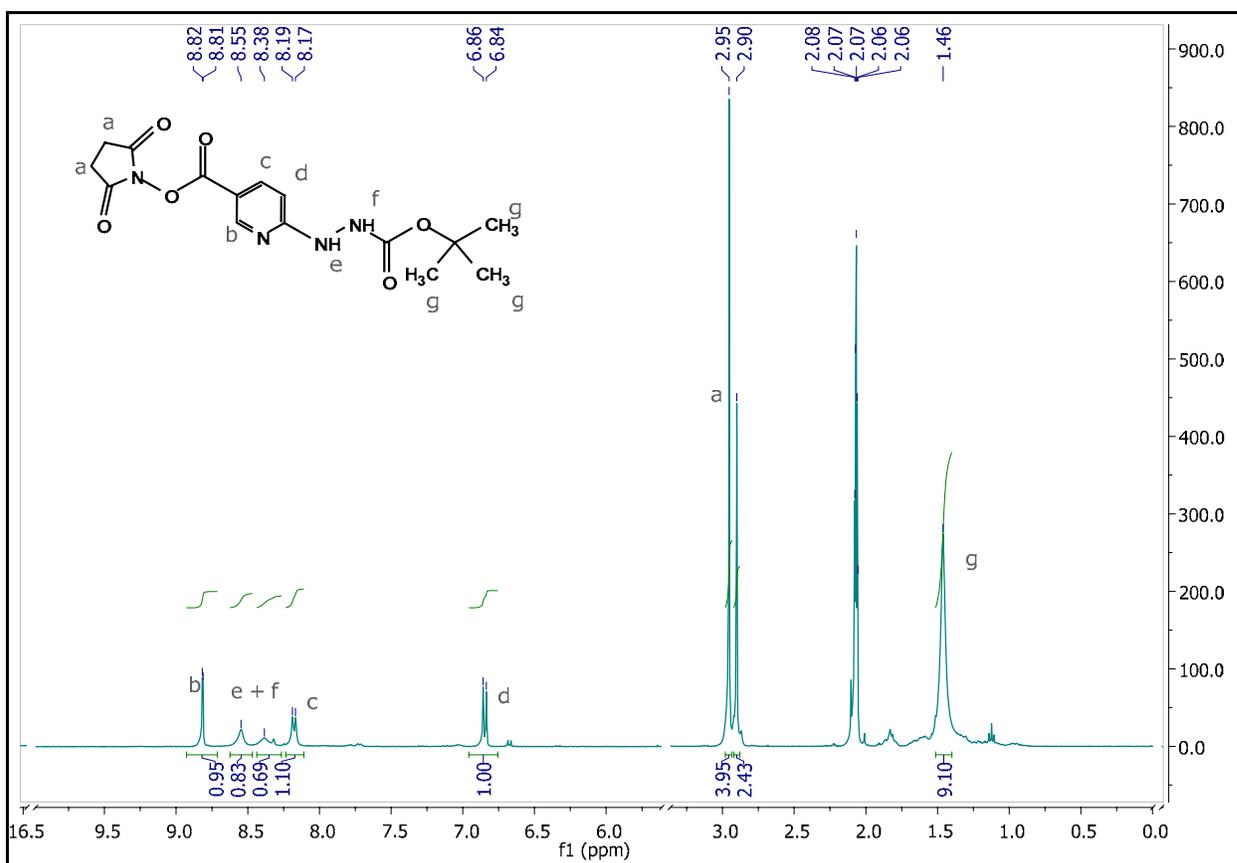
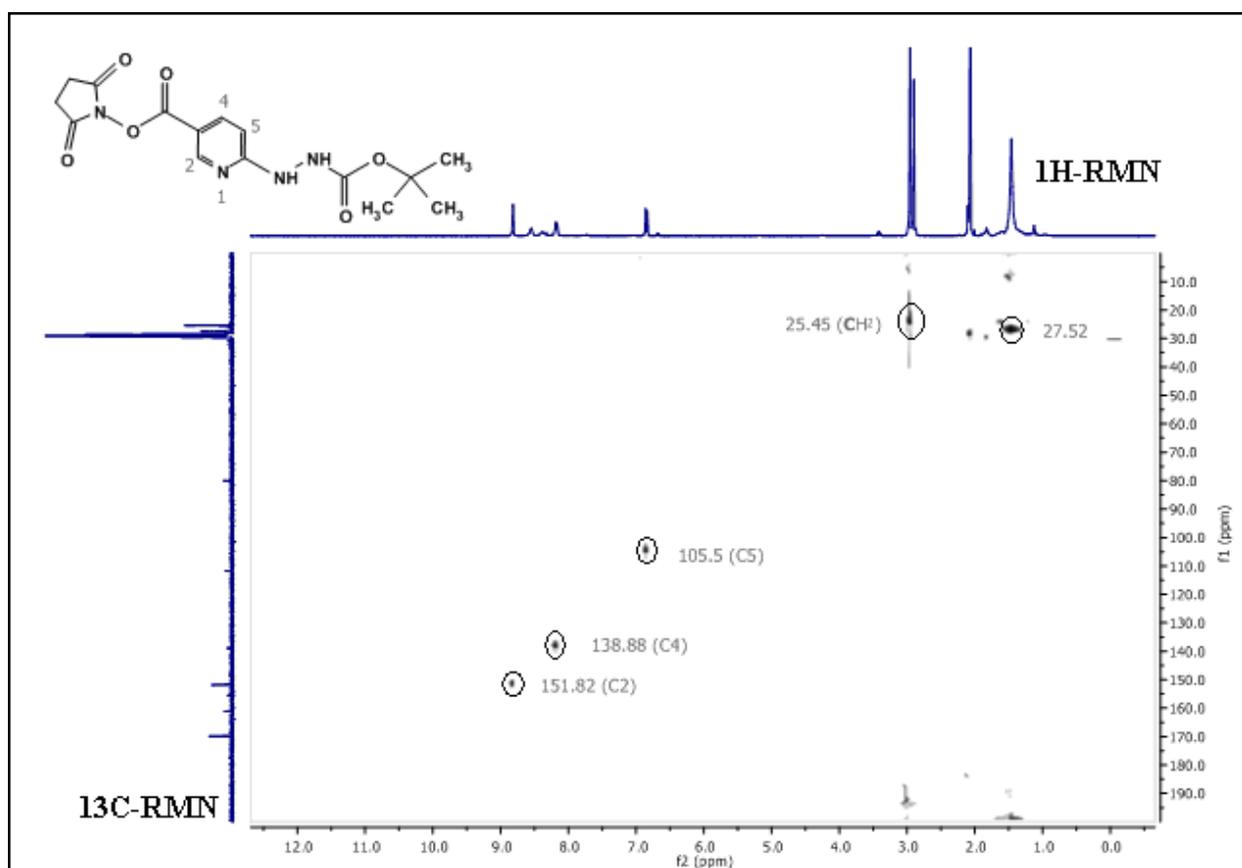


Figura 4.2. Espectro de ^1H -RMN en acetona- d_6 de Suc-HYNIC-Boc

En el espectro HSQC (Figura 4.3) se puede apreciar claramente la correlación bidimensional de cada tipo de protón con su correspondiente carbono en la molécula (correlación H-C a un enlace). Las señales de los C 2, 4 y 5 a 151, 138 y 105 ppm, respectivamente, marcan claramente el fuerte efecto electrónico ejercido tanto por el propio anillo heterocíclico como por los dos sustituyentes presentes en la molécula. Por otra parte, del espectro HMBC (correlación H-C a más de un enlace, Figura 4.4) se puede obtener la información para identificar las señales de C que no se encuentran unidos a un enlace con átomos de hidrógeno. Por ejemplo las señales que corresponden al carbono cuaternario del agrupamiento Boc (79 ppm) y al carbono del grupo carbonilo de la amida (169 ppm).

Figura 4.3 Espectro HSQC en acetona-d₆ de Suc-HYNIC-Boc

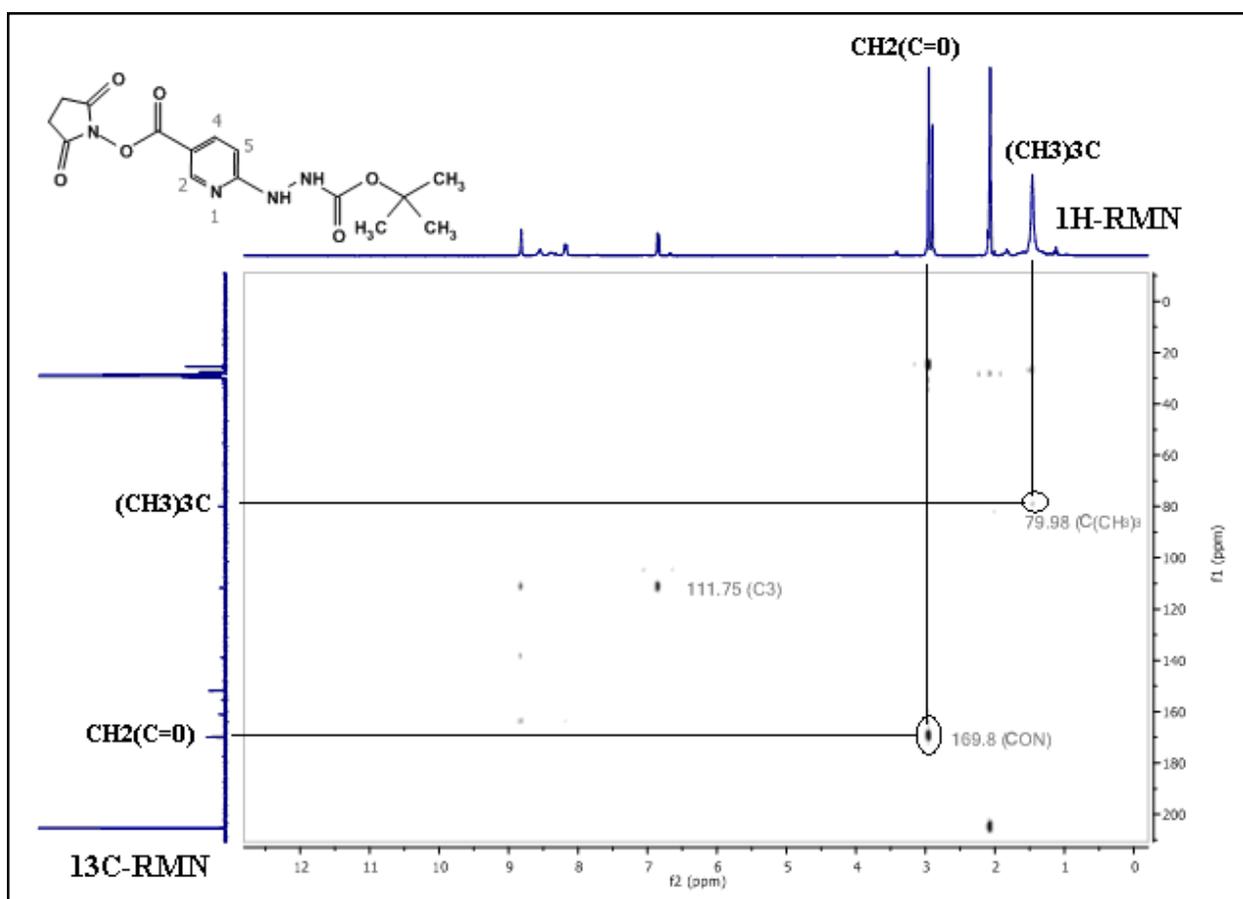


Figura 4.4 Espectro de HMBC en acetona-d₆ de Suc-HYNIC-Boc

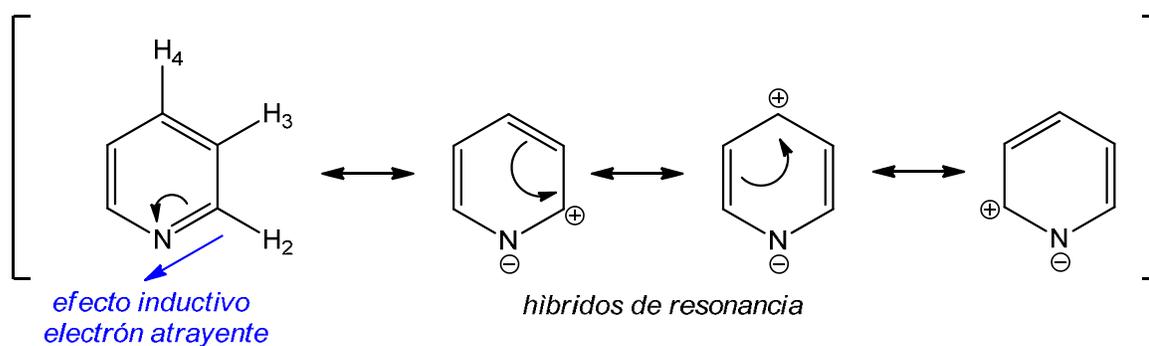


Figura 4.5 Representación de efectos electrónicos presentes en el anillo de piridina.

Finalmente el Suc-HYNIC (**4**) fue obtenido bajo la forma de clorhidrato mediante desprotección del grupo Boc bajo condiciones ácidas (Figura 4.6). Cuando ensayamos condiciones de reacción asistida por radiación de microonda, variando la potencia, temperatura y tiempos de irradiación, no se observaron mejoras en el rendimiento para la obtención del producto deseado **4**.

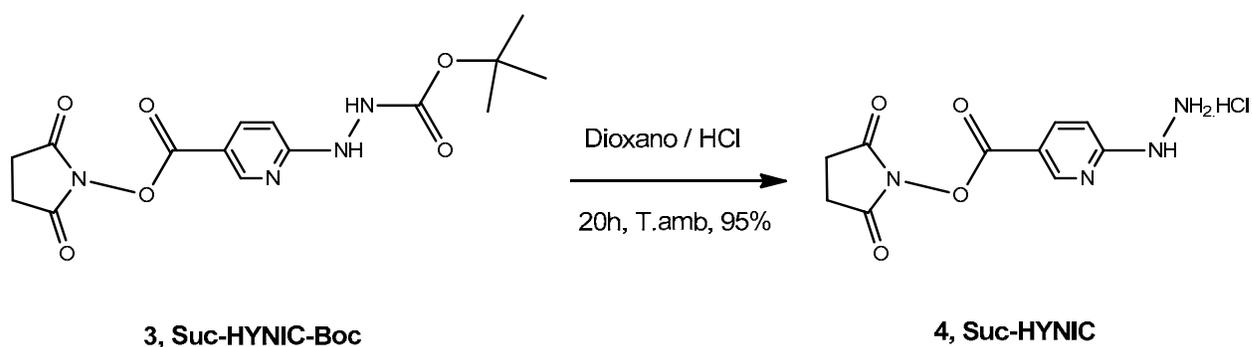


Figura 4.6: Esquema de reacción para la obtención de Suc-HYNIC clorhidrato.

Para la síntesis de los derivados de HYNIC que incorporan el grupo protector trifluoroacetilo, HYNIC-TFA **5** y Suc-HYNIC-TFA **6**, se ensayaron dos metodologías sintéticas las cuales se muestra en la Figura 4.8. Inicialmente utilizando HYNIC **1** como material de partida en presencia de ácido trifluoroacético, bajo radiación de microonda a 80°C durante 10 min (100 W de potencia), se obtuvo el análogo HYNIC-TFA **5** con un rendimiento de 89%. Similar rendimiento fue obtenido cuando se llevo a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 24h. En la Figura 4.7 se presenta el espectro de masa (mediante impacto electrónico, EI-EM) del derivado **5**. En el mismo se observa una relación m/z de 249 correspondiente al ión molecular (M^+), y un patrón de fragmentación en concordancia con la estructura propuesta. Por ejemplo, el fragmento $m/z=180$ de abundancia 100% confirma la fragmentación a través del enlace CF_3-CO , característico de la pérdida del grupo trifluorometilo ($m/z = 69$).

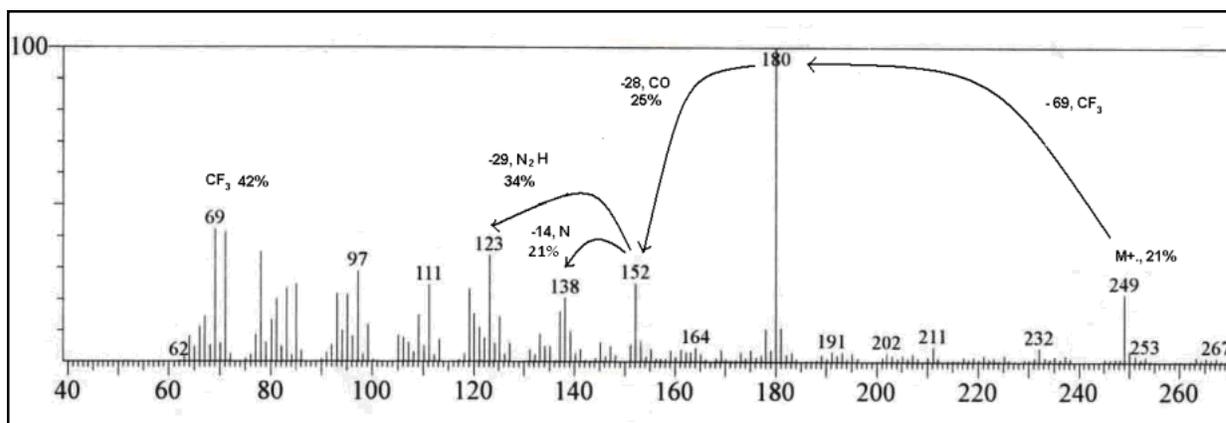


Figura 4.7 Espectro de masa del derivado HYNIC-TFA 5.

Seguidamente, cuando se ensayó sobre el derivado HYNIC-TFA una condición clásica para la obtención del éster activado en presencia de NHS y DCC, no fue posible obtener el producto deseado **6**. En base a este resultado, para la obtención de Suc-HYNIC-TFA se procedió a la reacción de Suc-HYNIC-Boc **4** en presencia de un exceso de ácido trifluoroacético. Cuando esta reacción se realiza en un largo período de tiempo, en una primera etapa se daría la desprotección del grupo Boc, seguida de la reacción de trifluoroacetilación del grupo hidrazino. Rendimiento similar (89%) se obtuvo para el compuesto **6** con una disminución notoria del tiempo de reacción cuando se aplicó radiación de microondas durante 10 min a 80°C.

El derivado Suc-HYNIC-TFA se caracterizó mediante RMN y EM. En las Figuras 4.9 y 4.10 se muestran los espectros de ^1H y ^{13}C RMN, respectivamente. En el espectro de ^1H RMN del producto **6**, es posible apreciar las señales típicas del anillo de piridina en la región de aromáticos. Las señales de NH del grupo hidrazino aparecen más desblindados (desplazamientos más altos) respecto de las señales que aparecen para el análogo Suc-HYNIC-Boc. Esto se podría explicar tanto por efecto inductivo electrón atrayente del agrupamiento trifluoroacetilo, como por la formación de enlace de hidrógeno intramolecular entre F y HN (formación de anillos de 5 y 6 miembros). En la caracterización mediante ^{13}C RMN del producto **6**, se observa un acoplamiento heteronuclear a uno ($\text{F}_3\text{-C-}$) y dos ($\text{F}_3\text{C-CO}$) enlaces entre ^{13}C y los átomos de F del grupo trifluoroacetilo (Figura 4.10). Este tipo de acoplamiento se debe a que el flúor natural es 100% monoisotópico apareciendo como ^{19}F con un número cuántico de espín $I = \frac{1}{2}$, por lo tanto producirá acoplamiento con el ^{13}C .

Es así, que las señales de los átomos de carbono, se desdoblan por el acoplamiento con el flúor, llegando a percibirse dicho fenómeno en las señales de los átomos de carbono ubicados hasta cuatro enlaces. Así resulta factible de verificar la presencia de flúor (F) en la molécula mediante la Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13, ya que la presencia del átomo de flúor tiene un acoplamiento característico de más de 100 Hz a un enlace y de varias decenas de Hz en el segundo enlace, dependiendo de la molécula en cuestión [125]. En este sentido, para nuestro compuesto **6** observamos en el espectro de ^{13}C RMN una señal como cuarteto a 115 ppm con una $J=287$ Hz (acoplamiento a un enlace) y otra señal (cuarteto, acoplamiento a dos enlaces) a 156 ppm con una $J=36$ Hz (Figura 4.10). Por lo tanto, los acoplamientos ^{13}C - ^{19}F resultan útiles para determinar la presencia de este elemento en compuestos orgánicos.

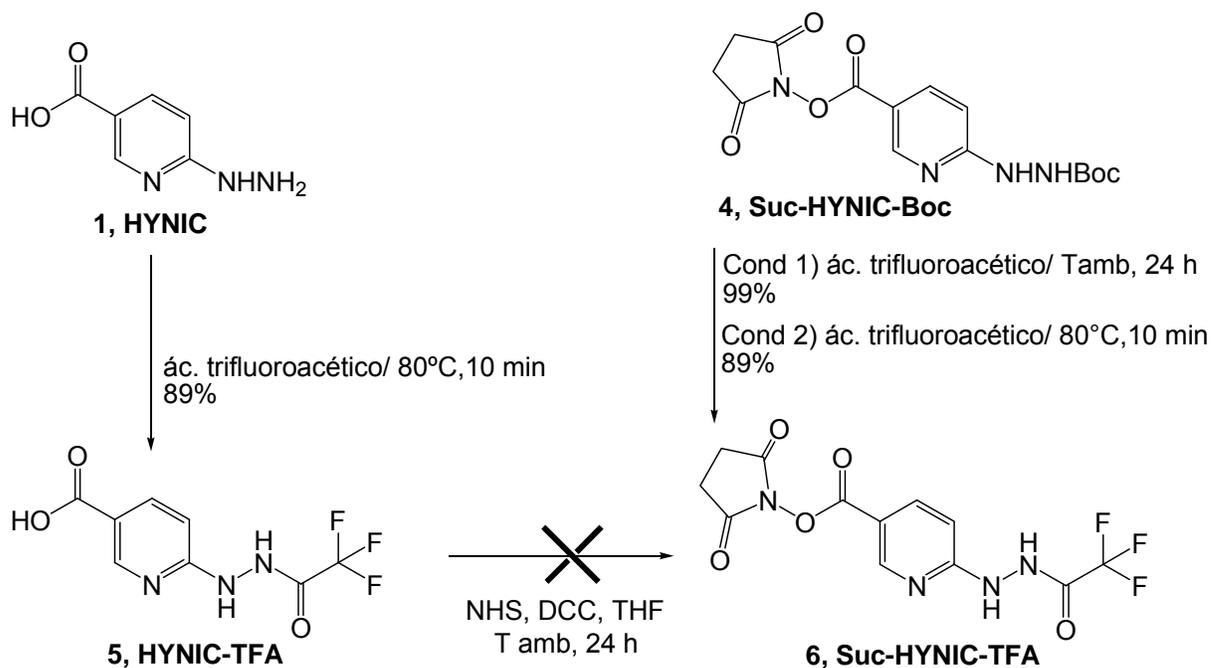


Figura 4.8: Condiciones estudiadas para la obtención de los derivados 5 y 6.

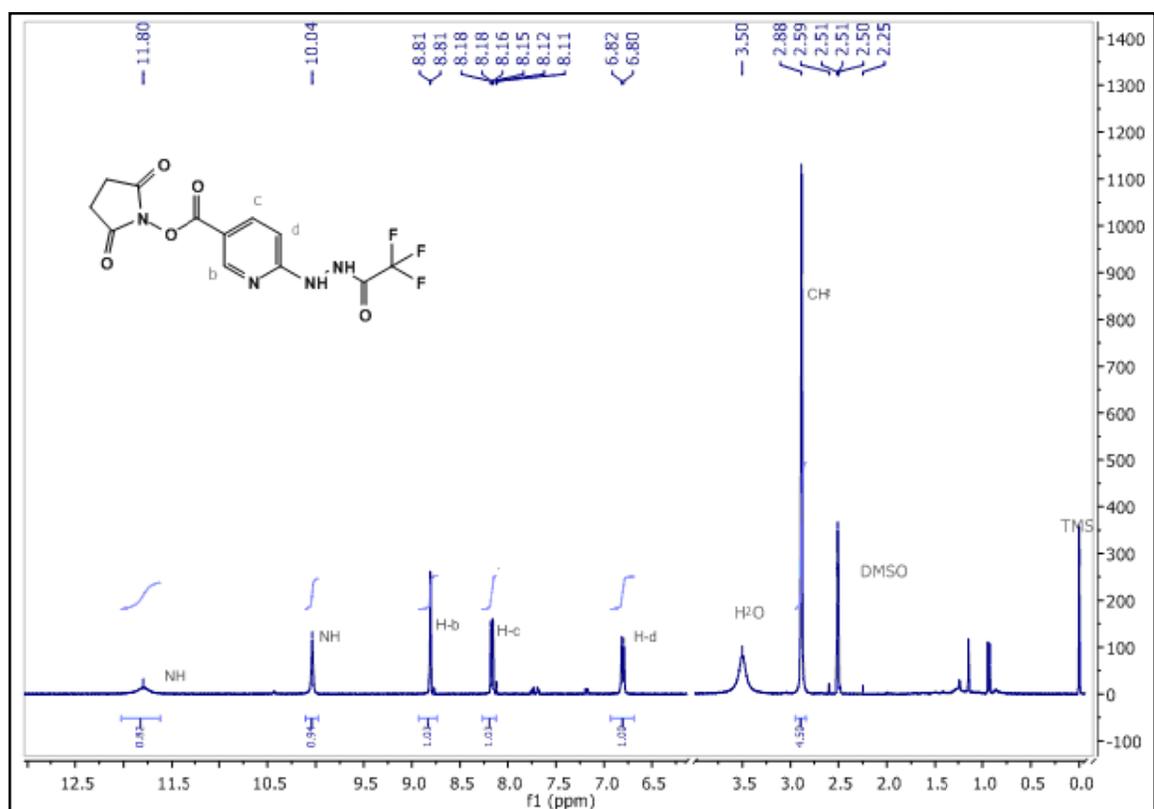


Figura 4.9: Espectro de ¹H-RMN en DMSO_{d6} de Suc-HYNIC-TFA

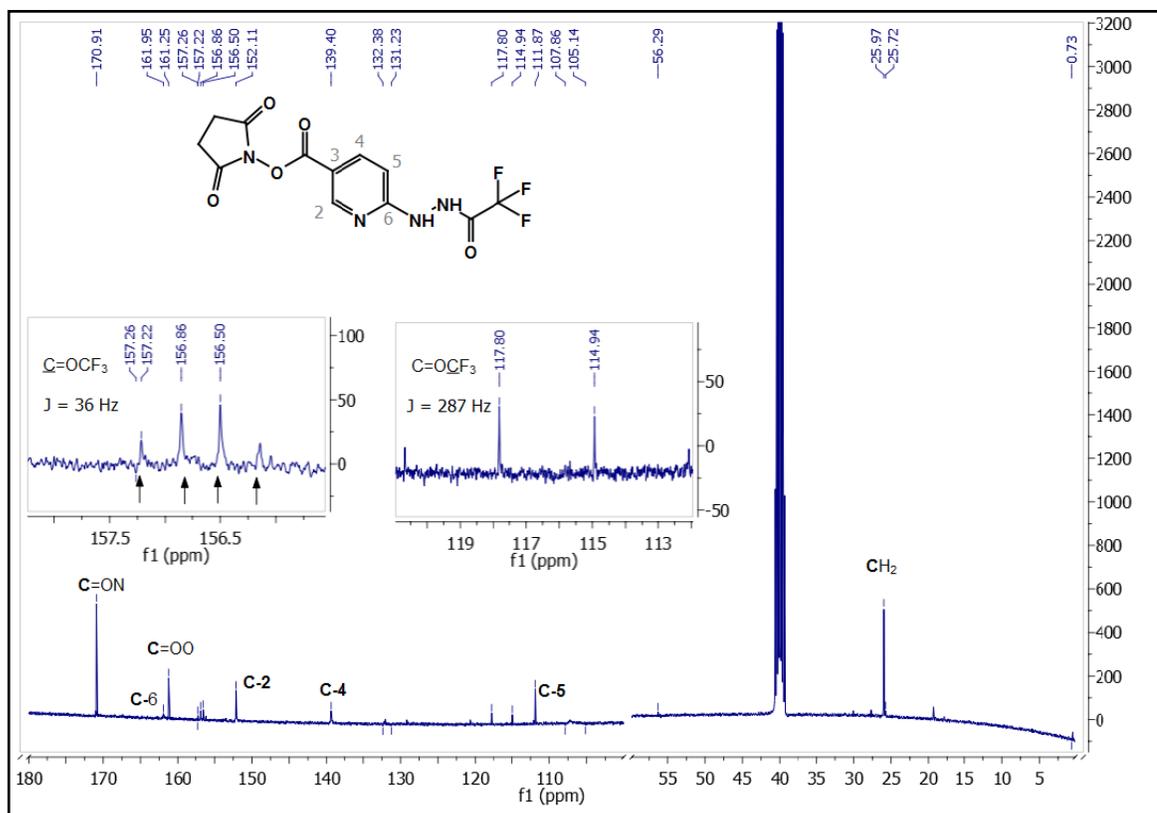


Figura 4.10: Espectro de ¹³C RMN en DMSO_{d6} de Suc-HYNIC-TFA

La obtención de un análogo de HYNIC protegido con el grupo hidrazona se realizó mediante una metodología sintética convencional (Figura 4.11). En este sentido, el grupo hidrazino de HYNIC es protegido por formación de una hidrazona, a través de reacción de condensación del grupo hidrazino con benzaldehído. El paso siguiente consistió en la activación del grupo ácido carboxílico por la formación del éster **7**, para su estudio como agente bifuncional en la conjugación al péptido análogo de alfa-MSH en solución. Bajo estas condiciones el éster activado **7** fue obtenido en bajo rendimiento, lo cual se puede deber a la presencia de agua en el disolvente de reacción, provocando hidrólisis de la hidrazona y/o del éster activado.

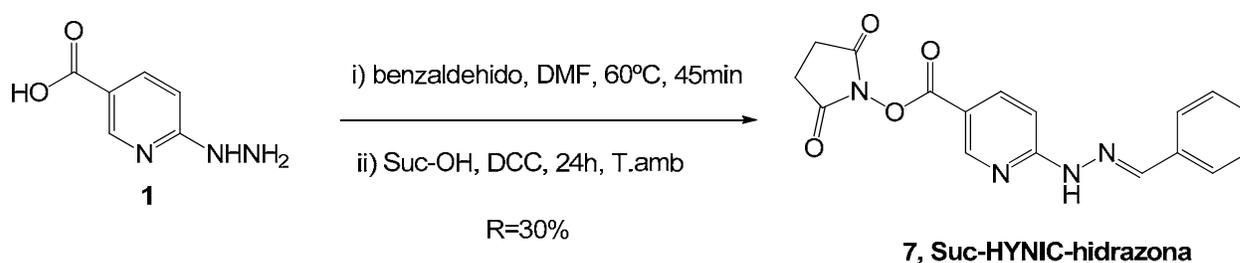


Figura 4.11: Metodología sintética para la obtención de Suc-HYNIC-hidrazona 7.

4.4.2 Derivados de *N*-óxido de Piridina

Como un estudio inicial en la aproximación al desarrollo de un radiofármaco PET nos planteamos el diseño y la síntesis de derivados del sistema heterocíclico *N*-óxido de piridina, para su unión a la biomolécula en estudio e incorporación del radionucleido ^{18}F mediante reacción de sustitución nucleofílica aromática. Si bien la funcionalidad *N*-óxido en el anillo de piridina es un activador frente a la $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ por efecto dador de electrones (Figura 4.12), la $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ a nivel del C-6 se vería favorecida mediante un mecanismo de adición-eliminación vía un anión estabilizado por la función *N*-óxido y por la presencia de un adecuado grupo saliente. Es así que en este período de trabajo y en base a que nuestro laboratorio contaba con el Ácido 6-cloronicotínico, un derivado de piridina adecuadamente sustituido en C6 con un grupo saliente, el cual fue utilizado en la síntesis de los derivados de HYNIC, nos plantemos un camino sintético para la obtención de los grupos prostéticos derivados de *N*-óxido de 6-Fluoropiridina (Figura 4.13).

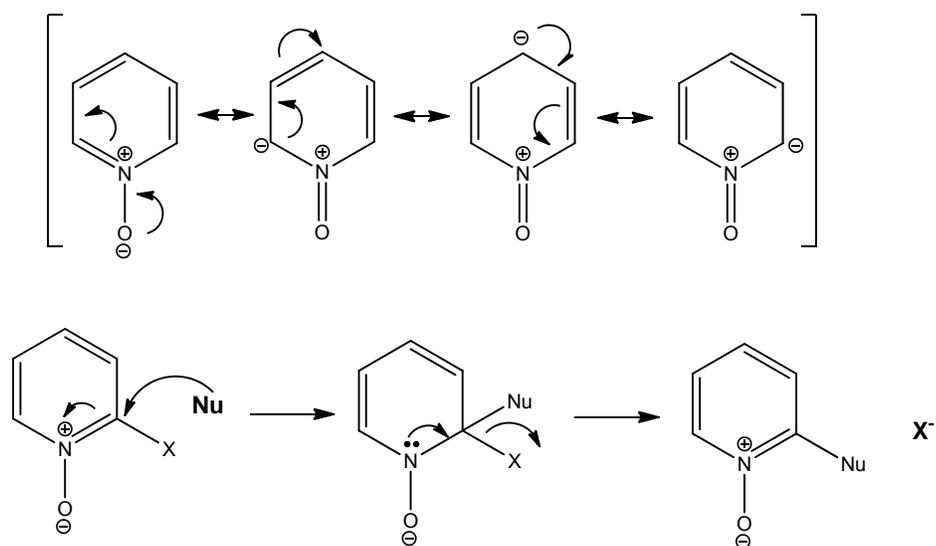


Figura 4.12: Reactividad del sistema *N*-óxido de piridina

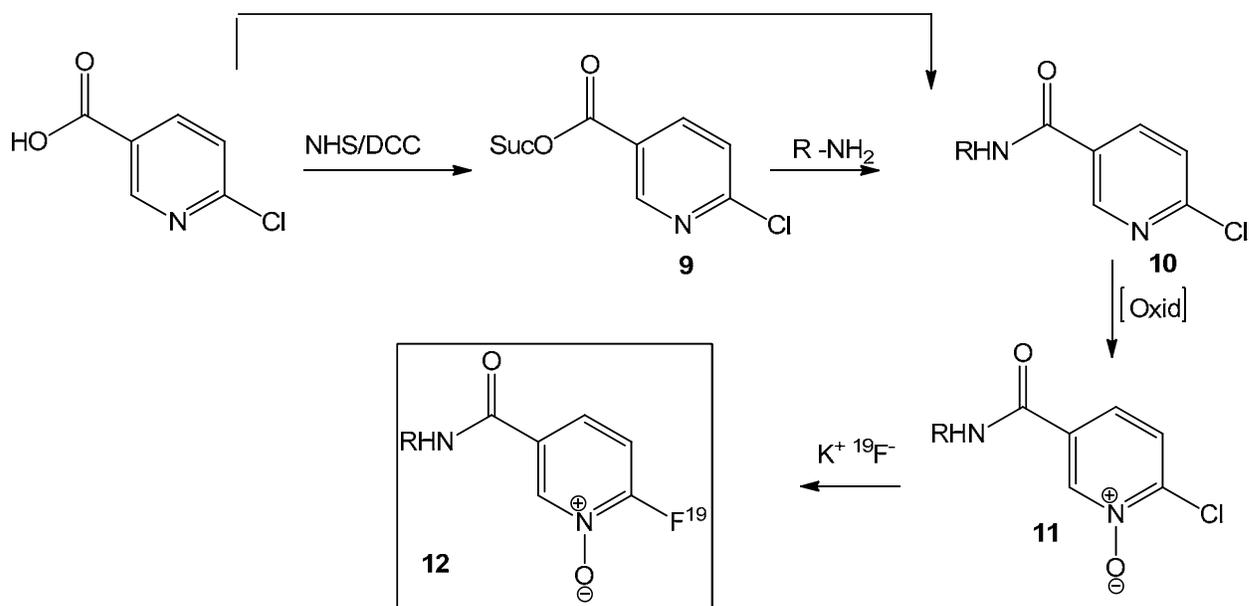
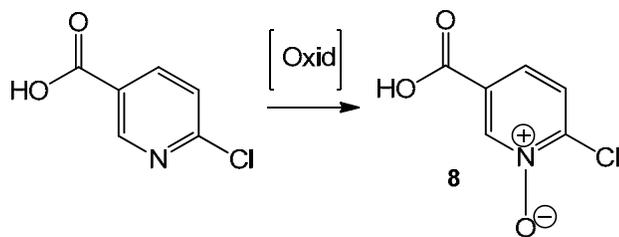


Figura 4.13: Metodología sintética propuesta para la obtención de los derivados de *N*-óxido de 6-Fluor-nicotinamida

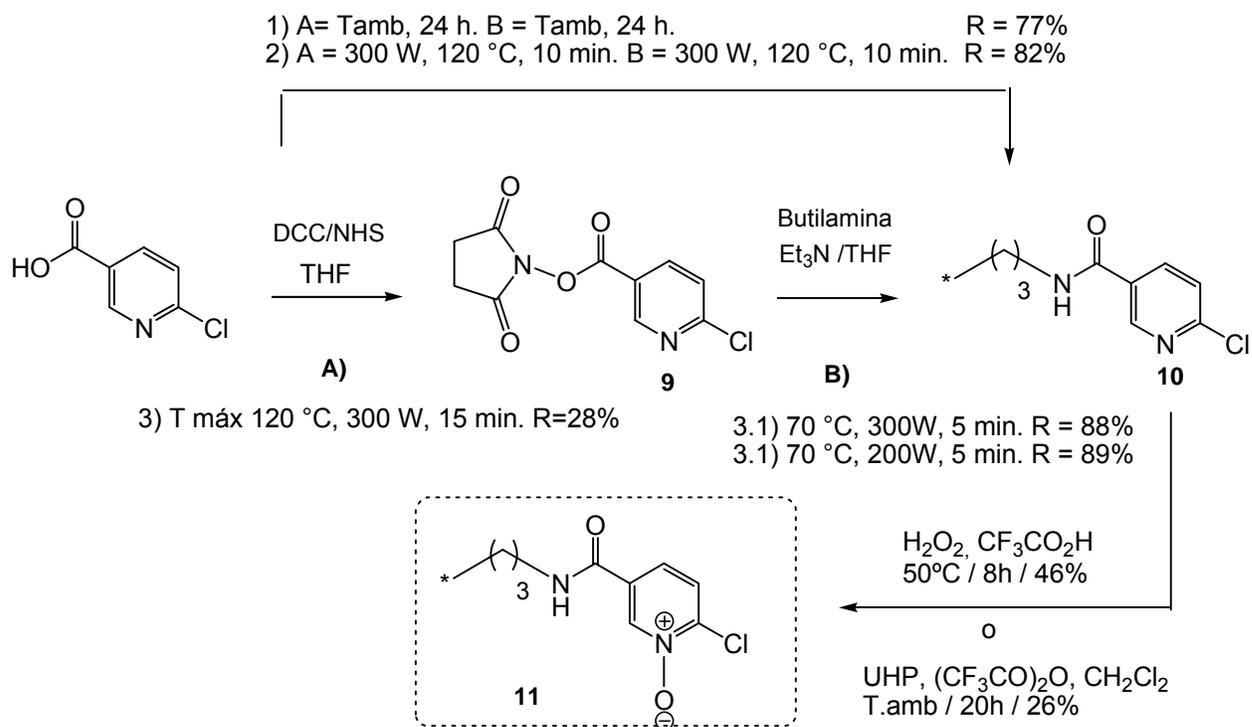
En primer lugar, la obtención del derivado **8** se llevó a cabo como modelo de reactividad para estudiar condiciones de oxidación del anillo de piridina. Con este objetivo, se evaluaron distintas condiciones de oxidación del Ácido 6-cloronicotínico, las que se resumen en la Tabla 4.4. En las condiciones correspondientes a las entradas 1 y 2 (Tabla 4.4) se utilizó agua oxigenada 100 vol de concentración como agente oxidante. Bajo estas condiciones de reacción fue necesario el uso de gran exceso de agente oxidante durante largos tiempos de reacción para la obtención del derivado **8** en buenos a moderados rendimientos. Además, cuando utilizamos otro agente oxidante, más estable y manejable como el complejo urea peróxido (UHP) (entrada 3, Tabla 4.4), obtuvimos el compuesto deseado **8** con similar rendimiento en corto tiempo de reacción.

Con el fin de obtener un análogo que simule el efecto en la reactividad de un enlace peptídico, se utilizó la butilamina como amina reactiva para la formación del enlace amida, en el derivado **11** por ejemplo. En un primer paso se evaluaron condiciones de reacción tanto a temperatura ambiente como calentamiento por radiación de microondas para la obtención de la butilamida **10**, utilizando como reactivos de partida, tanto el ácido 6-cloro nicotínico como el éster activado **9** (Figura 4.14). Bajo las condiciones ensayadas los productos de interés se obtuvieron en forma sencilla y con buenos rendimientos globales, reduciendo los tiempos de reacción al aplicar energía de microondas.

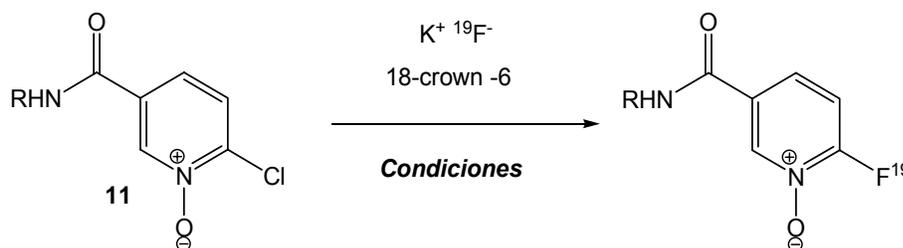
Posteriormente, condiciones similares de oxidación fueron ensayadas para la obtención del *N*-óxido de piridina **11** a partir de la butilamida **10**. Cuando se utilizó el complejo UHP y anhídrido trifluoroacético como mezcla oxidante en diclorometano a temperatura ambiente, el compuesto deseado fue obtenido en bajo rendimiento (Figura 4.14). Mientras que un moderado rendimiento se obtuvo cuando se utilizó agua oxigenada 30% (100 volúmenes de concentración) y ácido trifluoroacético como sistema oxidante.



Entrada	Condiciones	Rendimiento (%)
1	H ₂ O ₂ , CH ₃ CO ₂ H / T amb, 24 h	50
2	H ₂ O ₂ , CF ₃ CO ₂ H / 50°C, 18 h	76
3	UHP, (CF ₃ CO) ₂ O, ACN/ T amb, 1 h	45

 Tabla 4.4: Condiciones de oxidación ensayadas para la obtención del *N*-óxido del ácido 6-cloronicotínico.

 Figura 4.14: Síntesis de la *N*-butil 6-cloro-nicotinamida 10.

Finalmente se estudiaron distintas condiciones de S_NAr a partir del derivado de *N*-óxido de piridina **11** en presencia de $^{19}F^-$, donde distintos tiempos de reacción, disolventes y temperaturas fueron evaluadas (Tabla 4.6). El seguimiento de las reacciones fue determinada mediante CCF y 1H -RMN. Cuando se utilizó ACN como disolvente a diferentes tiempos de reacción y temperaturas, desde temperatura ambiente a calentamiento a reflujo ($77^\circ C$), se recuperó el 100% del material de partida en todos los casos. Dado estos resultados, decidimos ensayar otros disolventes de reacción a temperaturas más elevadas. Cuando se estudió la S_NAr sobre el derivado **11** a $150^\circ C$ durante pocos minutos bajo radiación de microondas en presencia de DMSO o DMF, se recupera únicamente el reactivo de partida. Sin embargo al utilizar DMSO como disolvente calentando a $120^\circ C$ durante 1 h, se obtuvo un crudo de reacción formado por una mezcla compleja de productos. A través de la espectroscopía de 1H RMN se identificaron 5 productos (derivados **10-14**, Figura 4.15), los cuales se resumen en la Tabla 4.6.



Disolvente	Condiciones	Productos ^a
CH₃CN	T amb, 24 h	100 % Reactivo de partida 11
	50 °C, 1h	100 % Reactivo de partida 11
	reflujo 2 h	100 % Reactivo de partida 11
DMSO	120°C, 1h	Mezcla de compleja productos: 10 , 11 , <i>N</i> -butil-6-fluor-nicotinamida 12 <i>N</i> -Óxido de <i>N</i> -butil-6-fluor-nicotinamida 13 <i>N</i> -Óxido de <i>N</i> -butil-6-hidroxi-nicotinamida 14
	Tmáx 150 °C, 10 min, 300W	100 % Reactivo de partida 11
DMF	Tmáx 150 °C, 12 min, 400W	100 % Reactivo de partida 11

Tabla 4.5: Condiciones de reacción ensayadas para la obtención de *N*-Óxido de *N*-butil-6-fluor-nicotinamida.

^aEl seguimiento de la reacción se realizó mediante 1H RMN

Entre los productos identificados se encontraron los derivados **11** y **10**, este último resultado de una desoxigenación del reactivo de partida. Esto se puede deber a la presencia de agua en el disolvente de reacción y al ataque de un segundo equivalente de $^{19}\text{F}^-$ para formar fluor molecular, como se representa en el mecanismo propuesto de la Figura 4.15 (A). Además, en el crudo de reacción se identificaron señales de protones aromáticos con acoplamiento ^1H - ^{19}F correspondientes a la *N*-butil-6-fluoro-nicotinamida **12** y al *N*-Óxido de *N*-butil-6-fluoro-nicotinamida **13**. Otro derivado, también presente en la mezcla, sería el producto de sustitución con H_2O o ^-OH , este último generado en la deoxigenación del derivado **11**, el derivado de *N*-Óxido de *N*-butil-6-hidroxi-nicotinamida **14**. Indicativo de este producto, es la presencia de una señal en el ^1H -RMN a 6.50 ppm (doblete blindado) correspondiente al protón H5, lo cual sugiere la presencia de un grupo dador electrónico por efecto resonante en posición 6, como el grupo hidroxilo. En base a los resultados obtenidos dirigidos a la obtención de *N*-Óxido de 6-fluor-nicotinamida y como proyección de este trabajo, sería conveniente estudiar condiciones de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ utilizando derivados de nicotinamida sustituidos con otros grupos funcionales que constituyan mejores grupos salientes, como por ejemplo sustituyentes NO_2 o $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$. Dado que no se disponía en nuestro laboratorio de precursores adecuados, que su síntesis involucraría varios pasos sintéticos de optimización y al tiempo de trabajo en esta tesis, este punto será estudiado más adelante en nuestro grupo de investigación.

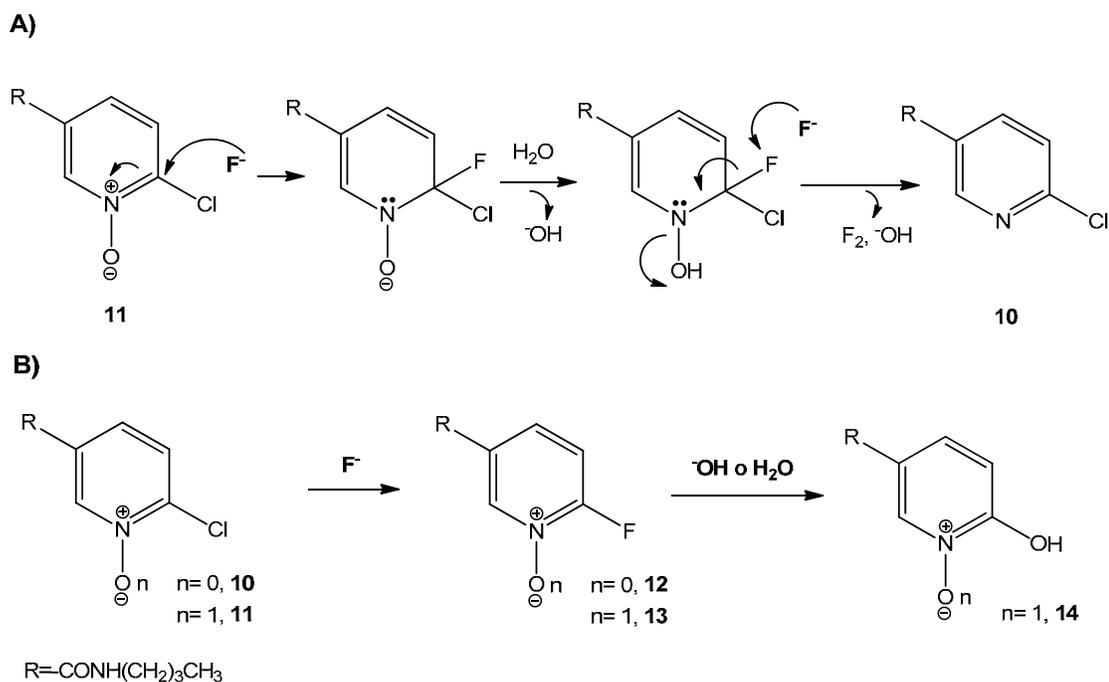


Figura 4.15: Productos identificados en la $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ a partir del derivado de *N*-óxido de piridina.

***5 Marcación y evaluación de
análogos de α -MSH con ^{99m}Tc***

5.1 Metodología experimental: Generalidades

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales para la obtención de análogos de α -MSH, su marcación con ^{99m}Tc y su caracterización biológica. A continuación se describen reactivos y materiales utilizados.

Nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA); Tricina, SnCl_2 , DMSO, Trietilamina, Acetato de Etilo (J. T. Baker); H_2O bidestilada; NaCl (Fluka-Garantie); Acetona (May & Baker); EtOH (BioPak), HCl (36,5-38,0%) (Merck); ITLC-SG (Pall Corporation); Whatman 1 mm (Whatman International Ltd); Generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc (TecnoNuclear).

Se emplearon los siguientes equipos:

Calibrador de dosis Capintec CRC7, Contador de centelleo sólido de pozo: detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC).

HPLC fueron realizados en un equipo Agilent Serie Infinity 1200 equipado con detector GABI Star y una columna de fase reversa C18 (300 mm x 4.6 x 10 μm) Thermo Scientific Hypersil ODS, el detector UV se estableció en 280 nm. A continuación se describen los métodos utilizados, **Método 1:** gradiente de 35 min utilizando como fase móvil Agua/TFA 0.1% (A) y ACN/TFA 0.1% (B), 0-10 min 0-45% B, 10-30 min 45-65% B, 30-35 min 100% B. **Método 2:** gradiente lineal Agua/TFA 0.1% (A) y ACN/TFA 0.1% (B), 0-20 min 0-100% B.

Cromatografía en capa fina se realizó utilizando ITLC-SG con distintas fases móviles, NaCl 0.9% se utilizó para ^{99m}Tc -coligando y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$), 50% ACN para determinar ^{99m}Tc -coloide ($R_f = 0$).

Las imágenes centellográficas se realizaron en una gamma cámara (Modelo Sophy DSX, Sopher Medical, Buc, France); conectada en serie con un sistema computacional (Mirage Segami, Columbia, MD) calibrado para detectar la radiación gamma de 140 keV del ^{99m}Tc .

Las imágenes micro-SPECT y micro-CT se realizaron en un equipo MicroCAT IITMCT/SPECT; Siemens Pre-Clinical Solutions, Knoxville, TN.

5.2 Estudio de las condiciones de desprotección de los derivados de HYNIC

Procedimiento general para la marcación de los derivados de HYNIC con ^{99m}Tc .

En primer lugar, a 20 μL de HYNIC, HYNIC-Boc y HYNIC-TFA disueltos en DMSO (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se les añadió 150 μL de una solución de tricina (100 mg/mL en agua, 83.7 μmol), 15 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/mL en HCl 0.1 M, 66.5 nmol, previamente purgado con corriente de N_2) y 100 μL of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (37-111 MBq). La mezcla se incubó durante 30 min a 75 $^\circ\text{C}$, pH final 5 y se controló por HPLC. La pureza radioquímica se determinó mediante cromatografía en capa fina utilizando ITLC-S y ACN 50% como fase móvil.

Estudios de condiciones de desprotección para los derivados de HYNIC.

Los derivados HYNIC, HYNIC-Boc y HYNIC-TFA fueron disueltos en DMSO seco a una concentración 2 mg/mL. Posteriormente fracciones de 40 μg (20 μL) de los ligandos fueron diluídos (volumen final 200 μL) con un buffer acetato de sodio 0.1 M (pH 5) o con buffer fosfato 0.01M (pH 7.4). Las mezclas fueron incubadas a 20, 37 y 75 $^\circ\text{C}$ durante 45 min y fueron evaluadas mediante HPLC. Todos los controles de HPLC fueron realizados utilizando el método 1, como se describió anteriormente.

5.3 Síntesis de análogos de alfa- MSH derivatizados con HYNIC.

La síntesis y caracterización de los análogos peptídicos alfa-MSH-cíclico-Renio y HYNIC.cyc-MSH se llevaron a cabo en el Laboratorio del Dr. Fabio Gallazzi , Structural Biology Core, University of Missouri, Columbia (USA). La síntesis del análogo alfa-MSH-cíclico-Renio fue llevada a cabo según la metodología de síntesis en fase sólida que se describe en literatura [125].

5.4 Ensayo in vitro de unión competitiva

La concentración de péptido requerida para inhibir el 50% de unión del radioligando o IC_{50} , es determinada incubando ^{125}I -Tyr²-NDP con concentraciones crecientes de HYNIC-cyc-MSH. Con este fin, 0,5 millones de células B16/F1 son incubadas en placa estéril de 24 pocillos, en medio de cultivo DMEM (conteniendo 25mM HEPES, BSA 0.2%), durante 24 hs a 37° C. Luego de lavar las células con medio de cultivo, cada pocillo es incubado durante 2 h; con aproximadamente 50.000 cpm de ^{125}I -Tyr²-NDP y concentraciones crecientes de HYNIC-cyc-MSH en un rango de 10^{-11} a 10^{-6} M en presencia de 0,3 mL de medio de unión. Se colecta el medio de unión, se lavan las células con PBS (1X, 0,2% BSA, pH 7.4) y se lisan con 0,5 mL de NaOH 1M durante 5 min. Finalmente se mide la radioactividad presente en las células, en un contador de pozo de NaI. La curva de unión competitiva se obtiene graficando % de unión ^{125}I -Tyr²-NDP en función de la concentración de HYNIC-cyc-MSH. El valor de IC_{50} se obtuvo utilizando el Software GraphPad Prism.

5.5 Marcación con ^{99m}Tc de análogos de α -MSH-HYNIC

5.5.1 Condiciones de marcación

Se estudiaron distintas condiciones de marcación de cyc-MSH-HYNIC con ^{99m}Tc utilizando Tricina, EDDA y ácido Nicotínico como coligandos. Para las marcaciones con ^{99m}Tc se utilizó como agente reductor SnCl_2 . Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N_2 gas. Las purzas radioquímicas se determinaron por HPLC método 2 y en CCF utilizando ITLC-SG.

Coligando Tricina

Ciento cincuenta μL de una solución de Tricina (100 mg/mL en H_2O , 83.7 μmol) es añadida a 20 μg de HYNIC-cyc-MSH (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 14.6 nmol), seguidamente se adicionan 15 μL de una solución de SnCl_2 recién preparada (1 mg/mL en 0.1 M HCl, 66.5 nmol) y 37-400 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (hasta 500 μL). Posteriormente se controla pH 4.5 y se incuba durante 20 min a 50 °C en un baño de agua.

Coligando EDDA

Doscientos cincuenta μL de una solución de EDDA (20 mg/mL en PBS, pH 7, 0.01M, 28.4 μmol) es añadida a 20 μg de HYNIC-cyc-MSH (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 14.6 nmol), seguidamente se adicionan 15 μL de una solución de SnCl_2 recién preparada (1 mg/mL en 0,1 M HCl, 66.5 nmol) y 45-333 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (hasta 500 μL). Posteriormente se controla pH 6 y se incuba durante 30 min a 70 °C en un baño de agua.

Coligando Tricina-Ácido Nicotínico

En un vial 8 mg de tricina (0.047 mmol) y 1.4 mg de ácido nicotínico (0.013 mmol) se solubilizan en 0,8 mL de agua y se adiciona 0,05 mL de HCl 2.0 M. En el otro vial 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se solubilizan en 0.5 mL de HCl 2.0 M y 0.05 mL de esta solución se incorporan al vial que contiene la solución de coligandos. Finalmente se ajusta el volumen total de la solución a 10 mL con NaCl 0.9%. Para la marcación se incuba durante 30 min a 50 °C, una mezcla que contiene 20 μg de HYNIC-cyc-MSH (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 14.6 nmol), 15 μL de la solución SnCl_2 /Coligandos, 148 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a un pH final 5 (acetato de amonio 1 M).

Coligando Tricina-EDDA

En un vial 8 mg de tricina (0.047 mmol) y 4 mg de EDDA (0.057 mmol) se solubilizan en 0,8 mL de agua y se adiciona 0.05 mL de HCl 2.0 M. En el otro vial 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se solubilizan en 0.5 mL de HCl 2.0 M y 0.05 mL de esta solución se incorporan al vial que contiene la solución de coligandos. Finalmente se ajusta el volumen total de la solución a 10 mL con NaCl 0.9%. Para la marcación se incuba durante 30 min a 50 °C, una mezcla que contiene 20 μg de HYNIC-cyc-MSH (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 14.6 nmol), 15 μL de la solución SnCl_2 /Coligandos, 148 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a un pH final 5 (acetato de amonio 1 M).

5.5.2 Purificación de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH

El control y separación de los complejos peptídicos marcados se realizó mediante HPLC utilizando el método 1. Posteriormente se diluyó la fracción purificada con aproximadamente 500 μL de PBS 0.1 M pH 7.4 y se redujo el ACN aplicando una corriente de N_2 . Finalmente, se controla pH y se añade PBS 0.1 M pH 7.4 en caso de ser necesario.

5.5.3 Coeficiente de partición o Log P

Para evaluar los valores de Log P, se purificaron por HPLC distintos conjugados de HYNIC-cyc-MSH marcados con ^{99m}Tc utilizando Tricina, EDDA, Tricina-EDDA y Tricina-Ácido Nicotínico como coligandos. El disolvente fue eliminado y los conjugados marcados (20 μCi) fueron reconstituidos en PBS (pH 7.4, 0.1M, 20 mL). Tubos conteniendo 500 μL de Octanol y 500 μL de la fracción de péptido disuelta en PBS, fueron vigorosamente agitados durante 1 min y centrifugados a 14.000 RPM durante 10 minutos. Tres fracciones de 100 μL fueron colectadas de ambas fases, para la medición de cuentas un contador de pozo de NaI. El coeficiente de reparto se obtuvo como el log (cuentas en octanol/cuentas en fase acuosa).

5.5.4 Estabilidad *in vitro*

5.5.4.1 Estabilidad en buffer fosfato salino

Se estudió la estabilidad de los conjugados ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA. Para evaluar la estabilidad *in vitro*, se purificaron por HPLC los conjugados ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA con el método previamente descrito. Se incubó una alícuota de 50 μCi de cada complejo en 500 μL de PBS (0.1M, pH 7.4) a 37° C, durante 1, 2 y 4 h. Cada experimento fue realizado por triplicado y controlado por HPLC. La estabilidad de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina se evaluó en presencia de un exceso de coligando. En este sentido, se incubó una alícuota de 50 μCi del complejo en 400 μL de PBS (0.1 M, pH 7.4) y 100 μL de Tricina (100 mg/mL) a 37° C durante 1, 2 y 4 h.

5.5.4.2 Estabilidad en SFB y unión a proteínas plasmáticas

Para estudiar la estabilidad de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA en Suero Fetal Bovino (SFB), ambos complejos fueron purificados por HPLC con el método previamente descrito. Posteriormente, se incubó una alícuota de 50 μCi en 500 μL de SFB a 37° C, durante 1, 2 y 4 h. Las proteínas fueron precipitadas con 500 μL de ACN y centrifugadas (1750 g, 5 min, 4° C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en contador de pozo de NaI. Finalmente el sobrenadante fue analizado por HPLC para evaluar la estabilidad de los complejos de ^{99m}Tc .

5.5.5 Estudios *in vitro* de unión

Los estudios de unión, internalización y externalización celular fueron realizados en células murinas B16/F1. Medio millón de células B16/F1 se sembraron con medio de cultivo en placa de 24 pocillos, durante toda la noche para permitir la adhesión celular a las mismas. Luego de lavar una vez con medio de cultivo, las células fueron incubadas a 25 °C durante 20, 40, 60, 90 y 120 min con 300.000 cpm en 300 μL de medio DMEM-0.2%BSA y se lavó dos veces con PBS-0.2%BSA pH 7.4, 0.01M. La internalización del radiopéptido se determinó cuantificando el péptido unido a membrana e internalizado. Para esto se lavó las células con una solución buffer ácida (acetato de sodio 40 mM, pH 4.5) con el fin de remover el radiopéptido unido a la membrana. La actividad remanente dentro de las células se obtuvo mediante la lisis con NaOH 1 N durante 5 min. La actividad unida a membrana e internalizada se contó en un detector gamma. Para determinar el grado de externalización celular del péptido marcado, las células fueron incubadas con ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA durante 2 h a 25 °C, luego se removió la actividad extracelular y las células fueron incubadas con 300 μL de medio nuevamente a 25 °C durante 20, 40, 60, 90 y 120 min. Transcurridos los tiempos de incubación respectivos, se midió la actividad presente en el medio, unido a membrana e internalizado.

5.5.6 Evaluación Biológica *in vivo*

La evaluación biológica de los complejos de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución y adquisición de imágenes centellográficas. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Los ensayos fueron realizados en ratones normales C57 BL/6J, entre 6 - 10 semanas de edad y 18-24 g. Se desarrolló un modelo animal de melanoma por inoculación de células tumorales. La línea celular de melanoma murino B16-F1 se obtuvo de la colección American Type Culture Collection y se mantiene en el medio de Dulbecco modificación Eagle (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories GmbH) y glutamina 2 mM (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). Los tumores son inducidos por administración subcutánea de 2.5×10^5 células de melanoma B16-F1 en 0,1 mL de buffer fosfato salino. Luego de 10 a 15 días de la inoculación aproximadamente, los tumores adquieren una masa entre 0.2 – 0.3 g. El volumen del tumor se estima utilizando la

siguiente ecuación (volumen del tumor (mm^3) = $(2d \times D)/2$ donde d and D son el diámetro más corto y el más largo en mm, respectivamente.

5.5.6.1 Estabilidad *in vivo*

La evaluación de la estabilidad *in vivo* de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA fue realizada en ratones normales C57 BL/6J. Ambos complejos fueron purificados por HPLC con el método previamente descrito. Se inyectó una actividad entre 1-3 MBq, por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Luego de una hora se colectó una fracción de orina y se controló por HPLC.

5.5.6.2 Estudios de Biodistribución

Los estudios de biodistribución de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA se realizaron en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma (n=4). Se inyectó una actividad entre 1-3 MBq, por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical luego de 1, 2, 4 y 24 h post inyección. El tumor, órganos y tejidos de interés fueron disecados, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. La actividad captada en los tejidos normales y tumor fue expresada como porcentaje de actividad por gramo de órgano/tejido (%Act/g) y como el porcentaje de actividad inyectada (%Act). El valor total de sangre se consideró como un 7% del total del peso corporal. La captación específica en el tumor se determinó mediante la administración de 20 μg de HYNIC-cyc-MSH, 30 min previos a la inyección de los radioconjugados. Para el análisis estadístico se utilizó test de *t de Student* para datos no apareados, se eligió un nivel de 95% de confianza para determinar diferencias significativas entre los compuestos, con un $p < 0.05$.

5.5.6.3 Imágenes

Para los estudios de imagen, ratones portadores de melanoma murino fueron inyectados con aproximadamente 11-37 MBq de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA a través de la vena de la cola. Luego de 1 o 2 h de la administración, los animales son inmovilizados mediante anestesia general (Ketamina–Xilazina, 100-10 mg/ Kg intraperitoneal) para la adquisición de imágenes estáticas con la gamma cámara o micro-SPECT/CT. Todas las preparaciones administradas fueron controladas previamente por HPLC, para confirmar la ausencia de péptido no marcado. Estudio de captación específica para ^{99m}Tc -

HYNIC-cyc-MSH/Tricina se realizó mediante la adquisición de imagen micro-SPECT/CT a 2 h, previa administración de 20 μg de NDP frío.

5.6 Resultados

5.6.1 Estudio de las condiciones de desprotección de los derivados de HYNIC

Uno de los agentes quelantes bifuncionales más utilizados para la marcación de biomoléculas con ^{99m}Tc es el derivado de 6-hidrazinonicotiamida, conocido como HYNIC. Su popularidad se basa en que permite marcaciones eficientes, en condiciones moderadas. Habitualmente se utiliza en la forma de éster activado (Suc-HYNIC) para su conjugación en solución al péptido a través de un amino N-terminal o a través de un amino de una Lys. Abrams y colaboradores fueron los primeros en describir su síntesis, y su uso como agente quelante bifuncional, desde entonces ha sido ampliamente utilizado para la marcación de péptidos y proteínas [77, 86].

En primer lugar, en esta etapa del trabajo se estudiaron condiciones de marcación con ^{99m}Tc tanto de HYNIC **1**, como de los análogos que presentan al grupo hidrazino protegido con el agrupamiento Boc y TFA, derivados **2** y **5**, respectivamente, como modelo de reactividad química.

La elección de ensayar estos dos últimos derivados radica en estudiar la posibilidad que puedan ser marcados con ^{99m}Tc sin necesidad de desprotección previa del grupo quelante hidrazino. Cuanto mayor sea el grado de desprotección del grupo hidrazino en las condiciones de marcación, mayor será el número de grupos hidrazino libres disponibles para coordinarse al ^{99m}Tc , por tanto aumentará el rendimiento de marcado del complejo formado con ^{99m}Tc . Sin embargo, la desprotección no necesita ser completa, dado que generalmente hay un exceso de equivalentes del conjugado Biomolécula-HYNIC respecto de los equivalentes de tecnecio en la reacción. En ese sentido, y sumado a que los péptidos pueden resistir temperaturas más elevadas y condiciones químicas más extremas que las proteínas, es posible pensar en estrategias de conjugación entre análogos de alfa-MSH y derivados de HYNIC, y posteriormente la marcación con el grupo reactivo hidrazino protegido.

En este sentido y como modelo de reactividad química se estudio la marcación de los análogos de HYNIC **1**, **2** y **5**, los cuales se marcaron con ^{99m}Tc y utilizando tricina como coligando. En la figura 5.1 se presenta el cromatograma obtenido para la marcación de HYNIC **1**. En la entrada *i*) se observa el perfil de HPLC de HYNIC con un tiempo de retención próximo a 8 min, mientras que, en *ii*) y *iii*) se presentan los perfiles UV y gamma del radioconjugado ^{99m}Tc -HYNIC.

En este control de marcación se observa un patrón de varios picos en un rango de 6.5 – 10.0 minutos, presentando dos picos mayoritarios en el entorno de 8 minutos, con una pureza radioquímica mayor al 98%. Este patrón de varios picos, indicaría la formación de más de un complejo para el radioconjugado obtenido, lo cual es concordante con los resultados descritos en literatura, dado los diferentes isómeros que pueden formarse y que HYNIC puede coordinar en forma mono- o bidentada.

Los análogos **2** y **5** se marcaron con ^{99m}Tc en presencia de tricina y SnCl_2 durante 45 min a 75 °C, con la misma eficiencia ($\geq 98\%$) que su análogo desprotegido. Sin embargo las condiciones no fueron suficientes para lograr una completa desprotección, observándose una conversión del 50 % en el caso de HYNIC-Boc **2** y 85 % en el caso de HYNIC-TFA **5** (Figura 5.2). En este sentido, destacar que se observa un patrón de picos similar (HYNIC-Boc) o en menor número (HYNIC-TFA), en el perfil gamma con respecto a su análogo desprotegido. Es último resultado estaría indicando una restricción en los tipo de radioconjugados obtenidos, ya sea por una menor posibilidad de isómeros formados o por el tipo de coordinación que presenta el sistema 6-hidrazino nicotínico.

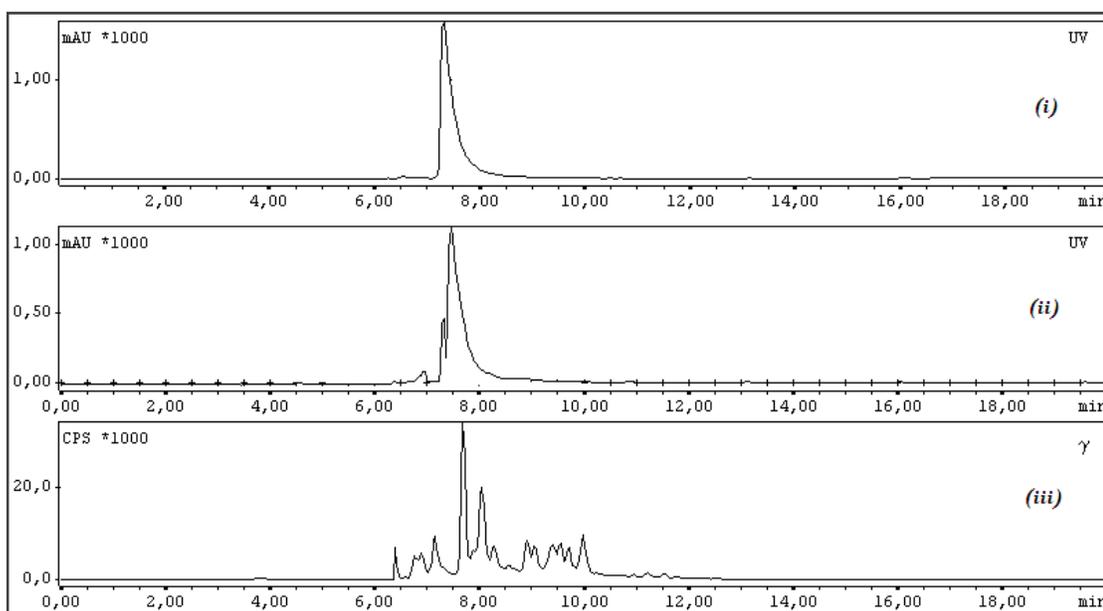


Figura 5.1: Perfil de HPLC de HYNIC y ^{99m}Tc -HYNIC. (i) UV HYNIC, (ii) UV ^{99m}Tc -HYNIC, (iii) perfil gamma de ^{99m}Tc -HYNIC

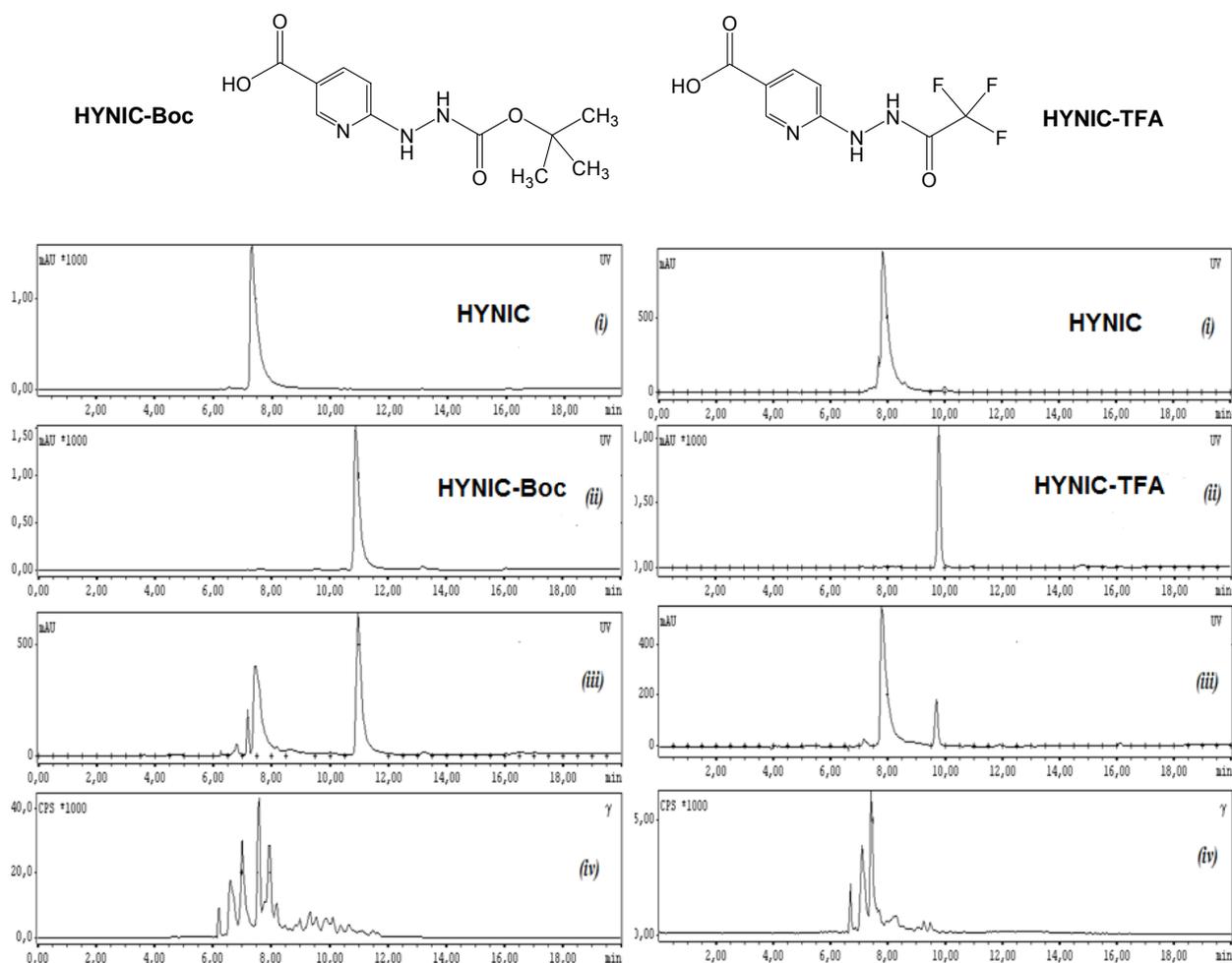


Figura 5.2: Cromatograma de HYNIC-Boc (izquierda), HYNIC-TFA (derecha), y su marcación con ^{99m}Tc . (i) UV HYNIC, (ii) UV HYNIC-grupo protector, (iii) UV ^{99m}Tc -HYNIC-grupo protector, (iv) perfil gamma de ^{99m}Tc -HYNIC-grupo protector.

Dado los buenos resultados obtenidos en las marcaciones de los derivados de HYNIC **2** y **5** con ^{99m}Tc , en segundo lugar estudiamos el efecto del pH y la temperatura en el proceso de desprotección/marcación sobre estos derivados. Los resultados obtenidos de evaluar el efecto del pH y la temperatura en la desprotección de los análogos de HYNIC protegidos con Boc (**2**) y TFA (**5**), se presentan en la figura 5.3. En todas las condiciones el grado de conversión a la forma hidrazino libre es mayor para el derivado **5** respecto del observado para **2**.

En cuanto a la desprotección del derivado HYNIC-TFA **5**, un pH 5 permitió mayores conversiones que incubaciones a pH 7, así como también, se observó que en ambas condiciones

de pH un aumento de la temperatura resultó en mayor conversión a la forma hidrazino libre. La máxima desprotección se obtuvo cuando se incubó a pH 5 a 75 °C, condición de pH y temperatura similar a la utilizada durante la marcación con ^{99m}Tc , lo que hace suponer que el pH y la temperatura son dos factores muy importantes en la desprotección/marcación para este derivado. En este sentido, la desprotección del derivado HYNIC-Boc se encuentra principalmente influenciada por el efecto de la temperatura, alcanzando un valor de desprotección entre 20-30% a 75°C para ambos valores de pH en estudio (pH 5 y 7, Figura 5.3). Estos resultados preliminares, indicarían la posibilidad de marcar moléculas o biomoléculas con ^{99m}Tc vía agente bifuncional HYNIC, con el grupo hidrazino adecuadamente protegido, bajo condiciones suaves de radiosíntesis.

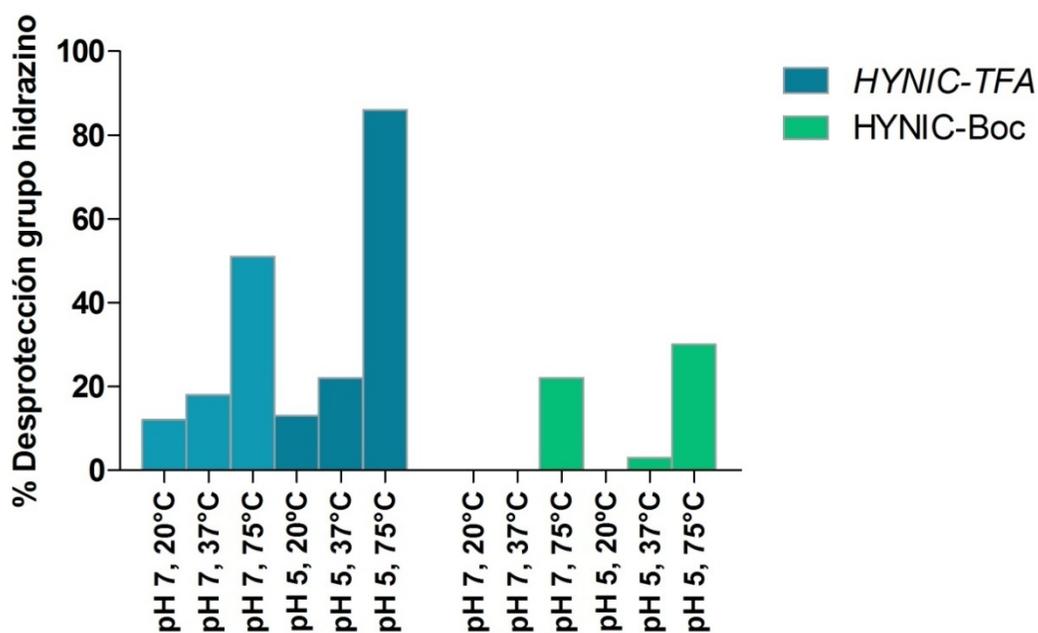


Figura 5.3: Condiciones evaluadas en la desprotección del grupo hidrazino para los derivados HYNIC-Boc y HYNIC-TFA.

5.6.2 Conjugación de análogos de alfa- MSH con Suc-HYNIC y sus derivados

Inicialmente, se estudiaron condiciones de conjugación en solución de los derivados de HYNIC: Suc-HYNIC-Boc **3**, Suc-HYNIC **4** y Suc-HYNIC-hidrazona **7** con un análogo peptídico de alfa-MSH, el análogo alfa-MSH-cíclico-Renio (Figura 5.4, A), el cual fue desarrollado por el grupo del Prof. Thomas Quinn de la Universidad de Missouri. La estrategia seleccionada consistió en la utilización de ésteres activados de HYNIC para su conjugación en solución al péptido a través del grupo amino de la lisina.

Diferentes condiciones de reacción fueron ensayadas tanto en medio acuoso como en disolventes orgánicos anhidros, como ACN o DMSO, a temperatura ambiente y bajo calentamiento convencional (50°C). En todos los casos, no fue posible obtener una conjugación y/o purificación eficiente con los derivados de HYNIC utilizados y el análogo peptídico de alfa-MSH. En la mayoría de las condiciones ensayadas, al controlar el avance de reacción mediante HPLC, los perfiles de cromatograma con detección UV mostraban la presencia de múltiples picos. Estos nos estarían indicando la conjugación de los derivados de HYNIC activados a varios niveles con el derivado de alfa-MSH. Por ejemplo, podríamos pensar en derivatizaciones con grupos reactivos del derivado peptídico, como por ejemplo grupo guanidina en arginina, imidazol en histidina e indol en triptófano. Por lo tanto, para evitar este tipo de posibles reacciones secundarias sería adecuado contar con el péptido adecuadamente protegido a estos niveles o llevar a cabo la síntesis del péptido y su derivatización a HYNIC utilizando una estrategia de síntesis en fase sólida.

En base a estos resultados y en colaboración con el laboratorio del Prof. Quinn estudiamos la conjugación mediante síntesis orgánica en fase sólida del acople directo utilizando el ligando bifuncional desarrollado anteriormente HYNIC-Boc **2** y el análogo Ac-Lys-ReCCMSH(Arg¹¹) (Figura 5.5, paso I). Seguidamente, mediante tratamiento con TFA 80% se produce tanto el desanclaje del péptido de la resina de Rink amida como la desprotección del grupo Boc (Figura 5.5, paso II). Finalmente, se ensayaron condiciones puestas a punto para la ciclación del péptido con un agente de intercambio derivado de oxo renio 187 (Figura 5.5, paso III) [124]. Bajo estas condiciones no fue posible obtener dicho conjugado debido a un desplazamiento del metal Renio durante las condiciones de reacción. Posiblemente esto es debido a una competencia del grupo hidrazino libre y/o átomo de nitrógeno del anillo de piridina con los tiolatos del derivado peptídico por la coordinación con el ^{187}Re .

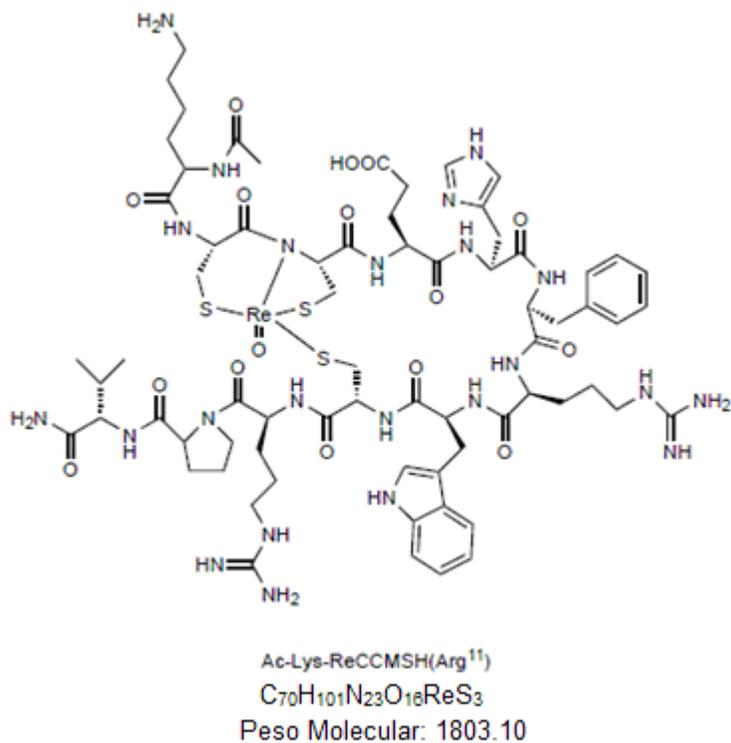


Figura 5.4: Análogo cíclico de MSH. Ac-Lys- $^{187}\text{ReCCMSH}(\text{Arg}^{11})$

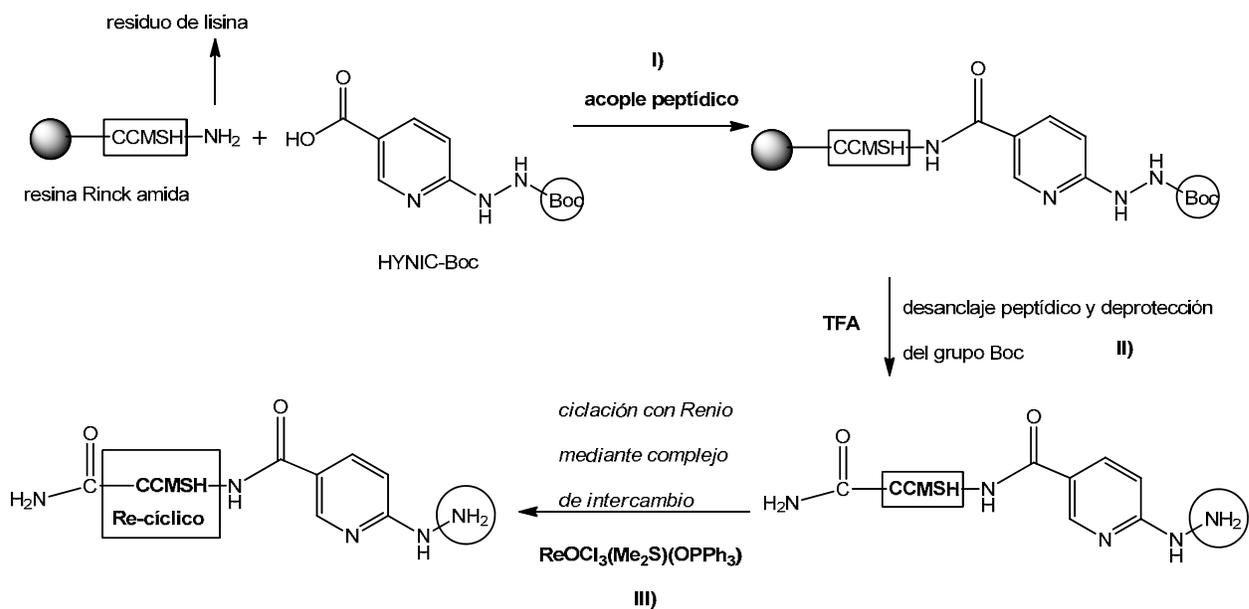


Figura 5.5: Derivatización de HYNIC-Boc con Ac-Lys-ReCCMSH(Arg¹¹) y ciclación con Renio

Dado los resultados desarrollados anteriormente, se seleccionó el análogo de alfa-MSH cíclico de 10 aminoácidos (HYNIC-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)GPV-CONH₂) que se representa en la figura 5.6, para la derivatización con HYNIC-Boc y así evitar los inconvenientes mencionados. Con este derivado peptídico, del cual se conoce presenta muy buena afinidad por el receptor MCR1, se realizó una conjugación con el ligando bifuncional HYNIC-Boc mediante estrategia de síntesis en fase sólida [101].

Brevemente, la misma consistió en un primer paso de anclaje y posteriores reacciones de acople directo de los aminoácidos adecuados (utilizando la estrategia de síntesis Fmoc y resina Rink amida) y posterior conjugación con el ligando bifuncional HYNIC-Boc, todo esto llevado a cabo en fase sólida en un sintetizador automático. Seguidamente, una reacción de desprotección selectiva de los residuos de Asp y Lys con TFA 2.5%, permitiendo una reacción de ciclación mediante una lactama intramolecular entre los mismos. Finalmente se llevo a cabo el desanclaje del péptido de la resina y desprotección del grupo hidrazino, que a los efectos de este trabajo denominaremos “**HYNIC-cyc-MSH**”.

Las condiciones de desanclaje del péptido conjugado se llevan a cabo en presencia de ácido trifluoroacético (TFA), lo cual genera dos análogos peptídicos principalmente (Figura 5.7), los cuales fueron caracterizados por HPLC-EM. En el perfil de purificación con un tiempo de retención de 18.44 min se obtiene el derivado que contiene HYNIC con el grupo hidrazino desprotegido (IES-EM HYNIC.cyc-MSH: 1371.9, Figura 5.8). Mientras que, en el minuto 21.75 se obtiene el derivado peptídico que contiene el grupo hidrazino protegido con un grupo trifluoroacetilo (IES-EM HYNIC-TFA-cyc-MSH: 1467.4, Figura 5.9). De esta forma a partir de una purificación utilizando equipamiento de HPLC preparativo se obtuvieron de forma pura las dos variantes del cyc-MSH: HYNIC-cyc-MSH y HYNIC-TFA-cyc-MSH. Estos dos conjugados nos permitieron continuar con las actividades planteadas en el trabajo de tesis.

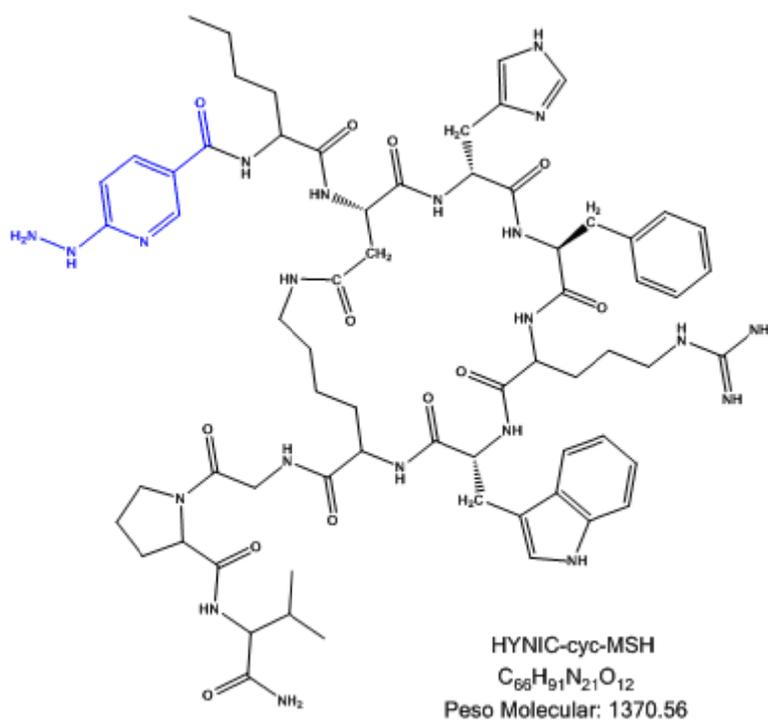


Figura 5.6: Análogo cíclico de MSH derivatizado con HYNIC
 HYNIC-cyc-MSH (HYNIC-Nle-cyc[Asp-H-dPhe-RW-Lys]GPV-CONH₂)

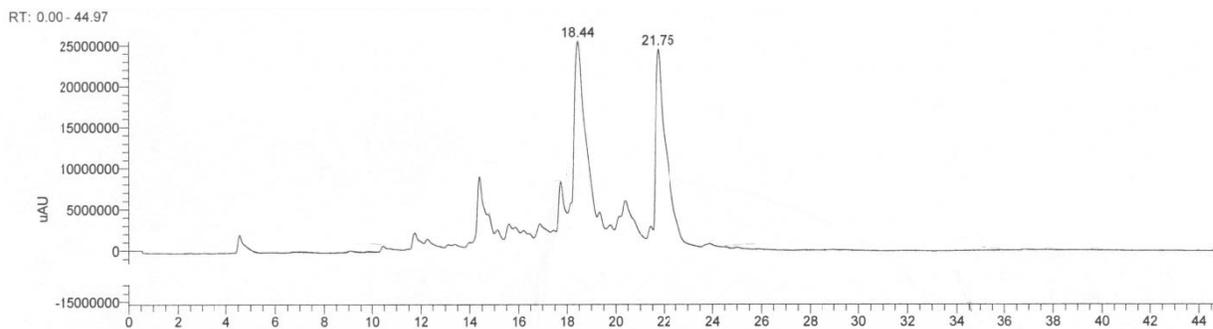


Figura 5.7: Perfil cromatográfico de la síntesis de HYNIC-cyc-MSH. Para la purificación se seleccionan los picos mayoritarios con tiempo de retención 18.44 y 21.75 min

TR: 18.34 - 19.34

T: + c ESI Q1MS [100.00-2500.00]

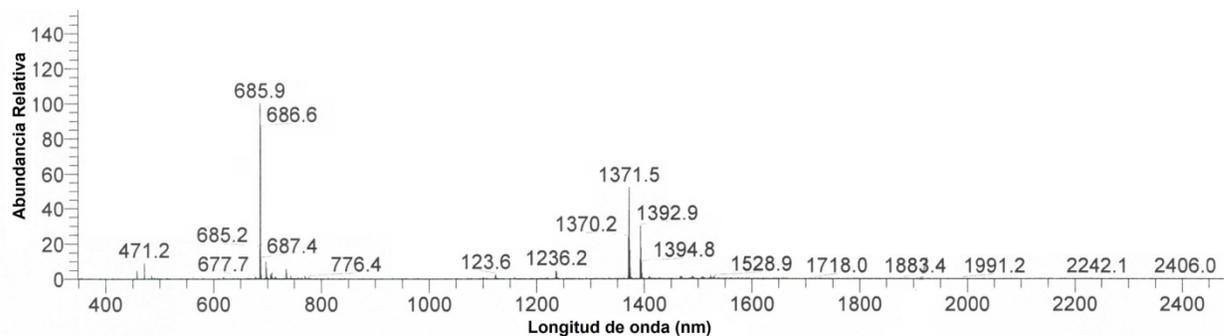


Figura 5.8: EM HYNIC-cyc-MSH. Corresponde a la muestra colectada en TR 18.34-19.34

TR: 21.74 - 22.79

T: + c ESI Q1MS [100.00-2500.00]

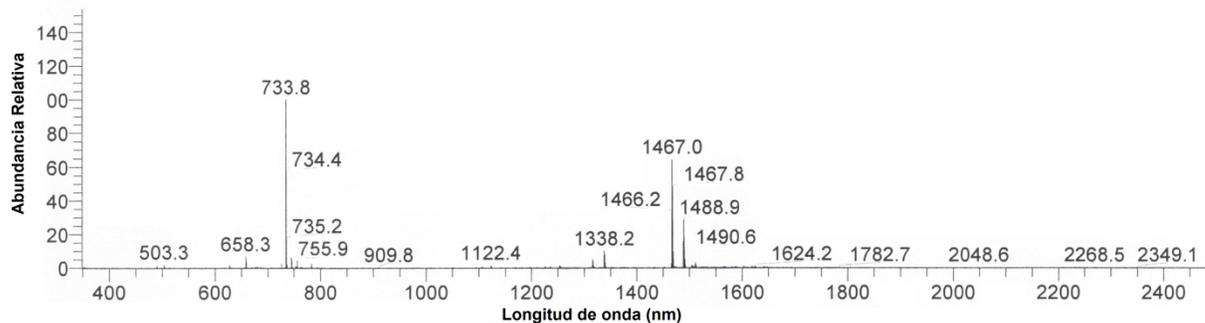


Figura 5.9 EM HYNIC-TFA-cyc-MSH. Corresponde a la muestra colectada en TR 21.74-22.79

Por otra parte, estudios de estabilidad por HPLC y EM del derivado HYNIC-TFA-cyc-MSH provistos por el Dr. Gallazzi (Universidad de Missouri) mostraron una inestabilidad de la protección del grupo trifluoroacetilo cuando se incubó el péptido en condiciones ácidas (Figura 5.10). Estos resultados van en el mismo sentido que las observaciones previas obtenidas para el análogo HYNIC-TFA y su desprotección en función del pH (punto 5.6.1). Por este motivo y debido que la marcación de ambos derivados peptídicos conducen al mismo complejo marcado (resultado no mostrado), durante esta tesis se continuó trabajando con la forma hidrazino libre, es decir con del derivado HYNIC-cyc-MSH.

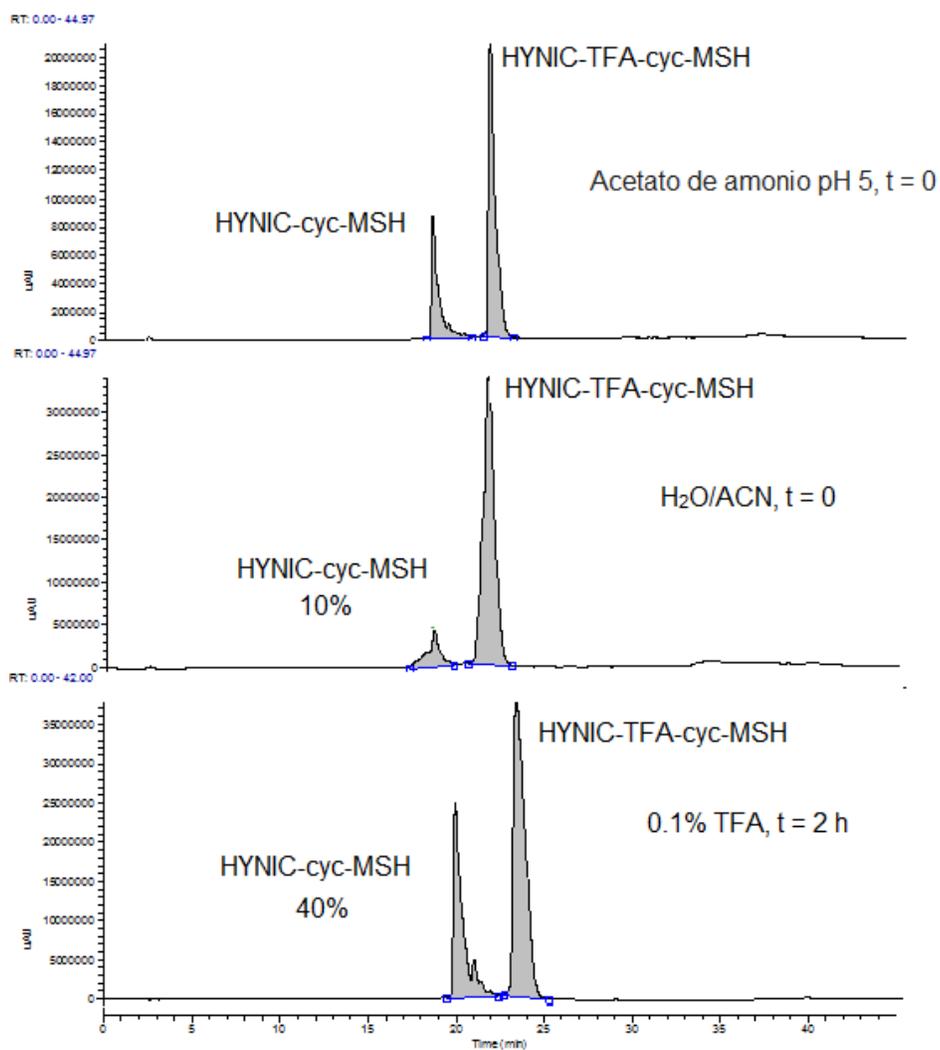


Figura 5.10: control de estabilidad del derivado HYNIC-TFA-cyc-MSH

5.6.3 Ensayo in vitro de unión competitiva

El IC_{50} o la concentración de péptido requerida para inhibir el 50% de unión del radioligando, fue determinada utilizando ^{125}I -Tyr²-NDP, un análogo de MSH radioiodinado con afinidad picomolar por el receptor MC1R, en competencia con HYNIC-cyc-MSH [97]. Se utilizaron concentraciones crecientes de HYNIC-cyc-MSH en un rango de 10^{-11} a 10^{-6} M. La curva de unión competitiva se obtiene graficando % de unión ^{125}I -Tyr²-NDP en función de la concentración de HYNIC-cyc-MSH (Figura 5.11). Bajo estas condiciones se obtuvo un valor de IC_{50} de 6.5 nM para HYNIC-cyc-MSH.

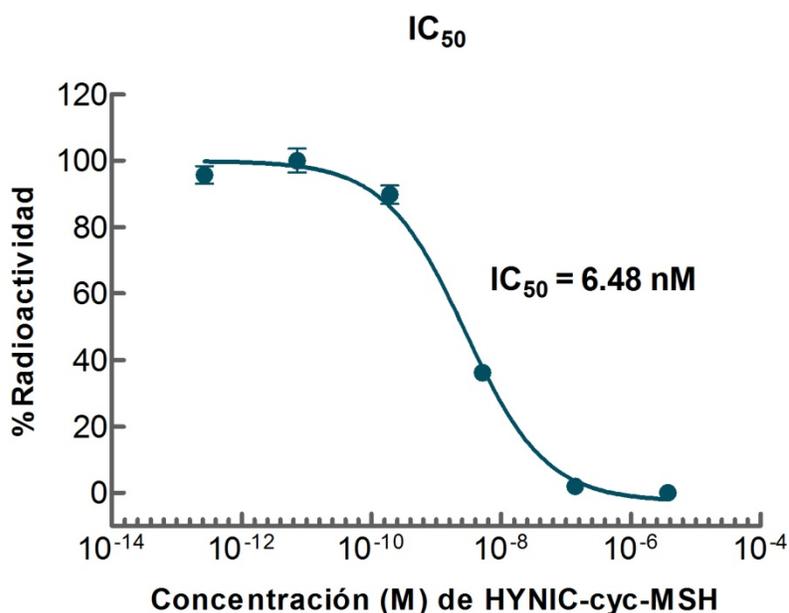


Figura 5.11: Curva de unión competitiva entre análogos de alfa-MSH y receptor MCR1

5.6.4 Marcación con ^{99m}Tc de HYNIC-cyc-MSH

5.6.4.1 Condiciones de marcación

HYNIC-cyc-MSH se marcó con rendimiento superior a 95 ± 4 % cuando se utilizó tricina como coligando a 50°C durante 20 min, con actividades específicas entre 7.5 y 26.9 GBq/ μmol . El complejo ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina se separó exitosamente del péptido no marcado a

través de HPLC, con tiempos de retención de 14.5 min y 15 min respectivamente. En la figura 5.12 se indica la región colectada en la purificación; también es posible apreciar la formación de los distintos complejos de ^{99m}Tc debido al uso de coligandos.

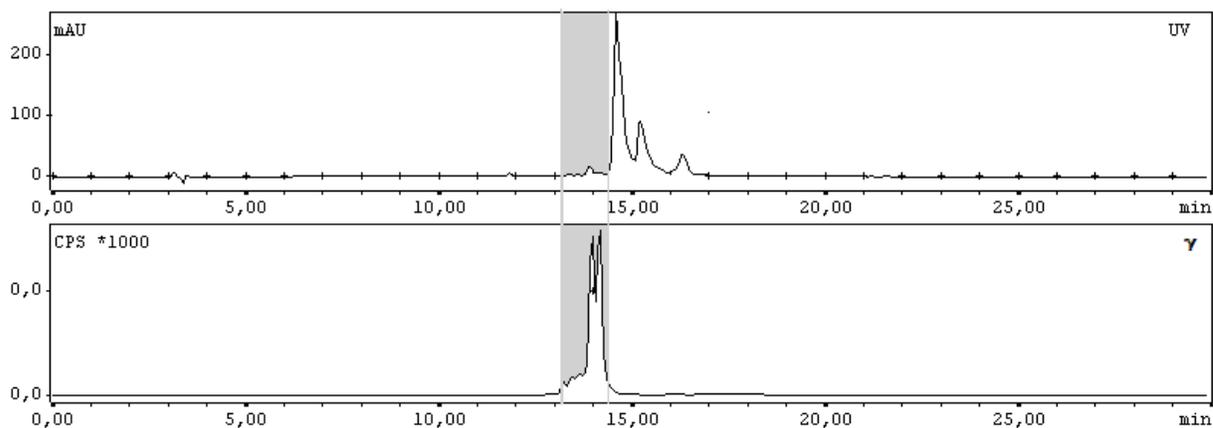


Figura 5.12: Perfil de purificación de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina

HYNIC-cyc-MSH se marcó utilizando EDDA como coligando con un rendimiento de $64 \pm 12\%$ cuando se incubó a 70°C , 30 min. Rendimientos de 42% y 59% se obtuvieron cuando se incubó a 50°C durante 20 y 30 min respectivamente. Se alcanzaron actividades específicas entre 3 y 23 $\text{GBq}/\mu\text{mol}$. El complejo ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA se separó exitosamente del péptido no marcado a través de HPLC con tiempos de retención de 15 min y 15.5 min respectivamente como se aprecia en a figura 5.13.

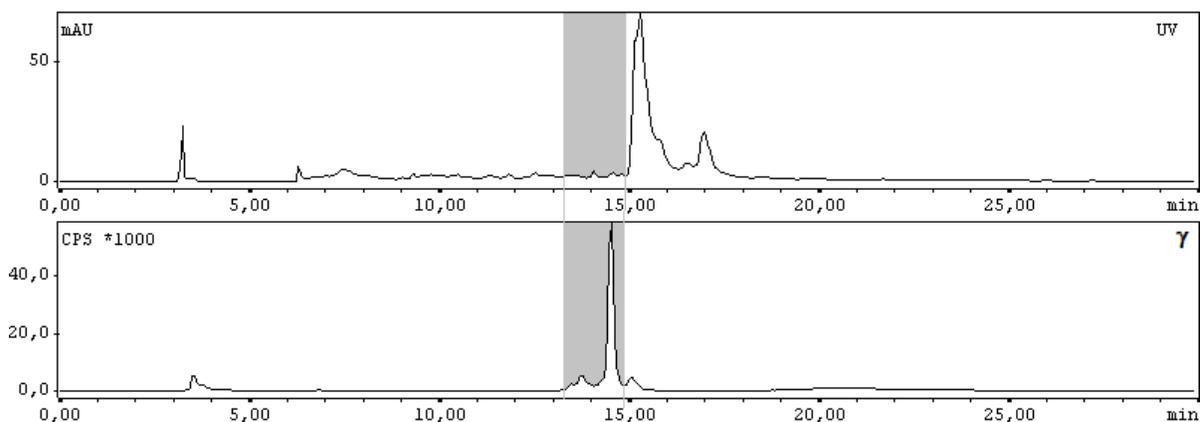


Figura 5.13: Perfil de purificación de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA

En las marcaciones utilizando dos coligandos, tricina-EDDA y tricina-ácido nicotínico, se obtuvieron rendimientos de 15% y 60% respectivamente, en las condiciones estudiadas. Dichas marcaciones fueron realizadas, para una evaluación del efecto que tienen dichos complejos en el coeficiente de reparto. Por este motivo, para la realización de esta tesis no se optimizaron las condiciones de marcación.

5.6.4.2 Coeficiente de reparto o Log P

Se estudiaron distintos complejos HYNIC-cyc-MSH marcado con ^{99m}Tc utilizando Tricina, EDDA y Ácido Nicotínico como coligandos. De los radiomarcados obtenidos se evaluó el carácter hidrofílico mediante el cálculo del coeficiente de reparto octanol-agua. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.1. Todos los complejos estudiados mostraron ser hidrofílicos, siendo el ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina el que mostró mayor carácter hidrofílico presentando un $\log P = -1.244$.

Complejos ^{99m}Tc	Log P
^{99m}Tc -Tricina-HYNIC-cyc-MSH	$-1.244 \pm 0,046$
^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-cyc-MSH	$-0.778 \pm 0,064$
^{99m}Tc -Tricina/NA-HYNIC-cyc-MSH	$-0.966 \pm 0,002$
^{99m}Tc -Tricina/EDDA-HYNIC-cyc-MSH	$-0.869 \pm 0,004$

Tabla 5.1: Log P de los distintos complejos obtenidos

5.6.4.3 Estabilidad *in vitro*

Se estudió la estabilidad de los conjugados ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA *in vitro* en PBS y en Suero Fetal Bovino (SFB) a 37° C durante 1, 2 y 4 h. El complejo marcado utilizando EDDA como coligando mostró una estabilidad mayor a 90 % a 4 h, mientras que el complejo con Tricina se mostró estable hasta 2 h, disminuyendo a un 83% a las 4 h de incubación (Figura 5.14 A). Cuando el complejo marcado con Tricina se incubó en PBS con un exceso de coligando se observó un aumento de estabilidad a 4 h. Cuando se incubaron ambas especies en SFB se observó una estabilidad mayor a 90 % a 4 h en ambos radioconjugados (Figura 5.14 B). Cuando se estudio el grado de unión a proteínas en suero fetal bovino se observó que ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA resultó ser el complejo con menor unión a proteínas, cercano al 10% sin variación significativa a lo largo del tiempo (Figura 5.14 C).

Mientras que cuando se utilizó tricina como coligando se observó una unión a proteínas del 22% luego de una hora de incubación, alcanzando un 27% a las 4 h.

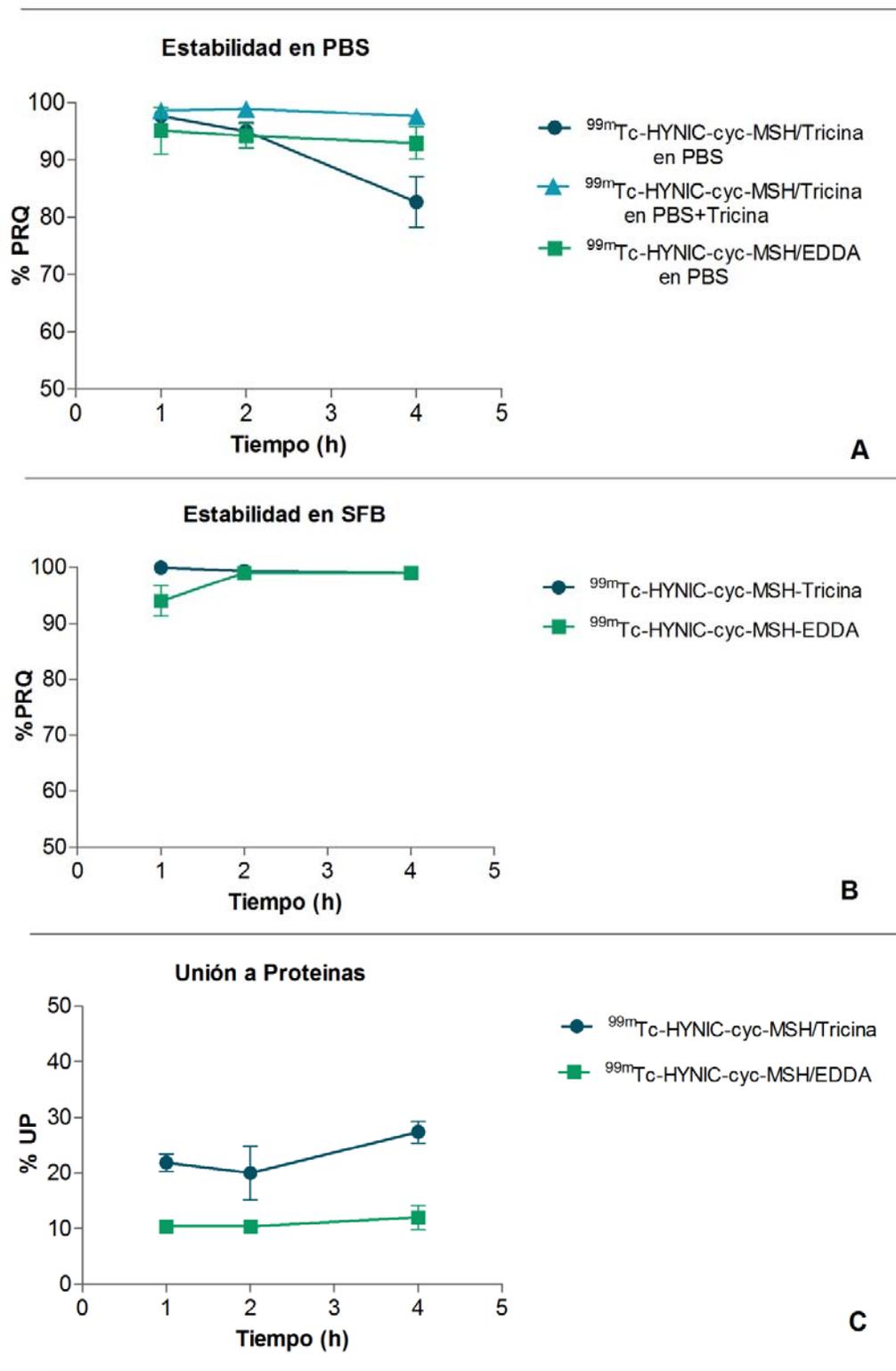


Figura 5.14: Estudios de estabilidad *in vitro* para los radioconjugados obtenidos

5.6.4.4 Estudios *in vitro* de unión

Los estudios de unión, internalización y retención celular fueron realizados en células murinas B16/F1, para ^{99m}Tc -cyc-MSH utilizando Tricina y EDDA como coligandos. En la figura 5.15 se observa el % actividad que permaneció unido luego de 2 h de incubación, así como también se aprecia el bloqueo de la unión cuando se lo incubaba con análogos de α -MSH no marcados (HYNIC-cyc-MSH y NDP). La figura 5.16 muestra los estudios de internalización y externalización a lo largo del tiempo para ambos complejos. En los mismos se comprobó una rápida unión al receptor MC1R, seguida por su internalización, así como también una retención del péptido en el interior lo cual se ve reflejado por el bajo grado de internalización.

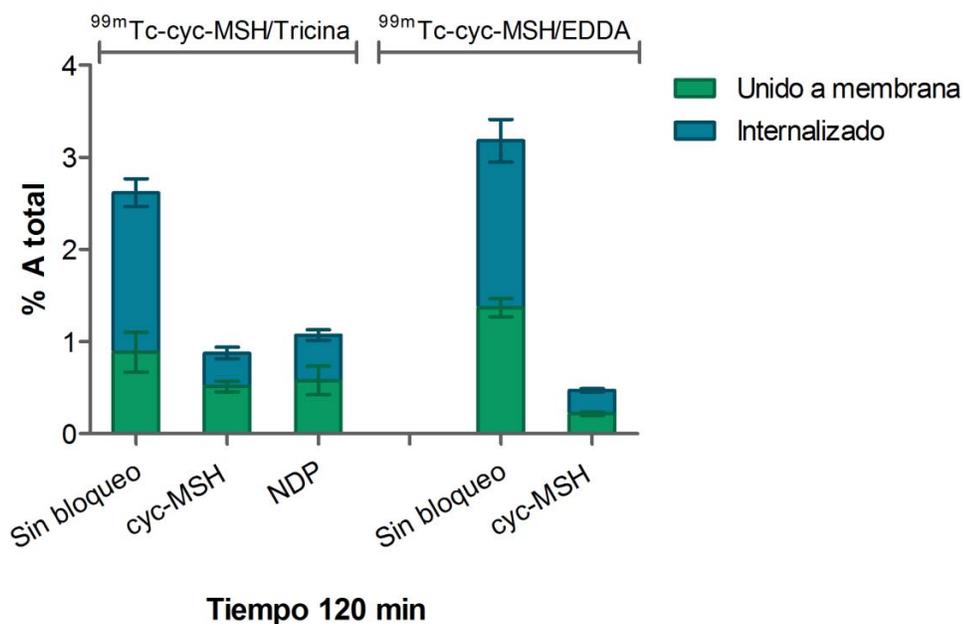


Figura 5.15: Ensayo de unión en células B16/F1 a las 2 h.

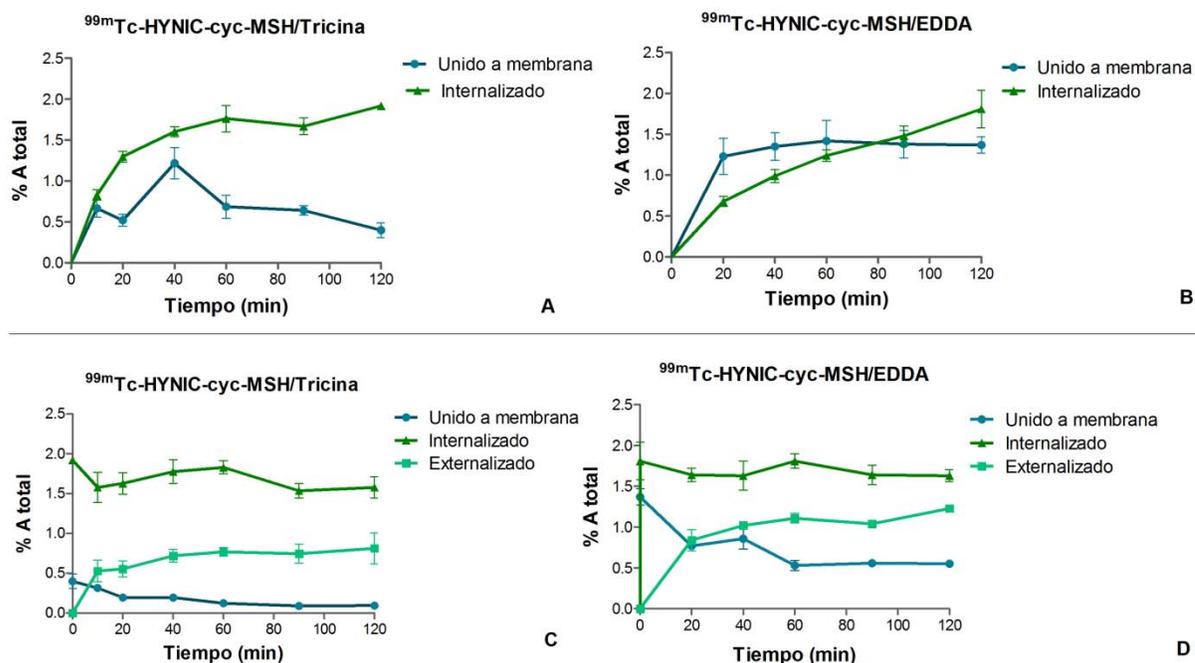


Figura 5.16: Estudios de unión, internalización y externalización de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA en células B16/F1.

5.6.4.5 Evaluación Biológica

5.6.4.5.1 Estabilidad *in vivo*

Se estudió la estabilidad *in vivo* a una hora post-inyección de ambos complejos en orina de ratones C57 BL/6J normales. Los controles de HPLC se presentan en las figura 5.17 y 5.18, en ambos casos se observa un pico que coincide con el perfil y tiempo de retención de los complejos. No se observan otras especies de ^{99m}Tc .

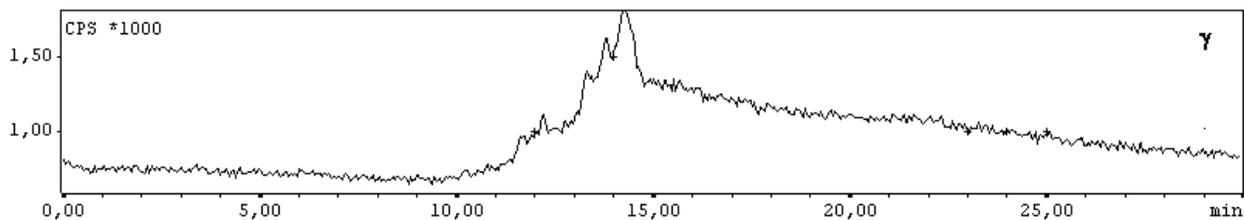


Figura 5.17: Perfil de HPLC de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina en orina.

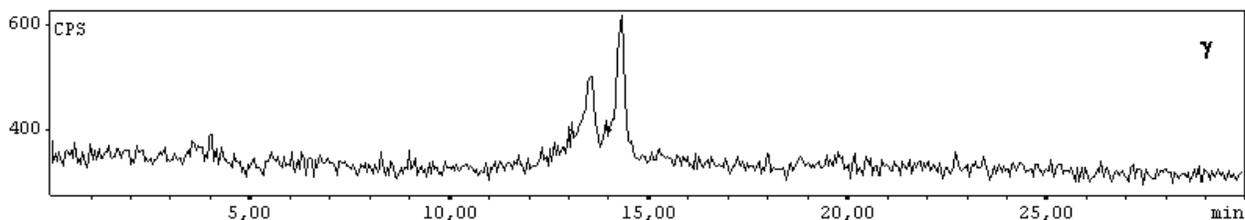


Figura 5.18: Perfil de HPLC de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA en orina.

5.6.4.5.2 Estudios de Biodistribución

La evaluación biológica *in vivo* de los complejos se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma. Las biodistribuciones fueron realizadas luego de 1, 2, 4 y 24 h ($n = 4$). Ambos complejos ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA presentaron una rápida e importante captación a nivel del tumor (Tablas 5.2 y 5.3). A las 2 h ambos complejos presentaron el pico de captación tumoral, presentando un % A/g de 4.38 ± 1.02 cuando se utilizó tricina y 3.92 ± 2.07 cuando se utilizó EDDA, permaneciendo en el tumor un 4.07 ± 1.16 y 3.65 ± 0.59 % A/g, respectivamente, a las 4 h post-inyección.

Los valores de % A/g en tumor para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA disminuyeron a 1.46 ± 0.54 y 1.56 ± 0.32 %, luego de 24 h post-inyección, respectivamente (Tablas 5.2, 5.3 y Figuras 5.19, 5.20). No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la captaciones tumorales entre los diferentes complejos en ninguno de los tiempos estudiados. El estudio de competencia con 20 μg de HYNIC-cyc-MSH (14.6 nmol) luego de 2 h post-inyección, mostró una captación tumoral de 0.40 ± 0.20 % A/g y 0.30 ± 0.08 % A/g para los complejos de tricina y EDDA respectivamente.

La eliminación de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA fue muy rápida, observándose un 76.54 ± 5.85 % y 77.44 ± 7.30 % de la actividad en orina luego de 2 h de biodistribución (Tablas 5.2, 5.3), presentando baja retención inespecífica en riñones.

La captación en órganos normales generalmente fue < 1 % A/g, para ambos radiopéptidos, excepto en riñones en todos los tiempos investigados. Cuando se utilizó tricina como coligando se observa un ligero aumento en la captación de $1.59 \pm 1.80\%$ y $1.34 \pm 0.60\%$ en bazo e intestino a las 24 h que respectivamente. Se observaron elevadas relaciones tumor/órgano no blanco a las 2 h post-inyección como se puede apreciar en las tablas 5.2 y 5.3. ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina

presentó relaciones tumor/músculo = 33.7 y tumor/sangre = 7.1 a las 2 h, mientras que las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA fueron de 17.8 y 4.7 respectivamente.

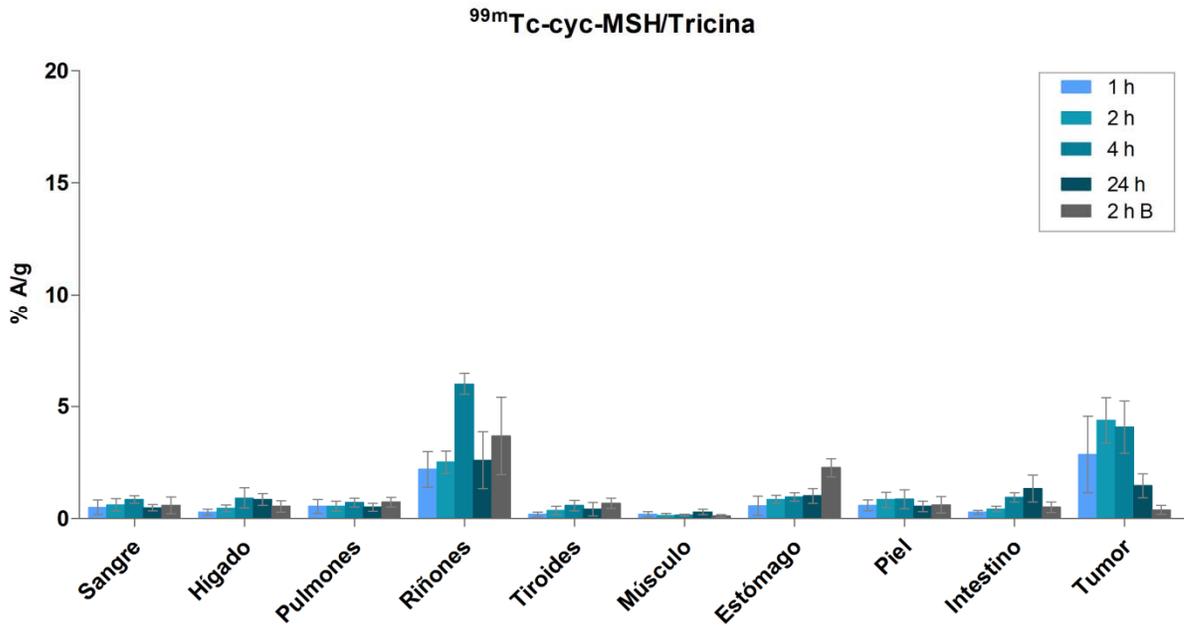


Figura 5.19: Biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma. (n=4, %A/g \pm DS)

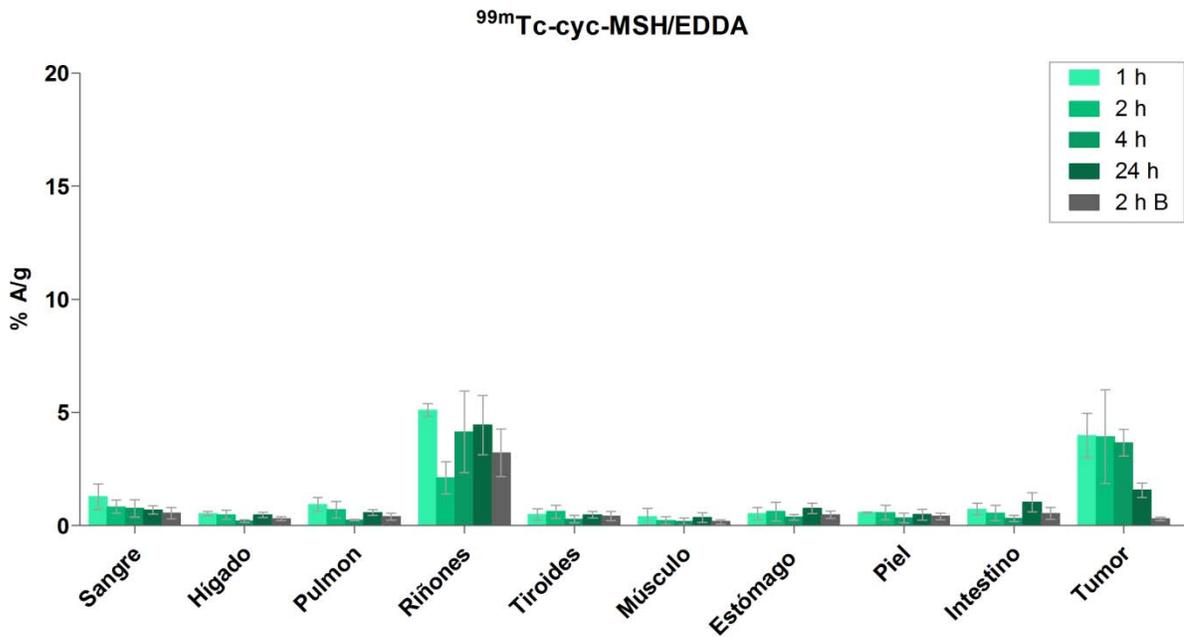


Figura 5.20: Biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma. (n=4, %A/g \pm DS)

$^{99m}\text{Tc-cyc-MSH/Tricina}$												
Tejidos	1 h		2 h		4 h		24 h		2 h Bloqueo*			
%A/g **												
Sangre	0.50	± 0.33	0.62	± 0.28	0.86	± 0.17	0.49	± 0.14	0.59	± 0.37		
Hígado	0.29	± 0.13	0.46	± 0.15	0.92	± 0.44	0.85	± 0.26	0.55	± 0.26		
Corazón	0.11	± 0.04	0.23	± 0.06	0.34	± 0.09	0.49	± 0.19	0.27	± 0.09		
Pulmón	0.55	± 0.31	0.55	± 0.22	0.72	± 0.19	0.51	± 0.18	0.74	± 0.21		
Bazo	0.09	± 0.05	0.29	± 0.23	0.37	± 0.17	1.59	± 1.80	0.34	± 0.10		
Riñones	2.19	± 0.79	2.52	± 0.50	5.99	± 0.47	2.60	± 1.25	2.99	± 1.26		
Tiroides	0.19	± 0.11	0.37	± 0.19	0.59	± 0.23	0.56	± 0.11	0.69	± 0.23		
Músculo	0.19	± 0.11	0.13	± 0.11	0.17	± 0.04	0.30	± 0.12	0.13	± 0.06		
Hueso	0.06	± 0.04	0.22	± 0.17	0.40	± 0.14	0.59	± 0.14	0.27	± 0.02		
Estómago	0.57	± 0.43	0.85	± 0.18	0.96	± 0.19	1.02	± 0.33	2.27	± 0.41		
Piel	0.59	± 0.24	0.84	± 0.33	0.87	± 0.42	0.55	± 0.24	0.62	± 0.36		
Intestino	0.28	± 0.08	0.43	± 0.12	0.95	± 0.21	1.34	± 0.60	0.51	± 0.24		
Tumor	2.85	± 1.71	4.38	± 1.02	4.07	± 1.16	1.46	± 0.54	0.40	± 0.20		
%A**												
Intestino	0.98	± 0.57	1.06	± 0.39	1.62	± 0.38	1.86	± 0.76	1.09	± 0.49		
Orina	80.36	± 12.35	76.54	± 5.85	78.88	± 5.97	80.01	± 1.45	81.36	± 5.63		
Relación Tumor/tejido normal												
T/sangre	5.7		7.1		4.7		3.0		0.7			
T/riñones	1.3		1.7		0.7		0.6		0.1			
T/hígado	9.8		9.5		4.4		1.7		0.7			
T/músculo	15.0		33.7		23.6		4.9		3.1			

* Para el bloqueo de la captación tumoral se inyectaron 20 μg HYNIC-cyc-MSH, 30 min antes de la administración de $^{99m}\text{Tc-cyc-MSH}$. ** % Actividad/gramo (%A/g) y % Actividad (%A) son expresados como el promedio \pm desvío estándar.

Tabla 5.2: Biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma y comparación de relaciones tumor/órganos no blanco

^{99m}Tc -cyc-MSH/EDDA												
Tejidos	1 h		2 h		4 h		24 h		2 h Bloqueo*			
%A/g **												
Sangre	1,27	± 0,55	0,83	± 0,28	0,76	± 0,39	0,69	± 0,18	0,56	± 0,25		
Hígado	0,53	± 0,09	0,48	± 0,20	0,20	± 0,06	0,47	± 0,11	0,31	± 0,09		
Corazón	0,56	± 0,30	0,35	± 0,15	0,15	± 0,04	0,38	± 0,14	0,24	± 0,11		
Pulmón	0,93	± 0,31	0,70	± 0,36	0,25	± 0,03	0,58	± 0,12	0,40	± 0,15		
Bazo	0,28	± 0,17	0,21	± 0,10	0,10	± 0,07	0,84	± 0,20	0,35	± 0,29		
Riñones	5,10	± 0,28	2,10	± 0,71	4,14	± 1,80	4,44	± 1,31	3,21	± 1,05		
Tiroides	0,49	± 0,25	0,62	± 0,29	0,28	± 0,16	0,48	± 0,13	0,42	± 0,20		
Músculo	0,40	± 0,37	0,22	± 0,17	0,32	± 0,29	0,35	± 0,22	0,17	± 0,10		
Hueso	0,61	± 0,35	0,31	± 0,15	0,20	± 0,04	0,43	± 0,23	0,33	± 0,31		
Estómago	0,53	± 0,27	0,62	± 0,42	0,36	± 0,12	0,76	± 0,23	0,48	± 0,16		
Piel	0,59	± 0,01	0,57	± 0,31	0,33	± 0,21	0,48	± 0,24	0,40	± 0,14		
Intestino	0,73	± 0,26	0,55	± 0,33	0,32	± 0,14	1,04	± 0,43	0,54	± 0,26		
Tumor	3,98	± 0,99	3,92	± 2,07	3,65	± 0,59	1,56	± 0,32	0,30	± 0,08		
%A**												
Intestino	1,55	± 0,36	1,14	± 0,84	0,59	± 0,28	1,57	± 0,46	1,13	± 0,27		
Orina	73,24	± 5,88	77,44	± 7,30	75,94	± 16,08	75,23	± 9,40	81,64	± 10,19		
Relación Tumor/tejido normal												
T/sangre	3.1		4.7		4.8		2.26		0.5			
T/riñones	0.8		1.9		0.9		0.3		0.1			
T/hígado	7.5		8.2		18.2		3.3		1.0			
T/músculo	9.9		17.8		11.4		4.5		1.8			

* Para el bloqueo de la captación tumoral se inyectaron 20 μg HYNIC-cyc-MSH, 30 min antes de la administración de ^{99m}Tc -cyc-MSH. ** % Actividad/gramo (%A/g) y % Actividad (%A) son expresados como el promedio \pm desvío estándar.

Tabla 5.3: Biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma y comparación de relaciones tumor/órganos no blanco.

Cuando se comparó el %A/g para distintos órganos a lo largo del tiempo, no se observaron diferencias en los perfiles entre los diferentes complejos radiomarcados, excepto para el hígado donde es posible apreciar una acumulación ligeramente mayor luego de 2 h para el complejo marcado con tricina como coligando (Figura 5.21).

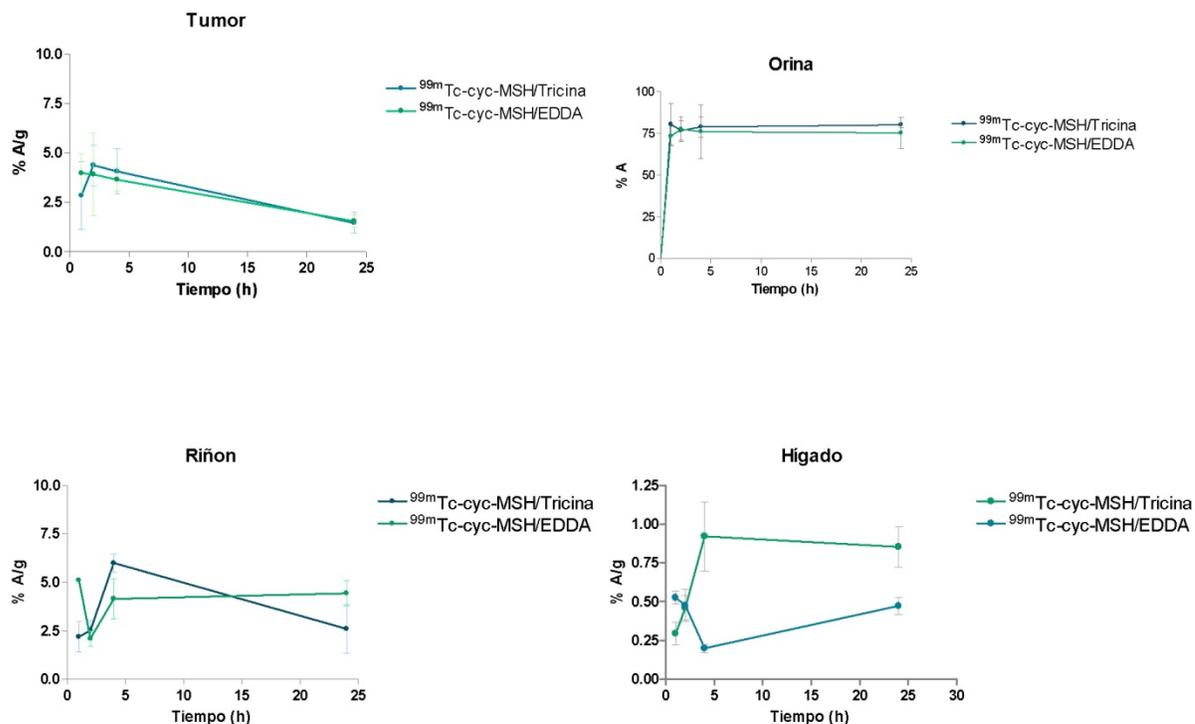


Figura 5.21: %A/g para distintos órganos a lo largo del tiempo

5.6.4.5.3 Imágenes

Las imágenes centellográficas adquiridas para el complejo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-cyc-MSH/Tricina}$ luego de 2 h, muestran buena captación a nivel tumoral, tal como se puede apreciar en las figuras 5.22, 5.23 y 5.24. Es posible identificar la vía urinaria como la principal vía de eliminación, lo cual queda evidenciado mediante la visualización de vejiga y riñones en menor medida.

En la figura 5.22 se observa la imagen centellográfica de un ratón portador de melanoma a 1 h post inyección (**A**), con gran intensidad de captación a nivel de vejiga y tumor. La relación del tumor respecto de la región contra lateral es de 22.6, similar a las relaciones observadas en los estudios de biodistribución para $^{99m}\text{Tc-HYNIC-MSH/Tricina}$. En **B** se observa la imagen micro-SPECT/CT realizada a 2 h, en esta oportunidad se observa una clara captación a nivel del tumor, con intensa captación en vejiga, hígado e intestinos, este último no evidenciable en el resto de las imágenes centellográficas. Esta diferencia podría deberse a una inestabilización del complejo lo cual está también evidenciado en una visualización de tiroides.

La captación específica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-MSH/Tricina se comprobó con un estudio de competencia in vivo, mediante la previa administración del análogo peptídico NDP, que provocó una saturación de los receptores e inhibió de esta forma la captación del radioconjugado a nivel del tumor, como se puede apreciar en la figura 5.23.

Una intensa captación en las regiones que correspondientes a las regiones del tumor e hígado del ratón C, condujeron a una biodistribución de dichos órganos para confirmar la captación (Figura 5.24). Una observación macroscópica de los órganos permitió confirmar procesos tumorales en el hígado, lo que podría explicar la intensidad en la captación hepática.

Las imágenes centellográficas adquiridas para el complejo ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA luego de 2 h post-inyección se muestran en la figura 5.25. En las mismas, se visualiza como principal vía de metabolización la vía urinaria con clara visualización de riñones y vejiga. La visualización del tumor es moderada, esto podría explicarse con lo observado a nivel de las biodistribuciones en las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre, donde se obtienen relaciones menores que las observadas para el complejo de Tricina.

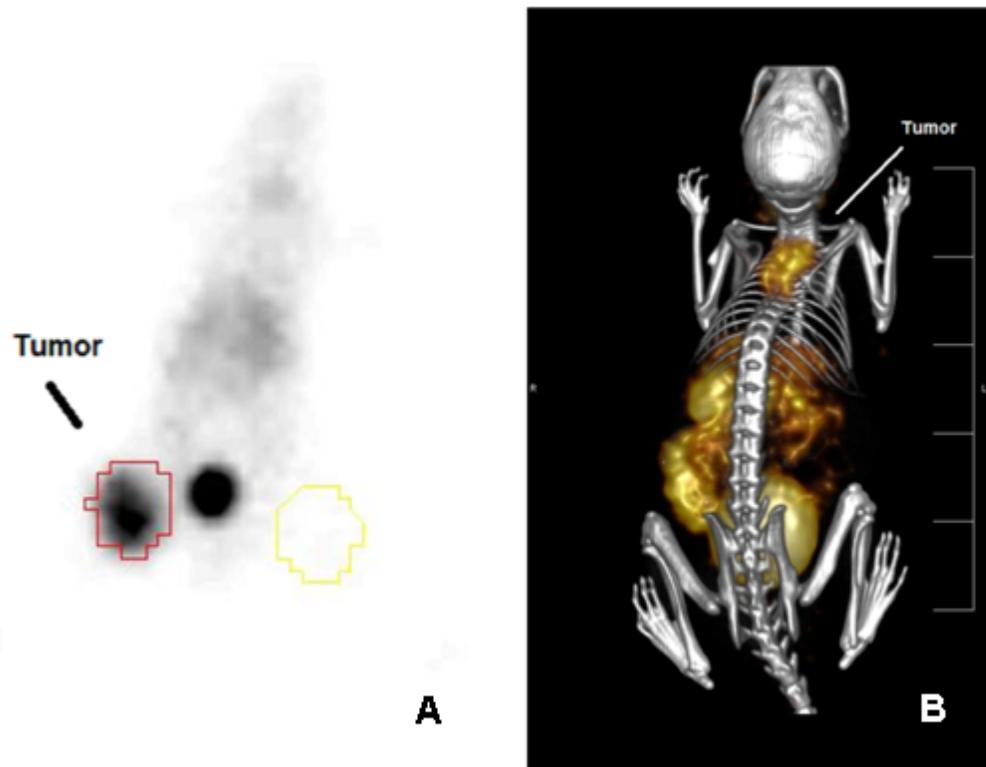


Figura 5.22: Imágenes de C57 BL/6J portadores de melanoma B16/F1 luego de la administración de ^{99m}Tc -HYNIC-MSH/Tricina. En A imagen centellográfica obtenida en gamma cámara a 1 h. En B imagen de fusión SPECT-CT a 2 h.

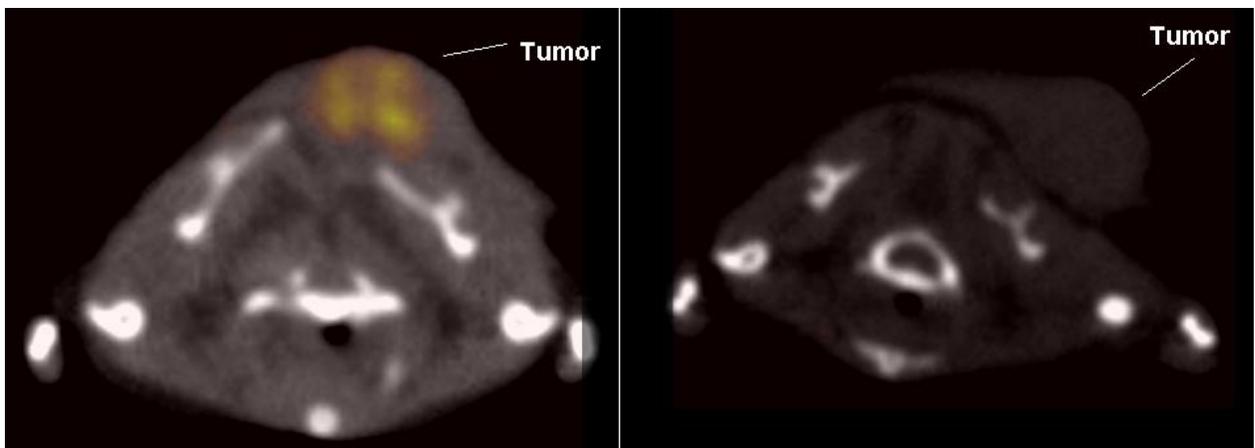


Figura 5.23: Imagen axial micro SPECT-CT de ratones C57 BL/6J portadores de melanoma B16/F1 luego de 2 h de la administración de ^{99m}Tc -HYNIC-MSH/Tricina. Imagen derecha con bloqueo específico.

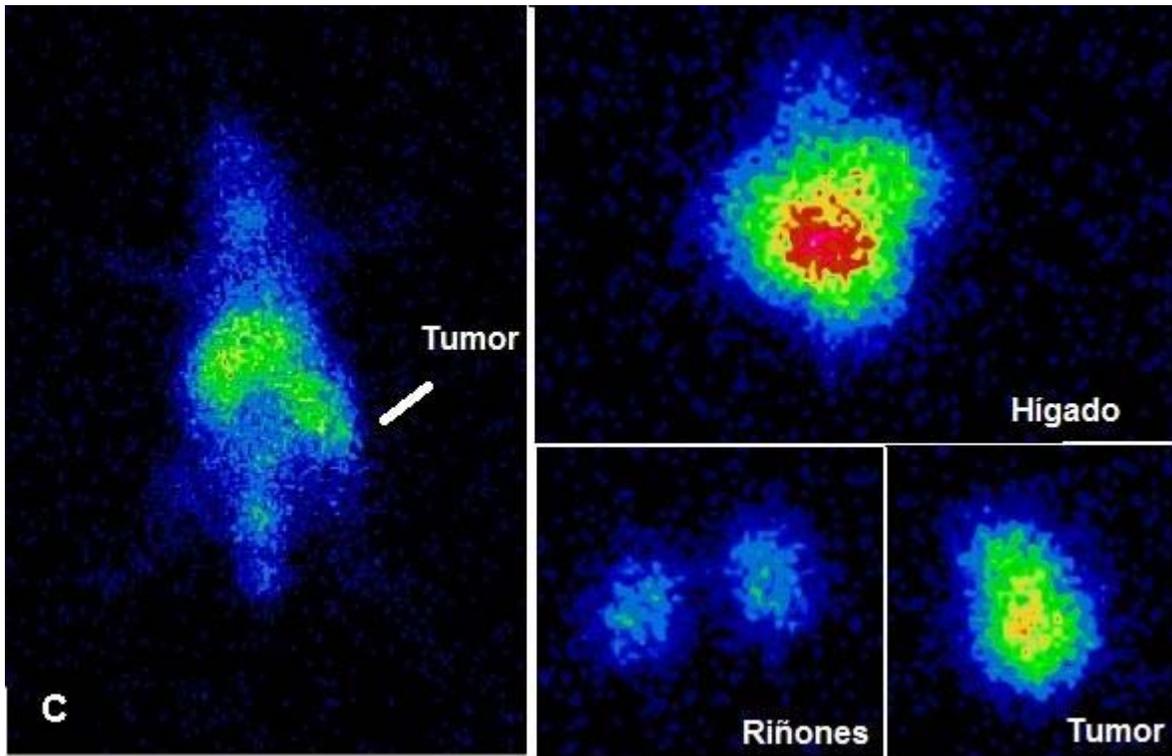


Figura 5.24: Imagen centellográfica de ratón C57 BL/6J portador de melanoma B16/F1 luego de 2 h de la administración de ^{99m}Tc -HYNIC-MSH/Tricina. En las figuras se muestran la imagen de cuerpo entero del ratón y su respectiva biodistribución.

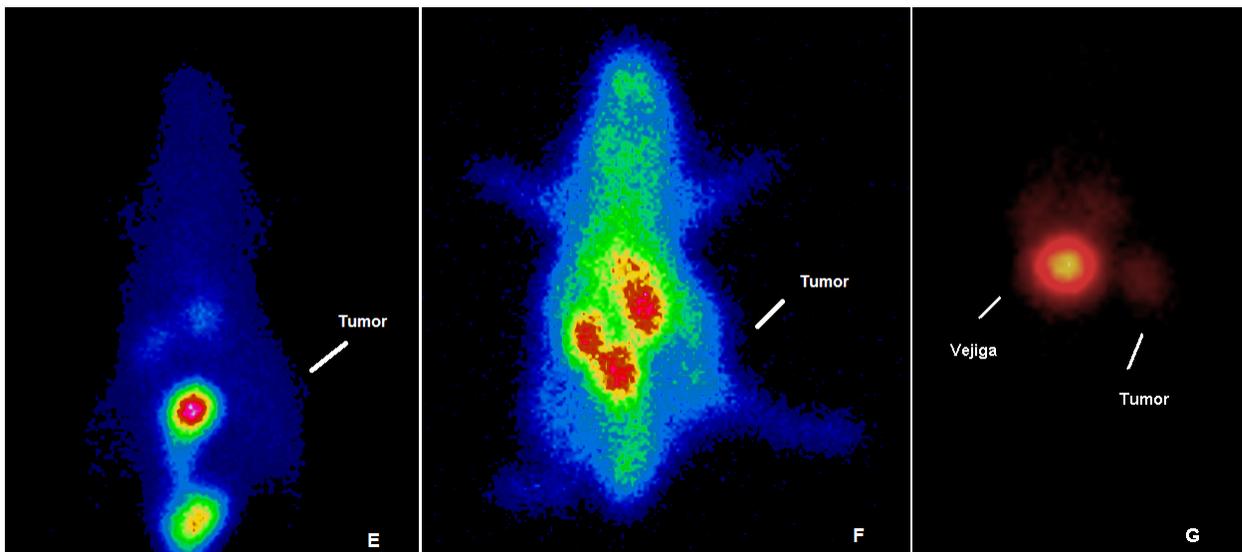


Figura 5.25: Imágenes de C57 BL/6J portadores de melanoma B16/F1 luego de la administración de ^{99m}Tc -HYNIC-MSH/EDDA.

5.7 Discusión

El desarrollo de agentes de radio-imagen, específicos para melanoma, serían de beneficio para el diagnóstico, estadificación y seguimiento de la enfermedad. Actualmente, el diagnóstico de melanoma en Medicina Nuclear, se limita a agentes no específicos. En la búsqueda de agentes específicos para melanoma, unos de los blancos moleculares sobre el que se han dirigido varios esfuerzos, es el receptor 1 de la melanocortina o MC1R. Es así, que uno de los objetivos planteados en este trabajo fue la obtención de un análogo peptídico de la hormona melanocito estimulante y su marcación con ^{99m}Tc .

La preparación de un radiotrazador de ^{99m}Tc requiere de buena estabilidad *in vitro* e *in vivo* y de gran afinidad por su receptor. Es importante también lograr un patrón de distribución con una rápida eliminación sanguínea y baja captación en órganos no blancos. Es entonces de preferencia, una eliminación a nivel renal para evitar acumulación a nivel del tracto gastrointestinal lo que disminuiría la capacidad de detección de tumores a nivel abdomino-pélvico. En este sentido, trabajos previos han comprobado que tanto la secuencia peptídica como el sistema quelante afectan en gran medida el patrón de biodistribución y las vías de eliminación.

En cuanto a la imagen molecular del MC1R, como blanco para diagnóstico y terapia específico de melanoma, trabajos previos han demostrado que la ciclación de análogos de α -MSH permite mejorar la afinidad de unión y la estabilidad *in vivo* del péptido [75]. Durante este trabajo fue posible la obtención de un análogo cíclico de α -MSH conjugado con el quelante bifuncional HYNIC que retiene la afinidad por su receptor con un IC_{50} de 6.5 nM, rango de afinidad observada para otros análogos de α -MSH [126, 109], demostrando la viabilidad de la estrategia de ciclación. En este sentido, HYNIC-cyc-MSH conserva la secuencia de reconocimiento His-D-Phe-Arg-Trp presente en el análogo superpotente NDP. La interacción molecular entre cadenas laterales de un residuo Asp⁵ (COOH) y Lys¹¹ (ϵ -NH₂) contribuyen a una conformación bioactiva, como describió Al-Obeide y colaboradores para una serie de análogos de lactama cíclicos de melanotropina [101].

Para la realización de este trabajo, en la búsqueda de un agente peptídico para imagen específico de melanoma, se seleccionó la marcación con ^{99m}Tc vía HYNIC. Surfray y col. en un modelo peptídico que presenta el derivado HYNIC protegido con un trifluoroacetilo, informaron de la remoción del grupo trifluoroacetilo *in situ* durante las condiciones de marcación con ^{99m}Tc a

temperatura ambiente, mientras que en ausencia de ^{99m}Tc dicha desprotección a temperatura ambiente solo se observó a $\text{pH} < 3.6$ o > 10 [94]. En este sentido y debido a que disponíamos de distintos derivados de HYNIC con su función hidrazino protegida, decidimos evaluar si el pH y/o la temperatura podrían también incidir en la desprotección / marcación. En nuestros experimentos se observó que es posible la marcación eficiente con ^{99m}Tc de los derivados HYNIC-Boc **2** y HYNIC-TFA **5**, a pH 5 y 75°C durante un corto período de tiempo.

Se logró marcar HYNIC-cyc-MSH con ^{99m}Tc , con moderadas actividades específicas, entre 7.5 - 26.9 GBq/ μmol y 3-23 GBq/ μmol , cuando se utilizaron tricina y EDDA, respectivamente. La elección del coligando utilizado en la marcación vía HYNIC es un etapa importante en la evaluación preclínica, motivo por el cual se realizaron estudios *in vitro* que miden parámetros como la estabilidad, lipofilicidad y unión a proteínas, con el fin de predecir patrones de biodistribución. En este sentido, se estudió la estabilidad de los conjugados ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA *in vitro* en PBS y en Suero Fetal Bovino (SFB) a 37°C hasta 4 h. Durante la realización de este estudio confirmamos que la estabilidad del radiocomplejo depende en forma considerable del coligando seleccionado. Cuando el radioconjugado marcado con EDDA se incubó en PBS a 37°C , presentó una estabilidad mayor a 90 % a las 4 h, mientras que el complejo con Tricina se mostró estable hasta 2 h, disminuyendo a un 83% a las 4 h de incubación. Sin embargo, cuando el complejo marcado con Tricina se incubó en PBS con un exceso de coligando se observó una estabilidad del péptido marcado del 97% a las 4 h. Esto confirma observaciones realizadas por Liu y colaboradores, que afirman la necesidad de un exceso de tricina para estabilizar el complejo [90]. Cuando se estudió la estabilidad en SFB, se observó una estabilidad mayor del 90 % a 4 h en ambos radioconjugados. La estabilidad de ambos complejos *in vivo*, se determinó por HPLC en orina, observándose estables luego de una hora post-inyección.

La evaluación de la unión de los complejos a proteínas plasmáticas, es importante ya que altos niveles de unión a proteínas plasmáticas resultan en una circulación sanguínea prolongada reduciendo las relaciones órgano blanco/órgano no blanco. En nuestro estudio se observó, como para otros complejos peptídicos [70], que el complejo con EDDA presenta una unión a proteínas cercano al 10% sin variación significativa a lo largo del tiempo. Mientras que con el uso de tricina se observó una unión a proteínas del 22% a la hora, alcanzando un 27% a las 4 h de incubación. La unión a proteínas plasmáticas es un parámetro que aumenta con la lipofilicidad del radio-

péptido y en algunos casos es un reflejo de la inestabilidad del complejo metálico, lo que lleva a un aumento de la unión del radiometal por las proteínas. El aumento en la unión a proteínas observado para el marcado con tricina, puede ser el resultado de la desestabilización del complejo y no solo la contribución de la hidrofilia del radio-péptido.

La purificación mediante HPLC con el método 1 permitió la separación de los conjugados marcados con ^{99m}Tc del péptido no marcado, condición necesaria para los análogos de melanotropina, ya que la presencia de péptido no marcado compite por la unión de los receptores, disminuyendo la captación del radioconjugado en el tumor [103]. Dicho perfil de purificación también permitió identificar más de un pico, los cuales pueden surgir de los diferentes isómeros formados y/o formas de coordinación con HYNIC, como describe Liu y col. [90].

Los estudios de unión, internalización y retención celular realizados en células murinas B16/F1, mostraron una rápida internalización y retención celular. Una internalización del $83 \pm 3\%$ para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y $55 \pm 4\%$ para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA fue observada a los 40 min de incubación, mientras que a los 90 min se observó una internalización de $87 \pm 5\%$ para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y $82 \pm 6\%$ para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA. Los estudios de externalización demostraron que un $82 \pm 7\%$ de la actividad de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y un $91 \pm 4\%$ de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA permanece dentro de las células a las 2 h de incubación.

Ambos complejos, ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA presentaron buena captación tumoral mediada por receptor de 4.38 ± 1.02 y $3.92 \pm 2.07\%$ A/g a las 2 h post-inyección, respectivamente. El bloqueo de la acumulación de los radioconjugados con un exceso de péptido frío, permitió demostrar una captación específica de los radiopéptidos a nivel del tumor. Ambos radioconjugados presentaron un perfil de biodistribución muy adecuado para un agente de imagen diagnóstico, con buena captación tumoral, elevada eliminación renal y baja retención inespecífica a nivel de los riñones.

Cuando comparamos los resultados obtenidos respecto de lo observado para otros análogos de α -MSH, observamos que la captación a nivel tumoral para estos dos radiopéptidos fue menor a la observada para los análogos cíclicos [^{99m}Tc]CCMSH y [^{99m}Tc]CCMSH(Arg¹¹), sin embargo

presentan una captación renal 10 y 5 veces menor respectivamente a la hora, lo cual deriva en una relaciones tumor/riñón similares a la hora de inyección [86, 108].

Las imágenes son importantes para el diagnóstico, el pronóstico y el plan terapéutico de muchas enfermedades. En los últimos años, el avance de la tecnología, dió lugar a una serie de técnicas de imagen que en combinación permiten la reconstrucción de imágenes que brindan información funcional y su correlación anatómica. Durante la realización de este trabajo ha sido posible la evaluación de los radioconjugados mediante la adquisición de imágenes en 2 dimensiones con gammacamara e imágenes de fusión realizadas en un SPECT/CT de pequeños animales. En las imágenes centellográficas adquiridas fue posible observar una alta captación tumoral, principalmente, cuando se utilizó tricina como coligando. Esto podría explicarse por la diferencia observada a las 2 h en las relaciones tumor/músculo, siendo de 33.7 y 17.8 para ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA respectivamente. Las imágenes de fusión micro-SPECT-CT permitieron observar una elevada captación tumoral del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina, así como también permitió la correlación morfológica y anatómica del tumor con gran resolución.

6 Conclusiones y perspectivas

Durante la realización de este trabajo, con el objetivo de mejorar los rendimientos y reducir tiempos de reacción, se han estudiado distintas condiciones de reacción para la obtención de 6-hidrazino nicotinato de *N*-hidroxi-succinimidilo (Suc-HYNIC) basadas en la aplicación de radiación de MO utilizando un reactor comercial multimodo. Es así que, el uso de MO resultó en rendimientos de reacción mayores o similares a condiciones de calentamiento convencional, en el uso de menor cantidad de reactivos (en el caso de la obtención de la hidrazinopiridina **2**), y en una notoria aceleración de las reacciones.

Recientemente han sido publicados trabajos donde se describen derivados peptídicos que incorporan al ligando bifuncional HYNIC adecuadamente protegido con un grupo trifluoroacetilo, siendo marcados eficientemente con ^{99m}Tc bajo condiciones reductivas con $\text{SnCl}_2 / ^{99m}\text{TcO}_4^-$. En base a estos resultados nos planteamos obtener el derivado Suc-HYNIC-TFA el cual nos podría permitir su derivatización a un análogo peptídico de alfa-MSH en solución y posterior radiosíntesis. Así, se obtuvieron con buen rendimiento los derivados HYNIC-TFA y su éster activado Suc-HYNIC-TFA, éste último no reportado aún en la bibliografía. En base a las condiciones estudiadas, el uso tanto de HYNIC-TFA como Suc-HYNIC-TFA como agentes quelantes bifuncionales, para la conjugación a biomoléculas en solución, podría constituir una opción para conservar los atributos del agente quelante, evitar reacciones de polimerización y una oportuna desprotección *in situ* en las condiciones de marcación con ^{99m}Tc .

Como un estudio inicial en la aproximación al desarrollo de un radiofármaco PET nos planteamos el diseño y la síntesis de derivados del sistema heterocíclico *N*-óxido de piridina, para su unión a la biomolécula en estudio e incorporación del radionucleido ^{18}F mediante reacción de sustitución nucleofílica aromática. En base a los antecedentes bibliográficos se estudió el efecto de la sustitución con $^{19}\text{F}^-$ para el caso de un sistema *N*-óxido de piridina sustituido en posición 6 con un átomo de cloro. Hasta el momento, en las condiciones estudiadas, no se logró optimizar la síntesis del producto de sustitución nucleofílica con ^{19}F . En base a los resultados obtenidos dirigidos a la obtención de *N*-Óxido de 6-fluor-nicotinamida y como proyección de este trabajo, sería conveniente estudiar condiciones de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ utilizando derivados de nicotinamida sustituidos con otros grupos funcionales que constituyan mejores grupos salientes.

La síntesis del conjugado HYNIC-cyc-MSH se dió de manera adecuada empleando una estrategia de síntesis en fase sólida. Fue posible la marcación con ^{99m}Tc , de un análogo cíclico de α -MSH mediante una estrategia simple y eficiente, donde los conjugados se purificaron eficientemente empleando un equipamiento HPLC con columna de fase reversa. La optimización de las marcaciones con ^{99m}Tc permitieron que el radiopéptido ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina tuviera una pureza radioquímica mayor de 95 %.

Las evaluaciones químicas y biológicas de ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH (HYNIC-Nle-cyc[Asp-H-dPhe-RW-Lys]GPV-CONH₂), utilizando tricina y EDDA como coligandos, lo mostraron estable y con buen perfil para la de detección *in vivo* de células que sobreexpresen MC1R.

Los complejos ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/Tricina y ^{99m}Tc -HYNIC-cyc-MSH/EDDA mostraron una buena estabilidad *in vitro* e *in vivo*. Las pruebas de biodistribución mostraron que los radioconjugados conservan su reconocimiento biológico ya que mostraron una alta captación específica por el tumor de melanoma inducido en ratones. Se confirmó la unión específica de los dos radiopéptidos a sus receptores mediante un estudio de competencia con HYNIC-cyc-MSH tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se puede concluir que se cumplió el objetivo general de este trabajo, ya que se puso a punto la marcación con ^{99m}Tc de un análogo de alfa-MSH derivatizado con HYNIC, demostrando dos radiopéptidos desarrollados pueden ser útiles para el diagnóstico específico de tumores primarios de melanoma. De esta forma, con las distintas modalidades de imagen utilizadas, fue posible la detección de tumor de melanoma murino, que presentan sobreexpresión del MC1R.

Como perspectivas a futuro, las altas afinidades de la α -MSH y sus análogos radio-marcados por el MC1R, los presentan como atractivos agentes de imagen para melanoma. Sin embargo, el número relativamente bajo de receptores por célula, demandan para su potencial aplicación en clínica, que los radiofármacos dirigidos contra el MC1R presenten muy elevadas actividades específicas, para evitar el proceso de purificación.

En este sentido, el uso de HYNIC como agente quelante permite marcaciones con elevadas actividades específicas. Durante la realización de este proyecto, limitaciones en el suministro del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, no permitieron evaluar condiciones de mayor actividad específica que las

informadas. En las condiciones estudiadas en este trabajo los marcados con mayor eficiencia se lograron utilizando tricina, sin embargo, varios trabajos resaltan la virtud del uso de un sistema de ligandos ternarios, utilizando en primer lugar tricina y un posterior intercambio con EDDA. Dicho enfoque pretende altas rendimientos de marcación y mayor estabilidad de los complejos de ^{99m}Tc . Por lo tanto, como trabajo a futuro se plantea, evaluar marcaciones con mayor actividad específica, así como la evaluación de un sistema de ligandos ternario, de forma de evitar el paso de purificación y aumentar la estabilidad biológica de forma de obtener un potencial radiofármaco de uso clínico.

7 Abreviaturas

Abreviaturas Generales

α -MSH: Hormona melanocito estimulante (del inglés *melanocyte stimulating hormone*)

AQB: Agente quelante bifuncional

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

GPCR: receptores acoplados a proteínas G (del inglés *G protein-coupled receptors*)

MC: melanocortina

MCR: receptor de melanocortina (del inglés *melanocortin receptor*)

MC1R: receptor 1 de melanocortina

MITF: factor de transcripción asociado a la microftalmia (del inglés *microphthalmia-associated transcription factor*)

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

RMN: Resonancia magnética nuclear

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

TM: transmembrana

$T_{1/2}$: período de semidesintegración

UV: ultravioleta

UVR: Radiación ultravioleta (ultraviolet radiation)

Abreviaturas Químicas

Ac: acetilo

AcOEt: acetato de etilo

ACN: acetonitrilo

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

(Boc)₂O: di-*tert*-butildicarbonato

CC : cromatografía en columna

COSY: espectroscopía de correlación (*correlation spectroscopy*)

CCF: cromatografía en capa fina

DCC: dicitclohexilcarbodiimida

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DOPA: 3,4-dihidroxiifenilalanina

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

DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético

EDDA: ácido etilendiamino-diacético

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

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

IE: ionización por electrospray

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

MAG2: mercaptoacetilglicilglicina

MO: microondas

NHS: N-hidroxisuccinimida

PF: punto de fusión

S_NAr: Sustitución nucleofílica aromática

T amb: Temperatura ambiente

t-BuOH: ter-butanol

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

TMS: tetrametilsilano

UHP: urea hidroxiperóxido

8 Bibliografía

-
- [1] B. A. Pierce, *Genética: Un enfoque conceptual*, Editorial Medica Panamericana, 2010.
- [2] W. Raymond y M. D. Ruddon, *Cancer Biology*, 4th Edition, Oxford University Press, 2007.
- [3] J. Joyce y J. W. Pollard. «Microenvironmental regulation of metastasis» *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, nº 4, pp. 239-252, 2009.
- [4] P. Anand, A. Kunnumakara, C. Sundaram, K. Harikumar, S. Tharakan, O. Lai, B. Sung y B. Aggarwal, *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*, vol. 25, Springer Netherlands, 2008, pp. 2097-2116.
- [5] M. Garcia, A. Jemal, E. M. Ward, M. M. Center, Y. Hao, R. L. Siegel y M. J. Thun. «Global Cancer Facts and Figures 2007» 2007.
- [6] Pan American Health Organization. «PAHO Plan of Action for Cancer Prevention & Control: Cancer in Latin America and the Caribbean» 2008.
- [7] F. Bunz, *Principles of Cancer Genetics*, Springer Netherlands, 2008, pp. 1-47.
- [8] R. K. Thomas, A. C. Baker, R. M. DeBiasi, W. Winckler, T. LaFramboise, W. M. Lin, M. Wang, W. Feng, T. Zander, L. E. MacConaill, J. C. Lee, R. Nicoletti, C. Hatton, M. Goyette, L. Girard, K. Majmudar, L. Ziaugra, K.-K. Wong, S. Gabriel, R. Beroukhir, M. Peyton, J. Barretina, A. Dutt, C. Emery, H. Greulich, K. Shah, H. Sasaki, A. Gazdar, J. Minna, S. A. Armstrong, I. K. Mellinshoff, F. S. Hodi, G. Dranoff, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, S. F. Nelson, L. M. Liau, K. Mertz, M. A. Rubin, H. Moch, M. Loda, W. Catalona, J. Fletcher, S. Signoretti, F. Kaye, K. C. Anderson, G. D. Demetri, R. Dummer, S. Wagner, M. Herlyn, W. R. Sellers, M. Meyerson y L. A. Garraway. «High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer» *Nat Genet*, vol. 39, pp. 347-351, 2007.
- [9] C. M. Croce. «Oncogenes and Cancer » *N Engl J Med*, vol. 358, pp. 502-511, 2008.
- [10] R. Weinberg. «Tumor suppressor genes » *Science*, vol. 254, pp. 1138-1146, 1991.
- [11] D. Fawcett, *Tratado de Histología*, Duodécima Edición, McGraw-Hill, 1995.
- [12] J. J. Nordlund. «The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept » *Dermatologic Clinics*, vol. 25, pp. 271-281, 2007.
- [13] A. A. Nascimento, J. T. Roland y V. I. Gelfand. «Pigment cells: A model for the study of organelle transport » *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 19, pp. 469-491, 2003.
- [14] R. Furuya, S. Akiu, R. Ideta, M. Naganuma, M. Fukuda y T. Hirobe. «Changes in the proliferative activity of epidermal melanocytes in serum-free primary culture during the development of ultraviolet radiation B-induced pigmented spots in hairless mice » *Pigment Cell Res*, vol. 15, p. 348-356, 2002.
- [15] A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara y J. Wortsman. «Melanin Pigmentation in

- Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation » *Physiol Rev* , vol. 84, p. 1155–1228, 2004.
- [16] G. Raposo, D. Tenza, D. Murphy, J. Berson y M. Marks. «Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells» *J Cell Biol*, vol. 152, nº 4, pp. 809-24., 2001.
- [17] G. Raposo y M. Marks. «Melanosomes: dark organelles enlighten endosomal membrane transport » *Nat Rev Mol Cell Biol.*, vol. 8, nº 10, pp. 786-797, 2007.
- [18] H. Schiöth, R. Muceniece, J. Wikberg y V. Chhajlani. «Characterisation of melanocortin receptor subtypes by radioligand binding analysis » *Eur J Pharmacol*, vol. 288, nº 3, pp. 311-7, 1995.
- [19] R. Cone, K. Mountjoy, L. Robbins, J. Nadeau, K. Johnson, L. Roselli-Reh fuss y M. Mortrud. «Cloning and functional characterization of a family of receptors for the melanotropic peptides » *Ann N Y Acad Sci*, vol. 31, nº 680, pp. 342-363, 1993.
- [20] J. García Borrón, B. Sánchez Laorden y C. Jimenez Cervantes. «Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation » *Pigment Cell Res*, vol. 18, pp. 393-410, 2005.
- [21] T. Brzoska, T. Luger, C. Maaser, C. Abels y M. Böhm. «Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases » *Endocr Rev*, vol. 29, nº 5, pp. 581-602, 2008.
- [22] C. Wasmeier, A. N. Hume, G. Bolasco y M. Seabra. «Melanosomes at a glance » *Journal of Cell Science*, vol. 121, pp. 3995-3999, 2008.
- [23] R. Cone, D. Lu, S. Koppula, D. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. Orth, C. Pouton y R. Kesterson. «The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation » *Recent Prog Horm Res*, vol. 51, pp. 287-318, 1996.
- [24] J. D'Orazio, T. Nobuhisa, R. Cui, M. Arya, M. Spry, k. Wakamatsu, V. Igras, T. Kunisada, S. Granter, E. Nishimura, S. Ito y D. Fisher. «Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning » vol. 443, nº 7109, pp. 340-4, 2006.
- [25] J. Lin y D. Fisher. «Melanocyte biology and skin pigmentation » *Nature*, vol. 445, nº 7130, pp. 843-50., 2007.
- [26] M. Böhm, I. Wolff, T. Scholzen, S. Robinson, E. Healy, T. Luger, T. Schwarz y A. Schwarz. «alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage » *J Biol Chem*, vol. 280:, nº t, pp. 5795-802, 2005 .
- [27] X. Song, N. Mosby, J. Yang J, A. Xu, Z. Abdel-Malek y A. Kadearo. «alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes » *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 22, nº 6, pp. 809-818, 2009.

- [28] P. Valverde, E. Healy, I. Jackson, J. Rees y A. Thody. «Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans » *Nat Genet*, vol. 11, nº 3, pp. 328-330., 1995 .
- [29] P. Williams, C. Olsen, N. Hayward y D. Whiteman. «Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden » *Int J Cancer*, vol. 129, nº 7, pp. 1730-1740, 2011.
- [30] P. Prusis, H. Schiöth, R. Muceniece, P. Herzyk, M. Afshar, R. Hubbard y J. Wikberg. «Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide » *J Mol Graph Model*, vol. 15, nº 5, pp. 307-17, 334, 1997.
- [31] B. Sánchez Laorden, J. Sánchez Más, E. Martínez Alonso, J. Martínez Menárguez, J. García Borrón y C. Jiménez Cervantes. «Dimerization of the Human Melanocortin 1 Receptor: Functional Consequences and Dominant-Negative Effects » *J Invest Dermatol*, vol. 126, nº 1, pp. 172-181., 2006.
- [32] E. Wallin E y G. von Heijne. «Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study » *Protein Eng*, vol. 8, nº 7, pp. 693-8., 1995.
- [33] V. Chhajlani, X. Xu, J. Blauw y S. Sudarshi. «Identification of ligand binding residues in extracellular loops of the melanocortin 1 receptor » *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 219, nº 2, pp. 521-5., 1996.
- [34] P. Frändberg, M. Doufexis, S. Kapas y V. Chhajlani. «Cysteine residues are involved in structure and function of melanocortin 1 receptor: Substitution of a cysteine residue in transmembrane segment two converts an agonist to antagonist » *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 281, nº 4, pp. 851-857., 2001.
- [35] H. Schiöth, S. Phillips, R. Rudzish, M. Birch-Machin, J. Wikberg y J. Rees. «Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair » *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 260, nº 2, pp. 488-91, 1999.
- [36] C. Haskell-Luevano, T. Sawyer, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Bikker, C. Humblet, I. Gantz y V. Hruby. «Three-dimensional molecular models of the hMC1R melanocortin receptor: complexes with melanotropin peptide agonists » *Drug Des Discov*, vol. 14, nº 3, pp. 197-211, 1996.
- [37] D. Lu, D. Vage y R. Cone. «A ligand-mimetic model for constitutive activation of the melanocortin-1 receptor » *Mol Endocrinol*, vol. 12, nº 4, pp. 592-604, 1998.
- [38] Y. Yang, C. Dickinson, C. Haskell-Luevano y C. Gantz. «Molecular basis for the interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷]melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor » *J Biol Chem*, vol. 272, nº 37, p. 23000–23010, 1997.

- [39] M. Garcia, A. Jemal, EM. Ward, MM. Center, Y. Hao, RL. Siegel, MJ. Thun. «Global Cancer Facts and Figures » Atlanta, American Cancer Society, 2012.
- [40] M. B. Lens y M. Dawes, «Global perspectives of contemporary epidemiological trends,» *British Journal of Dermatology*, vol. 150, pp. 179-185, 2004.
- [41] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu y M. Thun. «Cancer Statistics, 2009 » *CA Cancer Journal for Clinicians*, 2009.
- [42] M. P. Curado, B. Edwards, H. R. Shin, H. Storm, J. Ferlay, M. Heanue y P. Boyle. «Cancer Incidence in Five Continents » n° 160, 2007.
- [43] E. Barrios, J. A. Vasallo, R. Alonso, M. Garau y C. Musetti. «III Atlas de incidencia del cancer en el Uruguay 2002-2006 » Comision Honoraria de Lucha Contra el Cancer, Montevideo, 2010.
- [44] E. Barrios y J. A. Vasallo. «IV Atlas de Mortalidad por Cáncer en el Uruguay 2004-2008 » Comision Honoraria de Lucha Contra el Cancer, Montevideo, 2011.
- [45] B. Bandarchi, L. Ma, R. Navab, A. Seth y G. Rasty. «From melanocyte to metastatic malignant melanoma » *Dermatolog Res Pract*, vol. 2010, pp. 5837-48, 2010.
- [46] G. Palmieri, M. Capone, M. L. Ascierto, G. Gentilcore, D. F. Stroncek, M. Casula, M. C. Sini, M. Palla, N. Mozillo y P. A. Ascierto. «Main roads to melanoma » *J Transl Med*, vol. 7, pp. 86-103, 2009.
- [47] R. M. MacKie, A. Hauschild y A. M. M. Eggermont. «Epidemiology of invasive cutaneous melanoma » *Annals of Oncology*, vol. 20, n° 6, pp. vi1-vi7, 2009.
- [48] J. Lomas, P. Martin-Duque, M. Pons y M. Quintanilla. «The genetics of malignant melanoma » *Front Biosci*, pp. 5071-5093, 2008.
- [49] A. Larre Borges, M. Scarone, L. Delgado, J. Núñez, M. Laporte, G. Fernández, C. Bazzano y M. Martínez Asuaga. «Predisposición hereditaria de padecer melanoma en familias uruguayas » *Revista Médica del Uruguay*, vol. 23, n° 2, pp. 109-115, 2007.
- [50] S. Raimondi, F. Sera, S. Gandini, S. Iodice, S. Caini, P. Maisonneuve y M. C. Fagnoli. «MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis » *Int J Cancer*, vol. 122, n° 12, pp. 2753-60, 2008.
- [51] International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. «The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review » *Int J Cancer*, vol. 120, n° 5, pp. 1116-22., 2007.
- [52] F. Nachbar, W. Stolz, T. Merkle, A. Cognetta, T. Vogt, M. Landthaler, P. Bilek, O. Braun-Falco y G. Plewig. «The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the

- diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions » *J Am Acad Dermatol*, vol. 30, nº 4, pp. 551-9, 1994.
- [53] W. J. Clark, L. From, E. Bernardino y M. Mihm. «The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin » *Cancer Res*, vol. 29, nº 3, pp. 705-27, 1969.
- [54] C. Balch, J. Gershenwald, S. Soong, J. Thompson, M. Atkins, D. Byrd, A. Buzaid, A. Cochran, D. Coit, S. Ding, A. Eggermont, K. Flaherty, P. Gimotty, J. Kirkwood, K. McMasters, M. J. Mihm, D. Morton, M. Ross, A. Sober y V. Sondak. «Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification » *J Clin Oncol*, vol. 27, nº 36, pp. 6199-206, 2009.
- [55] S. J. Vidwans, K. T. Flaherty, D. E. Fisher, J. M. Tenenbaum, M. D. Travers, J. Shrager. «A melanoma molecular disease model » *PLoS One.*, vol. 6, nº 3, pp. e18257, 2011.
- [56] C. M. Balch, J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, A. C. Buzaid, A. J. Cochran, D. Coit, S. Ding, A. M. Eggermont, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. C. J. Mihm y D. L. Morton. «Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification » *J Clin Oncol*, vol. 27, nº 36, pp. 6199-206, 2009.
- [57] B. Zbytek, J. A. Carlson, J. Granese, J. Ross, M. C. J. Mihm MC y A. Slominski. «Current concepts of metastasis in melanoma » *Expert Rev Dermatol*, vol. 3, nº 5, pp. 569-585, 2008.
- [58] J. Priario, G. Lago, J. F. Borges, R. Levin y E. Touya. «Estudio centellográfico del drenaje linfático de los melanomas malignos del tronco » *Cir Urug*, vol. 54, nº 1, pp. 1-4, 1984.
- [59] O. Alonso, M. Martínez, G. Lago, C. Bazzano y A. Saadoun. «Scintigraphic detection of invasive cutaneous malignant melanoma with Tc-99m MIBI » *Clin Nucl Med*, vol. 21, nº 7, pp. 557-9., 1996.
- [60] G. Mariani, P. Erba, G. Mancao, G. Villa, M. Gipponi, G. Boni, F. Buffoni, S. Suriano, F. Castagnola, M. Bartolomei y H. W. Strauss. «Radioguided sentinel lymph node biopsy in patients with malignant cutaneous melanoma: The nuclear medicine contribution » *J. Surg. Oncol*, vol. 85, nº 3, pp. 141-151, 2004.
- [61] O. Alonso, M. Martínez, L. Delgado, A. De León, D. De Boni, G. Lago, M. Garcés, F. Fontes, J. Espasandín y J. Priario. «Staging of regional lymph nodes in melanoma patients by means of ^{99m}Tc-MIBI scintigraphy » *J Nucl Med*, vol. 44, nº 10, pp. 1561-5, 2003.
- [62] C. Buchbender, T. A. Heusner, T. C. Lauenstein, A. Bockisch y G. Antoch. « Oncologic PET/MRI, Part 2: Bone Tumors, Soft-Tissue Tumors, Melanoma, and Lymphoma » *J Nucl Med* vol. 53, pp. 1244–1252, 2012.

- [63] B. Krug, R. Crott, M. Lonneux, J. Baurain, A. Pirson y T. Vander Borcht. «Role of PET in the Initial Staging of Cutaneous Malignant Melanoma: Systematic Review » *Radiology*, vol. 249, nº 3, pp. 836-844, 2008.
- [64] W. D. Holder, R. L. White, J. H. Zuger, E. J. Easton y F. Greene. «Effectiveness of Positron Emission Tomography for the Detection of Melanoma Metastases » *Annals of Surgery*, vol. 227, nº 5, pp. 764-771, 1998.
- [65] R. Kumar, A. Mavi, G. Bural y A. Alavi. «Fluorodeoxyglucose-PET in the management of malignant melanoma » *Radiol Clin North Am*, vol. 43, nº 1, pp. 23-33., 2005.
- [66] Mankoff, DA. « A definition of molecular imaging » *J Nuc Med*, vol 48, nº 6, pp 18N-21N, 2007.
- [67] F. Eleta, J. San Román, F. Ogresta y M. Eleta. «Imágenes Moleculares: Morfología y Función » *Rev Argent Radiol*, vol. 68, pp. 201-22, 2004.
- [68] J. Vagner, H. Qu y V. J. Hruby. «Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery » *Curr Opin Chem Biol*, vol. 12, nº 3, p. 292–296.
- [69] G. Weckbecker, F. Raulf, B. Stolz y C. Bruns. «Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer » *Pharmacol Ther*, vol. 60(2), pp. 245-64., 1993.
- [70] C. Decristóforo, L. Melendez-Alafort, J. Sosabowski y S. Mather, «^{99m}Tc-HYNIC-[Tyr³]-Octreotide for Imaging Somatostatin-Receptor-Positive Tumors: Preclinical Evaluation and comparison with ¹¹¹In-Octreotide,» *J. Nucl. Med.* , vol. 41, nº 6, pp. 1114-1119.
- [71] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez y M. Khrestchatsky. «Synthetic therapeutic peptides: Science and Market » *Drug Discovery Today*, vol. 15, nº 1/2, pp. 40-56, 2010.
- [72] H. Maecke. «Radiolabeled Peptides in Nuclear Oncology: Influence of Peptide Structure and Labeling Strategy on Pharmacology » de *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings: MOLECULAR IMAGING*, vol. Volume 49, Springer , 2005, pp. 43-72.
- [73] R. Haubner y C. Decristoforo, Radiotracer II: Peptide-Based Radiopharmaceuticals, de *Small Animal Imaging*, Springer, 2011,, pp. 247-266.
- [74] V. Hruby. «Designing peptide receptor agonist and antagonist » *Nature*, vol. 1, pp. 847-858, 2002.
- [75] T. K. Sawyer, V. J. Hruby, P. S. Darman y M. E. Hadley. «[half-Cys⁴,half-Cys¹⁰]-a-Melanocyte-stimulating hormone: A cyclic-a-melanotropin exhibiting superagonist biological activity » *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 79, pp. 1751-1755, 1982.
- [76] X. Chen, R. Park, A. Shahinian, J. Bading y P. Conti. «Pharmacokinetics and tumor retention of ¹²⁵I-labeled RGD peptide are improved by PEGylation » *Nucl Med Biol*, vol. 31, nº 1, pp. 11-9, 2004.

- [77] C. Decristóforo y S. Mather. «^{99m}Techentium-Labelled peptide HYNIC conjugates: Effects of lipophilicity and stability on biodistribution » *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 26, pp. 389-396, 1999.
- [78] T. Saleh, Radiopharmacy Basis, de *Basic Science of Nuclear Medicine*, Springer, 2010.
- [79] S. Liu. «The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals » *Chem. Soc. Rev.* , vol. 27, pp. 43-55, 2003.
- [80] S. Liu. «Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides » *Advanced drugs delivery reviews*, vol. 60, pp. 1347-1370, 2008.
- [81] T. Saleh, Techentium-99m Radiopharmaceuticals, de *Basic Sciences of Nuclear Medicine*, 2010.
- [82] S. Vallabhajosula. Chemistry of metal radionuclides (Rb, Ga, In, Y, Cu, Tc). Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, de *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer, 2009, pp. 179 -196.
- [83] Internacional Atomic Energy Agency, «Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of kits,» Viena, 2004.
- [84] R. Hom y J. Katzenellenbogen. «Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results » *Nucl Med Biol*, vol. 24, nº 6, pp. 485-98, 1997.
- [85] J. Chen, Z. Cheng, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson y T. P. Quinn. «Melanoma-targeting Properties of ^{99m}Techentium-labeled Cyclic α -Melanocyte stimulating hormone peptide analogues » *Cancer Res*, vol. 60, p. 5649–5658, 2000.
- [86] M. J. Abrams, M. Juweid, C. I. tenKate, D. A. Schwartz, M. M. Hauser, F. E. Gaul, A. J. Fucello, R. H. Rubin, H. W. Strauss y A. J. Fischman. «Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats » *J. Nucl. Med.*, vol. 31, pp. 2022-2028, 1990.
- [87] Y. C. Li, T. Z. Tan, J. G. Zheng y C. Zhang. «Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonictinamide derivative and N-hydroxysuccinimidyl S-acetylmercaptoacetyltriglycine: a comparison of radiochemical behaviors and biological properties » *World J Gastroenterol.*, vol. 14, nº 14, pp. 2235-40., 2008.
- [88] H. J. Rennen, O. C. Boerman, E. B. Koenders, W. J. Oyen y F. H. Corstens. «Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction » *Nucl. Med. Biol.*, vol. 6, pp. 599-604, 2000.
- [89] , L. K. Meszaros, A. Dose, S. C. Biagini y P. J. Blower. «Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry » *Inorganica*

Chimica Acta, vol. 363, nº 6, p. 1059–1069, 2010.

- [90] S. Liu, D. S. Edwards, A. R. Harris, S. J. Heminway y J. A. Barrett. «Technetium Complexes of a Hydrazinonicotinamide-Conjugated Cyclic Peptide and 2-Hydrazinopyridine: Synthesis and Characterization » *Inorg Chem*, vol. 38, p. 1326–1335, 1999.
- [91] W. E. Greenland, K. Howland, J. Hardy, I. Fogelman y P. J. Blower. «Solid phase synthesis of peptide radiopharmaceuticals using Fmoc-N-(Hynic-Boc)-lysine, a technetium binding amino-acid application to Tc-99m-labeled salmon calcitonin » *J Med Chem*, vol. 46, pp. 1751 - 1757, 2003.
- [92] M. B. Surfraz, R. King, S. J. Mather, S. C. G. Biagini y P. J. Blower. «Trifluoroacetyl-HYNIC peptides: synthesis and ^{99m}Tc radiolabeling » *J Med Chem*, vol. 50, 2007.
- [93] T. D. Harris, M. Sworin, N. Williams, M. Rajopadhye, P. R. Dampohousse, D. Glowacka, M. J. Poirier y K. Yu. «Synthesis of stable hydrazones of a hidrazinonicotinyl-Modified peptide for the preparation of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals » *Bioconjugate Chem*, vol. 10, pp. 808-814, 1999.
- [94] D. S. Edwards, S. Liu, A. R. Harris, M. J. Poirier y B. A. Ewels. « ^{99m}Tc -Labeling oh hydrazones of hidrazinonicotinamide conjugated cyclic peptide » *Bioconjugate Chem*, vol. 10, pp. 803-807, 1999.
- [95] M. B. Surfraz, S. C. Biagini y P. J. Blower. «A technetium intermediate specifically promotes deprotection of trifluoroacetyl HYNIC during radiolabelling under mild conditions » *Dalton Trans.*, pp. 2920-2922, 2008.
- [96] J. Tatro, M. Atkins, J. Mier, S. Hardarson, H. Wolfe, T. Smith, M. Entwistle y S. Reichlin. «Melanotropin receptors demonstrated in situ in human melanoma » *J Clin Invest*, vol. 85, nº 6, pp. 1825-32, 1990.
- [97] F. Salazar-Onfray, M. López, A. Lundqvist, A. Aguirre, A. Escobar, A. Serrano, C. Korenblit, M. Petersson, V. Chhajlani, O. Larsson y R. Kiessling. «Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker » *Br J Cancer*, vol. 87, nº 4, p. 414–422, 2002.
- [98] W. Siegrist, F. Solca, S. Stutz, L. Giuffrè, S. Carrel, J. Girard y A. Eberle. «Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells » *Cancer Res*, vol. 49, nº 22, pp. 6352-8., 1989.
- [99] Y. Miao, D. Whitener, W. Feng, N. Owen, J. Chen y T. Quinn. «Evaluation of the human melanoma targeting properties of radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues » *Bioconjug Chem*, vol. 14, nº 6, pp. 1177-84, 2003 .
- [100] T. Sawyer, P. Sanfilippo, V. Hruby, M. Engel, C. Heward, J. Burnett y M. Hadley. «4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent

- alpha-melanotropin with ultralong biological activity » *Proc Natl Acad Sci*, vol. 77, nº 10, pp. 5754-8, 1980.
- [101] F. Al-Obeidi, A. M. d. L. Castrucci, M. E. Hadley y V. J. Hruby. «Potent and prolonged acting cycling lactam analogues of alpha-melanotropin: Design based on molecular dynamics » *J Med Chem*, vol. 32, pp. 2555-2561, 1989.
- [102] M. Giblin, N. Wang, T. Hoffman, S. Jurisson y T. Quinn. «Design and characterization of a-melanotropin peptide analogs cyclized through rhenium and technetium metal coordination » *Proc Natl Acad Sci*, vol. 95, pp. 12814-12818, 1998.
- [103] J. Chen, M. Giblin, N. Wang, S. Jurisson y T. Quinn. «In vivo evaluation of $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -labeled linear alpha-melanocyte stimulating hormone analogs for specific melanoma targeting » *Nucl Med Biol*, vol. 26, nº 6, pp. 687-93, 1999 .
- [104] T. Quinn, X. Zhang y Y. Miao. «Targeted melanoma imaging and therapy with radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues » *G Ital Dermatol Venereol*, vol. 145, nº 2, p. 245–258., 2010.
- [105] E. Wright, D. Bard, T. Maughan, C. Knight y D. Page-Thomas. «The use of a chelating derivative of alpha melanocyte stimulating hormone for the clinical imaging of malignant melanoma » *Br J Radiol*, vol. 65, nº 770, pp. 112-8, 1992.
- [106] Z. Cheng, J. Chen, Y. Miao, N. Owen, T. Quinn , and S. Jurisson. « Modification of the structure of a metallopeptide: synthesis and biological evaluation of (111)In-labeled DOTA-conjugated rhenium-cyclized alpha-MSH analogues » *J Med Chem*, vol. 45, nº 14, pp 3048-56, 2002.
- [107] S. Froidevaux, M. Calame-Christe, J. Schuhmacher, H. Tanner, R. Saffrich, M. Henze y A. N. Eberle. «A gallium-labeled DOTA-alpha-melanocyte- stimulating hormone analog for PET imaging of melanoma metastases » *J Nuc Med*, vol. 45, nº 1, pp. 116-23., 2004.
- [108] P. Raposinho, J. Correia, S. Alves, M. Botelho y I. Santos. «A $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})(3)$ -labeled pyrazolyl-alpha-melanocyte-stimulating hormone analog conjugate for melanoma targeting » *Nucl Med Biol*, vol. 35, nº 1, pp. 91-9, 2008 .
- [109] H. Guo, J. Yang, F. Gallazzi y Y. Miao. «Reduction of the ring size of radiolabeled lactam bridge-cyclized alpha-MSH peptide, resulting in enhanced melanoma uptake » *J Nucl Med*, vol. 51, nº 3, pp. 418-26, 2010.
- [110] I. Peñuelas Sanches. «Radiofármacos PET » *Rev Esp. Med Nuclear*, vol. 20, pp. 477-498, 2001.
- [111] O. Alonso. «Impacto clínico de la tomografía de emisión por positrones (PET) en pacientes oncológicos y su potencial aplicación en el contexto sanitario y académico nacional » *Rev Med Uru.* , vol. 22, pp. 169-178, 2006.

- [112] S. Ametamey, M. Honer y P. Schubiger. «Molecular Imaging with PET » *Chem. Rev*, vol. 108, p. 1501–1516, 2008.
- [113] D. Le Bars. «Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography » *J Fluorine Chem.*, vol. 127, p. 1488–1493, 2006.
- [114] S. Okarvi. «Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals » *Eur J Nucl Med*, vol. 28, p. 929–938, 2001.
- [115] J. Becaud, L. Mu, M. Karamkam, P. Schubiger, S. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, L. Lehmann, S. Borkowski, D. Berndorff, , L. Dinkelborg, A. Srinivasan, R. Smits y B. Koksc. «Direct One-Step ^{18}F -Labeling of Peptides via Nucleophilic Aromatic Substitution » *Bioconjugate Chem*, vol. 20, p. 2254–2261, 2009.
- [116] D. Olberg, O. Hjelstuen, M. Solbakken, J. Arukwe, H. Karlsen y A. Cuthbertson. «A Novel Prosthetic Group for Site-Selective Labeling of Peptides for Positron Emission Tomography » *Bioconjugate Chem*, vol. 19, p. 1301–1308, 2008.
- [117] Y. Gao, H. Kuwabara, C. Spivak, Y. Xiao, K. Kellar, H. Ravert, A. Kumar, M. Alexander, J. Hilton, D. Wong, R. Dannals y A. Horti. «Discovery of (-)-7-Methyl-2-exo-[3'-(6-[^{18}F]fluoropyridin-2-yl)-5'-pyridinyl]- 7-azabicyclo[2.2.1]heptane, a Radiolabeled Antagonist for Cerebral Nicotinic Acetylcholine Receptor (r4_2-nAChR) with Optimal Positron Emission Tomography Imaging Properties » *J. Med. Chem*, vol. 51, p. 4751–4764, 2008.
- [118] F. Dolle, L. Dolci, H. Valette, F. Hinnen, F. Vaufrey, L. Guenther, C. Fuseau, C. Coulon, M. Bottlaender y M. Crouzel. «Synthesis and Nicotinic Acetylcholine Receptor in Vivo Binding Properties of 2-Fluoro-3-[2(S)-2-azetidylmethoxy]pyridine: A New Positron Emission Tomography Ligand for Nicotinic Receptors » *J. Med. Chem*, vol. 42, pp. 2251-2259, 1999.
- [119] B. Kuhnast, B. Bruin, F. Hinnen, B. Tavitian y F. Dolle. «Design and Synthesis of a New [^{18}F]Fluoropyridine-Based Haloacetamide Reagent for the Labeling of Oligonucleotides: 2-Bromo-N-[3-(2-[^{18}F]fluoropyridin-3-yloxy)propyl]acetamide » *Bioconjugate Chem*, , vol. 15, pp. 617-627, 2004.
- [120] A. Albini y S. Pietra, *Heterocyclic N-Oxides*, CRC Press, 2000.
- [121] T. Gilchrist, *Química Heterocíclica*, Segunda Edición ed., Wesley Iberoamericana, 1995.
- [122] L. Perreux y A. Loupy. «A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations» *Tetrahedron Lett*, vol. 57, pp. 9199-9223, 2001M.
- [123] F. García, *Marcación y evaluación biológica de un anticuerpo anti-EGFR con ^{99m}Tc como potencial radiofármaco de diagnóstico*, Universidad de la República, 2009.
- [124] D. Yoo, J. S. Oh, D.-W. Lee y Y. G. Kim. «Efficient Synthesis of a Configurationally Stable I-

Serinal Derivative » *J Org Chem*, vol. 68, p. 2979–2982, 2003.

- [125] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis, 1995.
- [126] Z. Cheng, J. Chen, T. Quinn TP y S. Jurisson. «Radioiodination of rhenium cyclized alpha-melanocyte-stimulating hormone resulting in enhanced radioactivity localization and retention in melanoma » *Cancer Res*, vol. 64, nº 4, pp. 1411-8., 2004 .

9 Agradecimientos

Quisiera agradecer a aquellas personas que han contribuido a la realización de este proyecto:

A mi familia por acompañarme en todos los momentos.

A mis directores de tesis, Dres. Williams Porcal, Pablo Cabral y Thomas Quinn por su confianza y dedicación, quienes con sus conocimientos, paciencia y su motivación han logrado en mí que pueda terminar esta etapa con éxito. Muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Radiofarmacia, con quienes compartimos el trabajo diario, y por estar presentes en los buenos momentos, y también en los difíciles.

A Marcelo Fernández, por todo su trabajo, tiempo y dedicación.

A los compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, por su paciencia y ayuda.

A los colegas y amigos de la Universidad de Missouri, muy especialmente a los Dres. Fabio Gallazzi y Xiuli Zhang por su tiempo, interés y enseñanza.

Al personal técnico y médico de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, por su buena disposición, colaboración y conocimientos.

A María Moreno por su constante colaboración en el trabajo experimental.

A las instituciones que han permitido y contribuido al desarrollo de este proyecto:

- *Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República.*
- *Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)-beca de posgrado*
- *Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA-Química, Uruguay*
- *Comisión Sectorial de Investigación Científica, (CSIC), Uruguay.*
- *Comisión Honoraria de la Lucha Contra el Cancer*

A mis amigos y a Marcos, por su apoyo y tiempo compartido.

Muchas Gracias a todos por su aporte

Fer