



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS ^{99m}Tc -ANÁLOGOS DE LA
HORMONA MELANOCITO ESTIMULANTE (ALFA-MSH) COMO
AGENTES DE IMAGENOLOGÍA MOLECULAR EN MELANOMA**

TESIS - DOCTORADO EN QUÍMICA

Q.F VANIA TEIXEIRA FERREIRA

LABORATORIO DE RADIOFARMACIA, CENTRO DE INVESTIGACIONES NUCLEARES,
FACULTAD DE CIENCIAS.

TUTORES:

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

*Dr. Juan Pablo Gambini, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas,
Facultad de Medicina, UdelaR*

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

Resumen	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Cáncer	7
1.1.1. El cáncer como enfermedad genética.....	8
1.1.2. Estadísticas de cáncer	9
1.2. La Piel	10
1.2.1. Pigmentación de la piel.....	12
1.2.2. Regulación de los melanocitos por la radiación ultravioleta	13
1.2.3. Receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R)	14
1.2.4. Estructura del MC1R	15
1.2.5. Hormona α -melanocito estimulante (α -MSH).....	18
1.3. Cáncer de piel.....	19
1.4. Melanoma.....	20
1.4.1. Epidemiología.....	21
1.4.2. Factores de riesgo	23
1.4.3. Clasificación histopatológica del melanoma cutáneo.....	24
1.4.4. Detección precoz.....	25
1.4.5. Diagnóstico, estadificación y pronóstico	26
1.5. Imagenología molecular.....	28
1.5.1. Radiofármacos	30
1.5.2. Radiofármacos de Diagnóstico.....	31
1.5.3. Radionucleido: ^{99m}Tc	32
1.5.4. Estrategias de marcación con ^{99m}Tc	34
1.5.5. Ligandos bifuncionales de ^{99m}Tc	36
1.5.6. <i>Core</i> [O=Tc=O] ⁺	38
1.5.7. <i>Core</i> [Tc]HYNIC	38
1.5.8. HYNIC: grupos protectores	41
1.6. Síntesis de Péptidos	44
1.6.1. Racemización	45
1.6.2. Grupos protectores para N_{α} - aminoácidos	49
1.6.3. Métodos de acoplamiento.....	50
1.6.4. Resinas de fase sólida	51
1.6.3. Aminoácidos.....	55

2.	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	57
3.	OBJETIVOS.....	65
3.1.	Objetivo general.....	66
3.2.	Objetivos específicos	66
4.	SÍNTESIS ORGÁNICA.....	68
4.1.	Materiales y métodos	69
4.1.1.	Síntesis de resina de Wang	71
4.1.2.	Síntesis de ligando bifuncional tetraamino (II)	72
4.1.3.	Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-Boc	75
4.1.4.	Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-TFA	78
4.1.5.	Síntesis de péptidos análogos de α -MSH.....	81
4.2.	SÍNTESIS ORGÁNICA: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4.2.1.	Síntesis de resina de Wang	87
4.2.2.	Síntesis de ligandos bifuncionales tetraamino I y II	88
4.2.3.	Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-Boc	98
4.2.4.	Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-TFA	105
4.2.5.	Síntesis de péptidos análogos de α -MSH.....	110
5.	MARCACIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE α -MSH CON ^{99m}Tc	122
5.1.	Metodología experimental: Generalidades	123
5.1.1.	Ensayo <i>in vitro</i> de unión competitiva (IC_{50}).....	124
5.1.2.	Marcación con ^{99m}Tc , purificación y estabilidad de los ^{99m}Tc -péptidos α -MSH	124
5.1.3.	Evaluación del coeficiente de partición o Log P.....	126
5.1.4.	Evaluación de unión a proteínas y estabilidad en suero fetal bovino	127
5.1.5.	Estudio en células de melanoma murino.....	127
5.1.6.	Evaluación <i>in vivo</i> de perfiles de biodistribución en modelo murino.....	128
5.1.7.	Evaluación <i>in vivo</i> en modelo murino: imágenes centellográficas y micro SPECT/CT.....	129
5.1.8.	Evaluación <i>in vivo</i> en modelo murino mediante trazador fluorescente (ICG- α -MSH)	129
	MARCACIÓN: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	130
5.2.	Resultados.....	130
5.2.1.	Ensayo <i>in vitro</i> de unión competitiva (IC_{50}).....	130
5.2.2.	Marcación con ^{99m}Tc , purificación y estabilidad de los ^{99m}Tc -péptidos α -MSH	131
5.2.3.	Determinación de los coeficientes de partición o Log P	136
5.2.4.	Evaluación de unión a proteínas y estabilidad en suero fetal bovino	136

5.2.5.	Estudio en células de melanoma murino.....	138
5.2.6.	Evaluación <i>in vivo</i> de perfiles de biodistribución en modelo murino.....	145
5.2.7.	Evaluación <i>in vivo</i> en modelo murino: imágenes centellográficas y micro SPECT/CT.....	153
5.2.8.	Evaluación <i>in vivo</i> en modelo murino mediante trazador fluorescente (ICG- α -MSH)	158
5.3.	Discusión.....	159
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	173
7.	ABREVIATURAS.....	177
7.1.1.	Química Orgánica.....	178
8.	AGRADECIMIENTOS	180
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	181

Resumen

El melanoma cutáneo es un tipo de cáncer de piel muy agresivo, altamente metastásico, con elevada mortalidad. La sobrevida se encuentra relacionada a un diagnóstico temprano. El diagnóstico temprano y preciso del melanoma es determinante en la selección del tratamiento óptimo y en la sobrevida del paciente.

En este trabajo se evaluó, como agentes de diagnóstico específicos para melanoma, el desempeño *in vitro* e *in vivo* de cuatro nuevos péptidos análogos de la hormona alfa melanocito estimulante (α -MSH), ciclados mediante dos estrategias diferentes (enlace lactama y átomo metálico), marcados con ^{99m}Tc .

Para ello, sobre modificaciones de los péptidos análogos de α -MSH, preparados principalmente a través de síntesis en fase sólida, se estudiaron nuevas estrategias de marcación con ^{99m}Tc , utilizando tres ligandos bifuncionales diferentes: uno derivado del sistema coordinante hidracino y otros dos derivados de un sistema tetramino.

Los cuatro radiopéptidos se evaluaron fisicoquímica y biológicamente mostrando estabilidad y un buen perfil para la de detección *in vivo* de células que sobreexpresan el receptor de melanocortina MC1R.

Los estudios *in vivo* de biodistribución y adquisición de imágenes centellográficas y micro-SPECT-CT en ratones portadores de melanoma mostraron concordancia con los perfiles fisicoquímicos y el comportamiento *in vitro*. Tres de los radiopéptidos presentan una buena captación tumoral, buena eliminación renal y metabolismo hepatobiliar.

En comparación con otros radiopéptidos descritos en la bibliografía los desarrollados en este trabajo de Tesis Doctoral comparten características fundamentales como para ser potencialmente usados como agentes de diagnóstico para melanoma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Con el término *cáncer* se denomina a un grupo de enfermedades que presentan como característica común células con un crecimiento y proliferación celular descontrolados. En las células cancerosas los procesos de regulación de la proliferación se encuentran alterados, no requieren señales externas inductoras del crecimiento celular y pueden ignorar las señales de autorregulación, como la de la muerte programada, o apoptosis. Las células cancerosas a diferencia de las células normales no maduran especializándose en diferentes tipos celulares con funciones específicas, de esta forma, las células cancerosas continúan dividiéndose sin detenerse. Otra característica de las células cancerosas que permite su crecimiento y proliferación descontrolada, es que son capaces de evadir el sistema inmunitario, el cual protege al cuerpo contra infecciones y enfermedades. Así, aunque normalmente el sistema elimina del cuerpo las células dañadas o anormales, algunas células cancerosas son capaces de "escondarse" ^{1,2}.

Las células normales crecen, se dividen para formar nuevas células y cuando envejecen o se dañan, mueren y son reemplazadas por nuevas células. Sin embargo, en el cáncer las células viejas o dañadas no mueren y continúan dividiéndose para formar masas llamadas tumores. La mayoría de los tumores formados por células malignas son tumores sólidos, formados por masas de tejido. Pero también existen tumores no sólidos, como por ejemplo el cáncer de sangre o leucemia ¹.

Las células cancerosas pueden influir en su microambiente, es decir en las células normales y vasos sanguíneos que las rodean. De esta forma, pueden inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso llamado angiogénesis, para que aumente el suministro de nutrientes y oxígeno necesarios para el crecimiento tumoral ¹.

Se llama **tumores benignos** a aquellos que se encuentran localizados, no se extienden a tejidos cercanos y son operables. Al extirparse un tumor benigno, generalmente no vuelve a crecer, pero los tumores malignos sí. Los **tumores malignos**, se caracterizan por poder invadir tejido circundante y diseminarse a otros órganos. Las células cancerosas de tumores malignos en crecimiento, pueden desprenderse y viajar a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático para formar tumores secundarios, llamados metástasis. Los tumores metastásicos a pesar de encontrarse en otros órganos o tejidos tienen el mismo tipo de célula cancerosa que el cáncer original o primario ^{1,2}.

La formación de un tumor parece ser un proceso progresivo, en el cual las células normales pueden convertirse en células cancerosas. Cada tipo de crecimiento anormal en un tejido puede representar un paso en el proceso del desarrollo de un tumor y debe ser vigilado. En la **hiperplasia** las células se dividen más rápido de lo normal y las células adicionales se acumulan o proliferan. Sin embargo, las células y la forma como se disponen en el tejido son normales. Otra desviación de los tejidos normales es la **metaplasia**, donde una capa de células normales es desplazada por otro tipo de células que no se encuentran normalmente en ese tejido.

Estas células invasoras, aunque se presentan en un lugar incorrecto, se observan completamente normales en el microscopio. La metaplasia es más frecuente en zonas de transición entre tejidos, por ejemplo, en la unión del cérvix con el útero, o en la unión del esófago con el estómago. En este último caso, una metaplasia es el síndrome de Barret en el esófago, en el cual las células escamosas del epitelio son reemplazadas por células secretorias que normalmente se encuentran en el estómago. Esta metaplasia es considerada un paso previo en el desarrollo de adenocarcinoma de esófago. La **displasia** es un estado más grave en el desarrollo anormal de los tejidos. En la displasia, al igual que en la hiperplasia, también hay una acumulación de células adicionales, pero las células se ven anormales en el microscopio (tamaño del núcleo y forma) y hay cambios en la organización del tejido. La displasia es considerada un estado transicional entre el crecimiento completamente normal y el maligno. Un estado aún más grave es un **carcinoma *in situ***. En un carcinoma *in situ* las células anormales no invaden otros tejidos ^{1,2}.

1.1.1. El cáncer como enfermedad genética

El cáncer es una enfermedad genética en esencia, causada por cambios en los genes que regulan la división y crecimiento celular. Estos cambios genéticos pueden ser heredados de los progenitores o pueden ser causados por factores dependientes del entorno y los hábitos de vida, por ejemplo: rayos ultravioletas del sol, humo de tabaco, radiación, virus, productos químicos, dieta y actividad física. El cáncer es una enfermedad genética, sin embargo, la mayoría de los cánceres son causados por el ambiente y no por los caracteres biológicos de las personas. En relación a esto algunos estudios han mostrado que las poblaciones migratorias asumen la incidencia de cáncer de su país huésped ^{1,3}.

El cáncer es el resultado de varias mutaciones en el ADN. Algunos tipos de cáncer se asocian en forma constante a un grupo determinado de mutaciones genéticas. Si una o más de las mutaciones requeridas son heredadas, se requieren menos mutaciones adicionales para producir el cáncer. La mayoría de los tumores malignos surge de mutaciones somáticas que se acumulan durante nuestra vida, sea por mutación espontánea o en respuesta a mutágenos presentes en el medio ambiente ³.

El cáncer comienza con una célula que presenta una mutación que le confiere una velocidad de división anormalmente rápida. Así, esta célula prolifera y da lugar a un clon de células, cada una con la misma mutación. Dado que se dividen más rápido que las células normales, llegan a superar el desarrollo de las células normales. En los clones pueden presentarse nuevas mutaciones que aumenten aún más la velocidad de proliferación, volviendo dominantes a estas células clones con dos mutaciones. En este proceso, llamado **evolución clonal**, las células cancerosas adquieren cada vez más propiedades proliferativas. Las mutaciones genéticas que permitan la posibilidad de que se generen más mutaciones, aceleran el desarrollo y progresión del cáncer ³.

Las mutaciones asociadas al desarrollo del cáncer tienden a afectar tres genes: **genes reparadores del ADN**, **oncogenes** y **genes supresores de tumores**. La reparación del ADN elimina varias mutaciones, por lo tanto, las células con mutaciones en estos genes tienden a presentar mutaciones adicionales en otros genes, entre ellos los que regulan la división celular. Los oncogenes estimulan la división celular, por lo que mutaciones que lo hiperactiven favorecen la formación de tumores. Los genes supresores de tumores en cambio, inhiben la división tumoral. De esta forma las células con mutaciones que inactiven los genes supresores de tumores, pueden dividirse sin control ^{1,3}.

1.1.2. Estadísticas de cáncer

Según la Organización Mundial para la Salud (OMS), el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial y en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes (un 13 % del total de muertes). En el 2012 fueron estimados 14.1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo. Los cánceres con mayor índice de mortalidad son: de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. El 70 % de todas las muertes por cáncer registradas en el 2012 se produjeron en: África, Asia, América Central y América Latina. Se estima que la incidencia de cáncer aumente en un 70

% en las próximas dos décadas. En América Latina y el Caribe 1.1 millones de casos de cáncer son diagnosticados anualmente ^{4,5}. En el 2012, Uruguay lidera el grupo de países con mayor índice de mortalidad por cáncer. La mortalidad por cáncer en Uruguay es en los hombres mayormente por cáncer de pulmón, próstata y colorrectal. Mientras que en las mujeres es: cáncer de mama, colorrectal y pulmón ^{6,7}. Según datos de International Agency for Research on Cancer (IARC) en 2012 en Uruguay, se detectaban 13,4 nuevos casos de cáncer cada 1000 habitantes, las muertes eran de 8,7 cada 1000 habitantes y la prevalencia estimada en 5 años eran 30,8 casos por 1000 habitantes adultos ⁸.

1.2. La Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo. Desempeña múltiples funciones como la protección de los órganos internos de lesiones, la termorregulación, la protección de los rayos ultravioletas, la producción de vitamina D, la impermeabilización, la prevención de pérdida de agua y la detección de estímulos sensoriales ^{9,10}. La piel tiene tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (tejido subcutáneo) (Figura 1.1).

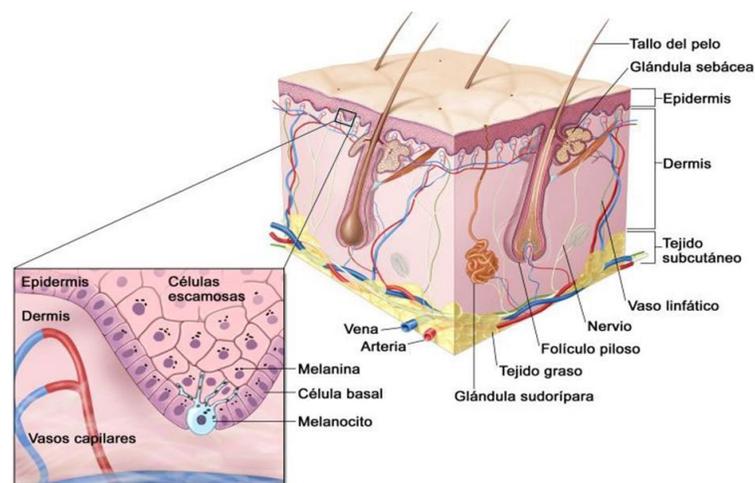


Figura 1.1: Estructura de la piel. El cuadro ampliado muestra un esquema de la unidad epidérmica de melanina. (Fuente: www.cancer.gov)

- **Epidermis:** es la capa superior de la piel, es muy delgada, relativamente avascular y es un epitelio plano estratificado, queratinizado, separado de la dermis por la membrana basal. Dado que es avascular, depende de la dermis para su nutrición ^{10,11}.

La principal función de la epidermis es la de actuar como barrera física para heridas mecánicas, térmicas y frente a agentes externos como: virus, bacterias, radiación ultravioleta, radiación ionizante, ondas electromagnéticas ^{10,11}.

La epidermis se constituye por cuatro capas o estearatos (desde lo más profundo a lo más superficial): basal, espinoso, granuloso y córneo ^{10,11}.

Los tipos de células de la epidermis son:

- Queratinocitos (90 %): son células cilíndricas, basófilas, asientan sobre la membrana basal. Los queratinocitos se renuevan constantemente por mitosis y se desplazan desde el estearato basal hacia la superficie, en su tránsito acumulan queratina en su citoplasma, y a medida que se aproximan a la superficie mueren y se desprenden de la piel. Este desplazamiento de los queratinocitos da origen a la estratificación de la epidermis en los estearatos basal, espinoso, granuloso y córneo ¹⁰⁻¹².
- Melanocitos (5 %): son células dendríticas, ubicadas en el estearato basal. Son las células responsables de la pigmentación de la piel mediante la producción del pigmento marrón melanina. Estas células son las que pueden convertirse en melanoma (neoplasia que se origina en los melanocitos, ver sección 1.4.) ^{10,11}.
- Células de Langherans (3-5 %): son células dendríticas que encuentran en el estearato espinoso. Son células presentadoras de antígenos, por lo que juegan un rol fundamental en la inmunidad de la piel ^{10,11}.
- Células de Merkel (0,1 %): son células no dendríticas que se encuentran en el estearato basal y se relacionan con las terminaciones nerviosas sensitivas ^{10,11}.

La epidermis se encuentra separada de las demás capas por la membrana basal. En los estadios iniciales el melanoma se encuentra confinado en la epidermis, pero en estadios más avanzados puede atravesar la membrana basal hacia capas más profundas de la piel, llegando hasta los capilares ^{10,11,13}.

- **Dermis:** es la responsable de darle a la piel su firmeza y elasticidad. En esta capa se encuentran folículos pilosos, glándulas sudoríparas, vasos sanguíneos y nervios. Está formada por células del tejido conjuntivo ^{10,11}.
- **Hipodermis:** es la capa más profunda de la piel. Con la dermis forma una red de células adiposas y colágeno. Es responsable de la termorregulación ^{10,11}.

1.2.1. Pigmentación de la piel

Los melanocitos ubicados en la capa basal de la epidermis producen la melanina, sustancia responsable de la pigmentación de los tejidos y que posee propiedades antioxidantes para neutralizar los radicales libres producidos en las células de la epidermis por la radiación ultravioleta (UV). Existen dos tipos de melaninas: las eumelaninas de color pardo-negruzcas y las feomelaninas de color pardo-rojizas. Las eumelaninas son más efectivas que las feomelaninas en términos de fotoprotección, dado que las feomelaninas son fotosensibles sufriendo degradación oxidativa. La relación de eumelaninas/feomelaninas es mayor en las pieles tipo V y VI, que en las pieles tipo I y II. La relación de eumelaninas/feomelaninas, determina el fenotipo, pero también propiedades de fotoprotección y citotoxicidad ^{14,15}.

La síntesis, almacenamiento y transporte de la melanina se produce dentro de unos organelos citoplasmáticos llamados melanosomas. La melanina es sintetizada a partir del aminoácido tirosina. Los melanosomas son una variante de lisosomas, en los cuales el sustrato tirosina es oxidado a DOPA, y posteriormente a DOPAquinona. En presencia de cisteína la DOPAquinona, por adición, oxidación y polimerización, genera los pigmentos feomelaninas. En ausencia de los tioles de las cisteínas se producen los pigmentos eumalinas por ciclación de la DOPAquinona y posteriores oxidaciones y polimerizaciones. Las melaninas son transportadas dentro de los melanosomas por unas proyecciones citoplasmáticas (dendritas) de los melanocitos hacia los queratinocitos de la epidermis ¹⁶⁻¹⁸.

1.2.2. Regulación de los melanocitos por la radiación ultravioleta

Los melanocitos en la piel de un adulto no presentan un alto índice de recambio celular. Sin embargo, ante la exposición a radiación UV, se requieren cantidades adicionales de melanina y la división celular de los melanocitos aumenta. Cuando la exposición a la radiación UV cesa, el número de melanocitos y la cantidad de melanina retorna a sus valores normales. Los cambios en la respuesta proliferativa, requieren de un adecuado balance entre las señales positivas y negativas regulatorias de la división celular. Las alteraciones en estas señales resultan en una división celular descontrolada ¹⁴.

La radiación UV también estimula rápidamente la acumulación de la proteína p53 en los melanocitos. La p53 es producida por las células en situación de estrés, e induce la suspensión en las fases G1/G2 del ciclo celular para reparación del ADN y apoptosis celular en los casos en los que ADN es irreparable. Se han detectado mutaciones en el gen de p53 en varios tumores, indicando que la proteína p53 es un importante agente supresor de tumores ^{14,19-21}.

Otro agente supresor de tumores que es acumulado en los melanocitos con la exposición a radiación UV es la proteína quinasa p16^{INK4a} dependiente de ciclina (cdk4) que se codifica por el gen CDKN2A. La p16^{INK4a} a diferencia de la p53 se acumula en los melanocitos luego de 24 - 48 horas después de la irradiación. Esta proteína retrasa las fases S y G2 del ciclo celular. Las mutaciones que generan la pérdida de la p16^{INK4a} se correlacionan con un incremento en el daño del ADN luego de la exposición a radiación UV, mayor proliferación de células tumorales y peor pronóstico en pacientes con melanoma ^{14,21-23}.

La radiación UV estimula la síntesis y liberación de la hormona α -melanocito estimulante (α -MSH), la cual por medio del receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R) en los melanocitos activa la cascada de cAMP. La cascada de cAMP activa una serie de eventos que culminan con el incremento en la síntesis de melanina ¹⁴.

Los retrasos en el ciclo celular de los melanocitos irradiados por radiación UV son superados cuando la α -MSH estimula la producción de la sustancia fotoprotectora melanina. Sin embargo, la α -MSH no causa cambios significativos en la expresión de los genes reguladores del ciclo celular de los melanocitos ¹⁴.

1.2.3. Receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R)

El término melanocortina refiere a una familia de péptidos hormonales derivados de un precursor común, el péptido precursor proopiomelanocortina (POMC). El MCR1 pertenece a una familia de receptores de melanocortina (MCR) que consiste en cinco subtipos (MC1, MC2, MC3, MC4 y MC5) los que han sido clonados y caracterizado. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores del tipo Rodopsina (7tm_1), que se caracterizan por ser receptores de membrana constituidos por siete dominios transmembrana que están acoplados a proteínas G (GPCR). Los cinco tipos de MCR median sus efectos gracias a la generación de cAMP a través de la estimulación de la adenilato ciclasa con la subunidad $G\alpha$ de la proteína G. En los melanocitos la unión del ligando α -MSH al receptor MC1R, resulta en un aumento intracelular de cAMP el cual estimula la expresión del gen para tirosinasa, enzima involucrada en la síntesis de melanina a partir de tirosina ^{15,24–28}.

La diferencia entre los subtipos de receptores radica en la distribución de los mismos en los diferentes tejidos, la afinidad por diferentes ligandos y roles fisiológicos. Los MCR regulan importantes funciones biológicas como la ingesta de alimentos, la homeostasis, la producción de cortisol, el comportamiento sexual y la secreción de glándulas exocrinas. En la Tabla 1.1, se pueden apreciar los diferentes subtipos MCR, su ubicación y afinidad por ligandos ^{15,27,28}.

Tabla 1.1: Diferentes subtipos de receptores de melanocortina: distribución y ligandos

Subtipo de receptor MCR	Distribución	Ligandos
MC1R	Melanocitos, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células presentadoras de antígenos.	α -MSH, ACTH > β -MSH > γ -MSH
MC2R	Corteza adrenal, adipocitos.	ACTH
MC3R	Cerebro, intestino, placenta.	α -MSH, β -MSH, γ -MSH, ACTH
MC4R	Cerebro.	α -MSH, β -MSH, ACTH
MC5R	Tejidos periféricos, glándulas sebáceas.	α -MSH, β -MSH, ACTH

MCR: indica Receptor de Melanocortina; MSH: indica Hormona Estimulante de Melanocitos; ACTH: indica Hormona Adrenocorticotropina.

El MC1R se encuentra en varios tipos celulares: melanocitos, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, células presentadoras de antígenos. Sin embargo, la mayor densidad se encuentra en los melanocitos. En los melanocitos la función de MC1R, mediada por α -MSH es la melanogénesis. En los otros tipos celulares el receptor se encuentra vinculado a efectos anti-inflamatorios o inmunosupresores de α -MSH ^{15,27-30}.

Estudios *in vitro* de actividad por ensayo de competitividad y medición de concentración intracelular de cAMP, mostraron que el MC1R humano presenta la siguiente orden de potencias de afinidad por ligandos: α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH. En cambio, estudios en ratones mostraron mayor afinidad por α -MSH que por ACTH. En ratones, el MCR1 es expresado en mayor densidad, en comparación con humanos. Sin embargo, en humanos la producción de cAMP es más prolongada y MC1R se ve menos afectado por desensibilización ^{15,27,28}.

En los tumores de melanoma, el MC1R se ha encontrado sobreexpresado en las células de melanoma murino y humano, en comparación con células y tejidos normales. Se ha descrito que más de un 80 % de tumores humanos de melanoma, obtenidos de pacientes metastásicos presentan receptores MC1R para α -MSH. Los MC1R en células humanas de melanoma son aproximadamente: 1000 – 6000, en células murinas de melanoma el número de receptores es aproximadamente 5000 – 8000 ^{25,31-33}.

1.2.4. Estructura del MC1R

El gen humano para MC1R fue clonado en 1992 y ha sido mapeado al cromosoma 16q14.3 ^{34,35}. El MCR1 pertenece a la familia de proteínas transmembranas receptoras acopladas a proteínas G (GPCR), siendo difícil su cristalización para el estudio de la estructura secundaria y terciaria. Se cuenta con información de la estructura secundaria y terciaria de algunas proteínas transmembrana de la familia de las rodopsinas que han sido cristalizadas u obtenidas por microscopía electrónica. Estas estructuras han sido usadas como molde molecular para generar modelos computacionales del MC1R ³⁶⁻⁴¹.

El MC1R tiene una secuencia de 317 aminoácidos en el humano y 315 en el ratón con características propias de la familia de las GPCR (Figura 1.2): dominio N-terminal como

fragmento extracelular, siete fragmentos transmembrana (TM) y el dominio C-terminal como fragmento intracelular ^{27,38}.

Dominio N-terminal: constituido por 35 aminoácidos, el extremo N-terminal del MC1R funciona como una señal de anclaje no escindible. Comparte con los otros MCR la secuencia consenso en el extremo N-terminal para glicosilación. La mutación del aminoácido Ser6 por Ala ha sido descrita como causa de pérdida de afinidad por agonistas radiomarcados ^{42,43}. En todos los subtipos de MCR se observa un residuo de Cys en TM1 cerca del sitio de unión del dominio N-terminal. Cuando este residuo de Cys es remplazado por Gly o Ala, en una mutación, se observa pérdida de la actividad del receptor. Una posible explicación es un enlace disulfuro intramolecular con otra Cys en el tercer bucle extracelular o un enlace intramolecular que contribuya a la dimerización del receptor ^{38,44}.

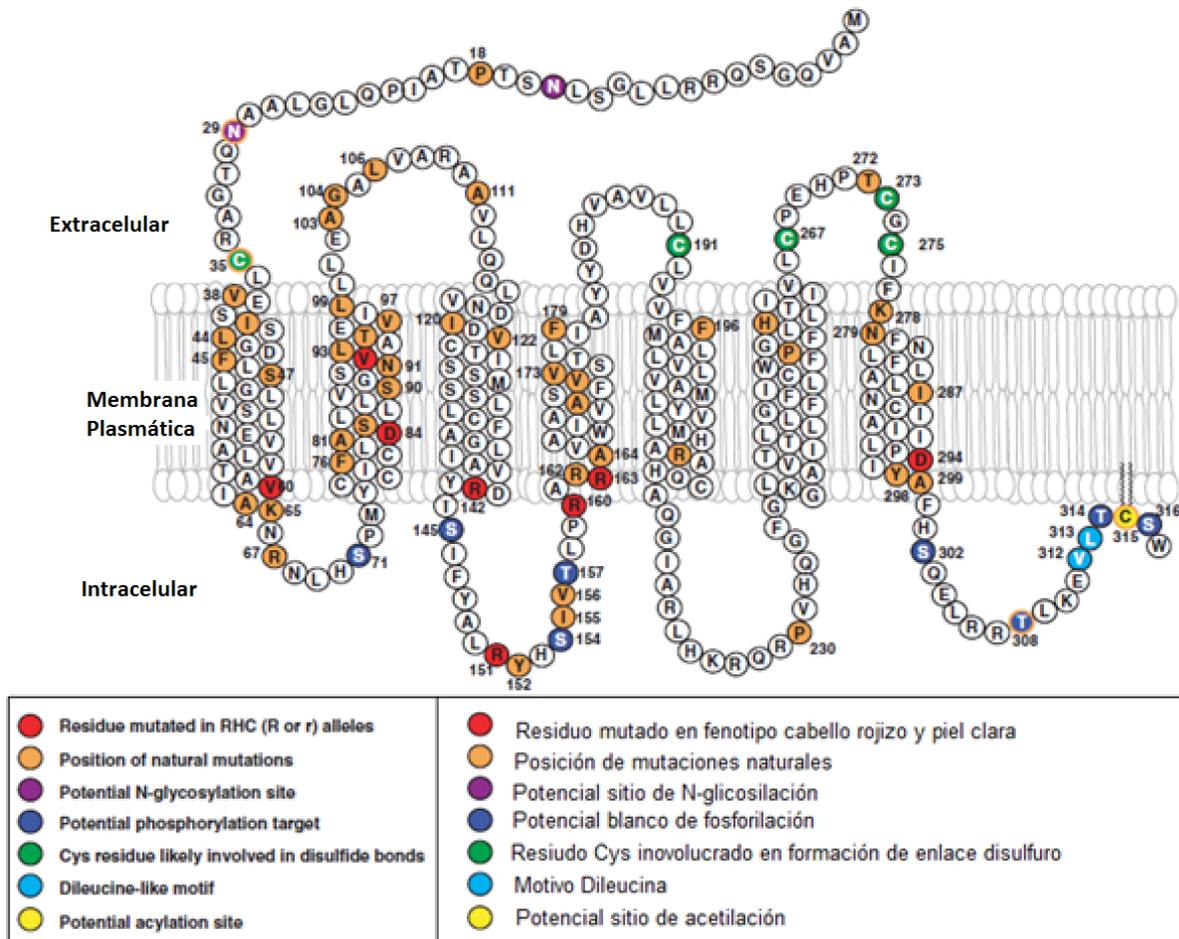


Figura 1.2: Estructura del MC1R. Adaptado de García Borrón, 2005 ³⁸.

Bucles extracelulares: una de las características de los MCR diferentes a las demás GPCR es que presentan bucles más cortos y principalmente el segundo bucle. El tercer bucle se encuentra ampliamente conservado en las GPCR, siendo rico en Pro y Cys. El tercer bucle podría estar implicado en el reconocimiento de ligandos agonistas, dado que las mutaciones Glu269 y Thr272 por Ala en este bucle disminuyen la afinidad de ligandos agonistas ⁴⁵. Sin embargo, se desconoce si mutaciones Glu269 y Thr272 tienen contacto directo con los ligandos o si la pérdida de afinidad se debe a cambios conformacionales en la disposición espacial del TM6 que alteren la unión de ligandos. Los ligandos se unen a espacios conformacionales con carga negativa que involucran varios fragmentos de TM, incluidos el TM6 ³⁸. Los enlaces disulfuro son muy importantes en la estructura conformacional de los MCR. Así, mutaciones en Cys267 y Cys275 por Gly o Ala fueron relacionados a pérdida de actividad ⁴⁶.

Bucles intracelulares: son la interface para la unión de proteínas G heterotriméricas y poseen sitios de fosforilación implicados en la regulación de la señalización e internalización. El segundo bucle intracelular es importante para las funciones de MCR1, mutaciones en este bucle en humanos se asocian a pérdida de función total o parcial. Otro punto crítico para la funcionalidad del MCR1 es el tripéptido ¹⁴¹DRY¹⁴³, característico de esta clase de receptores que se encuentra en la interface entre TM3 y el segundo bucle intracelular. El bucle tres, sin embargo, se encuentra poco conservado en los MCR ³⁸.

Dominios transmembrana (TM): en estos se encuentra el sitio de unión de agonistas endógenos, este sitio es llamado sitio ortostático. La familia de las MCR comparte muchos ligandos endógenos, por lo que la secuencia de aminoácidos del sitio de unión ortostático se encuentra conservada en la familia MCR para la unión de los ligandos endógenos melanocortinas. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los cinco subtipos de receptores MCR demuestra una elevada homología y el estudio de mutaciones en los residuos conservados ha permitido a los investigadores detectar los aminoácidos constituyentes del sitio ortostático implicados a la unión de los agonistas endógenos. Para MCR1, una región altamente cargada conteniendo Glu94 (TM2), Asp117 y Asp121 (TM3) interaccionan con el residuo de Arg del core farmacóforo His-Phe-Arg-Trp (HFRW) de los agonistas endógenos MSH. Los residuos aromáticos localizados en el TM6, Trp254, Phe257 e His260, también interaccionan con los residuos aromáticos del farmacóforo ^{27,38,47}.

Dominio C-terminal: extremo intracelular corto, con aproximadamente 19 aminoácidos, de los cuales seis son invariantes en los MCR. Este dominio está implicado en: (i) interacción de complejo ligando-receptor con las proteínas G, (ii) correcta disposición del receptor en la membrana plasmática mediante acetilación de residuos de Cys e integración de la cadena acetilada en la bicapa lipídica, (iii) generación de señales intracelulares, (iv) desensibilización e internalización del receptor (mediante fosforilación de residuos Ser y Thr). Mutaciones con supresión de los últimos cinco aminoácidos llevan a la pérdida total de la funcionalidad de MC1R^{38,44}.

Mientras que los residuos aminoacídicos que constituyen el sitio ortostático están ampliamente conservados en la familia MCR, los sitios alostéricos no. A estos sitios alostéricos se unen antagonistas endógenos y ligandos exógenos con diferentes afinidades para los subtipos de MCR. Evidencia creciente demuestra que los sitios de unión alostéricos en lo MCR se encuentran en el dominio extracelular a diferencia de los sitios ortostáticos que se encuentran en el dominio intracelular. La proteína relacionada con agouti (AGRP) es un antagonista de los MC3R y MC4R que se une a los sitios ortostáticos y alostéricos y la proteína señalizadora de agouti (ASIP) es un antagonista selectivo de MC1R, MC4R^{27,48}.

1.2.5. Hormona α -melanocito estimulante (α -MSH)

Los péptidos melanocortinas (ACTH, α -, β - y γ -MSH), así como los péptidos bioactivos β -endorfinas y la hormona β -lipotropina (β -LPH), son todos productos de escisión del péptido precursor POMC producido por la glándula pituitaria, hipotálamo, otras regiones del cerebro y tejidos periféricos como el tracto gastrointestinal (Figura 1.3)^{15,49,50}.

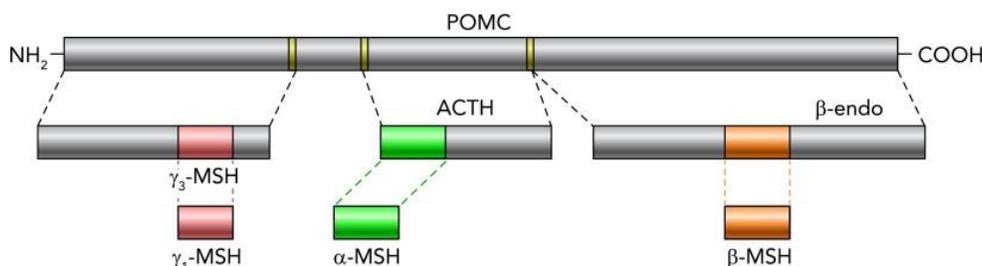


Figura 1.3: Representación esquemática de POMC. Adaptado de Silva, 2014⁴⁹

La hormona α -melanocito estimulante (α -MSH) es un tridecapéptido lineal: Ac-Ser-Tyr-Ser- Met⁴-Glu⁵-**His-Phe⁷-Arg-Trp**-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂. El cual al igual que otros péptidos endógenos presenta una semivida corta por degradación proteolítica. La secuencia His-Phe-Arg-Trp se encuentra conservada en varias especies y es necesaria para el reconocimiento del MC1R y consecuente actividad biológica. Estudios de estructura-actividad han demostrado que el reemplazo de los residuos Met⁴ y Phe⁷ por Nle y D-Phe, respectivamente, generan el potente análogo sintético [Nle⁴,DPhr⁷]- α -MSH, también llamado NDP-MSH. NDP-MSH presenta una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 0.21 nM, y es enzimáticamente estable *in vivo* ^{47,51}.

1.3. Cáncer de piel

El cáncer de piel es uno de los cánceres más comunes, especialmente en las personas de piel blanca, con más de 1 millón de nuevos casos en el año. Los cánceres de piel se nombran según el tipo de célula en el cual se originan.

Los tres tipos de cáncer de piel más común son:

- Carcinoma de células basales (CCB). Siendo las células basales los queratinocitos ubicados en el estearato basal de la epidermis.
- Carcinoma de células escamosas (CCE). Las células escamosas son los queratinocitos que constituyen la capa más externa de la epidermis, los cuales son células planas que se desprenden al formarse nuevas células.
- Melanoma. Cáncer de las células melanocitos.

CCB y CCE en conjunto, se los denomina cánceres de piel no melanoma. Los cánceres de piel no melanoma tienen una alta prevalencia e incidencia, sin embargo, no son agresivos y tienen bajo índice de mortalidad. El melanoma es el cáncer de piel más agresivo ^{52,53}.

El CCB es el más común de los dos tipos no melanoma, representando cerca de tres cuartos de los cánceres de piel no melanoma. Generalmente surge en personas de edad avanzada y en zonas expuestas al sol, como cabeza y cuello. Este tipo de cáncer tiende a crecer lentamente, sin llegar a metástasis. Pero si no se trata puede extenderse a áreas cercanas como hueso. La

reincidencia de este cáncer es elevada, principalmente si no se extrae completamente. El CCE se genera en las zonas corporales más expuestas al sol, pero también puede surgir en cicatrices (queratoacantomas) y en la piel del área genital ^{52,53}.

Otros tipos de cánceres de piel no melanoma menos frecuentes que CCB y CCE son:

- Carcinoma de células de Merkel
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoma cutáneo
- Tumores de los anexos de la piel (tumores que se originan en los folículos pilosos en las glándulas de la piel)
- Otros tipos de sarcomas

En conjunto, estos tipos representan menos de 1 % de todos los casos de cáncer de piel ⁵².

1.4. Melanoma

El melanoma es una neoplasia que se origina en los melanocitos. Los melanocitos derivan de las células embrionarias de la cresta neural y durante la embriogénesis migran y se diferencian en la epidermis. Los melanocitos también se encuentran en otros tejidos como meninges, mucosas, oídos y ojos (úvea). De esta forma, existen melanomas: cutáneos (lo más comunes) originados en los melanocitos de la epidermis; de las mucosas, producidos en los melanocitos ubicados en las membranas mucosas; uveal originados en los melanocitos residentes en el estroma ocular ^{18,54}.

El melanoma cutáneo representa solamente un 5 % del cáncer de piel, sin embargo, está asociado a un 75 % de la mortalidad por cáncer de piel ⁵⁵. Si es detectado en estadios tempranos, hay una elevada probabilidad de cura por escisión quirúrgica. Sin embargo, el melanoma es rápidamente metastásico, siendo la sobrevida menor en estadios avanzados dada la actual falta de tratamientos para melanoma avanzado. De esta forma, el diagnóstico temprano del melanoma es un factor determinante en la sobrevida del paciente ⁵³⁻⁵⁵.

1.4.1. Epidemiología

En las últimas tres décadas, la incidencia de melanoma maligno se ha cuadruplicado. Aunque este aumento en la incidencia se debe en parte a un aumento en la detección por programas de salud, existe evidencia de un aumento real en la incidencia. La mortalidad también ha aumentado, siendo peor en los hombres, en los cuales la detección de melanoma se asocia a estadios más avanzados ^{56,57}.

Según la OMS 132000 nuevos casos de melanoma son detectados en todo el mundo ⁵⁸. La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar y con población caucásica: Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Europa y Sudáfrica. Mientras que los países con menor incidencia son los de Asia ^{55,57,59}. En las Figuras 1.4 y 1.5 se aprecia la distribución de la incidencia y mortalidad en el mundo, según datos de GLOBOCAN 2012 - IARC.

Australia es el país con mayor incidencia y mortalidad de melanoma en el mundo. Cada 6 horas una persona muere por melanoma. En el 2015, en Australia se estimaron 49 nuevos casos/100000 personas año y 5.9 muertes/100000 personas año ^{60,61}. En Estados Unidos, según datos de Surveillance Epidemiology and End Results Program (SEER), para el período 2008-2012 se estimaron: 21.6 nuevos casos de melanoma/100000 personas año y 2.7 muertes/100000 personas año. Para el 2016, en Estados Unidos se estiman 76380 nuevos casos de melanoma y 10130 muertes por melanoma ^{62,63}.

Uruguay se encuentra dentro de los países de América del Sur con mayor incidencia y mortalidad de melanoma. En Uruguay, según datos de GLOBOCAN – IARC, en el 2012 la incidencia y mortalidad de melanoma para ambos sexos fue de 4.1 nuevos casos/100000 personas año y 0.9 muertes/100000 personas año. En mujeres: 3.8 nuevos casos/100000 personas año y la mortalidad de 0.7 muertes/100000 personas año. En hombres: 4.6 nuevos casos/100000 personas año y la mortalidad de 1.3 muertes/100000 personas año ⁸.

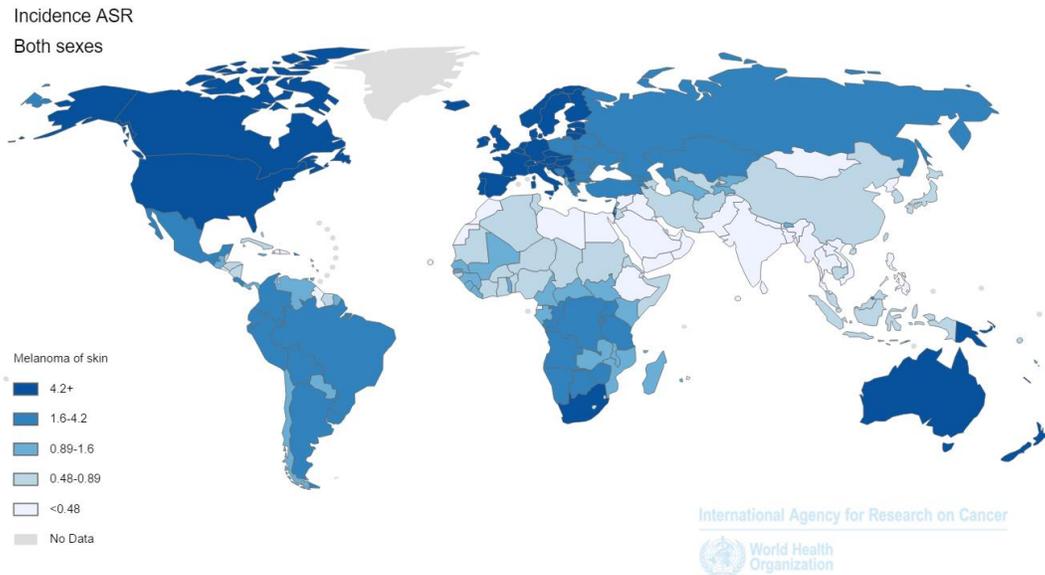


Figura 1.4: Incidencia de melanoma en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC)

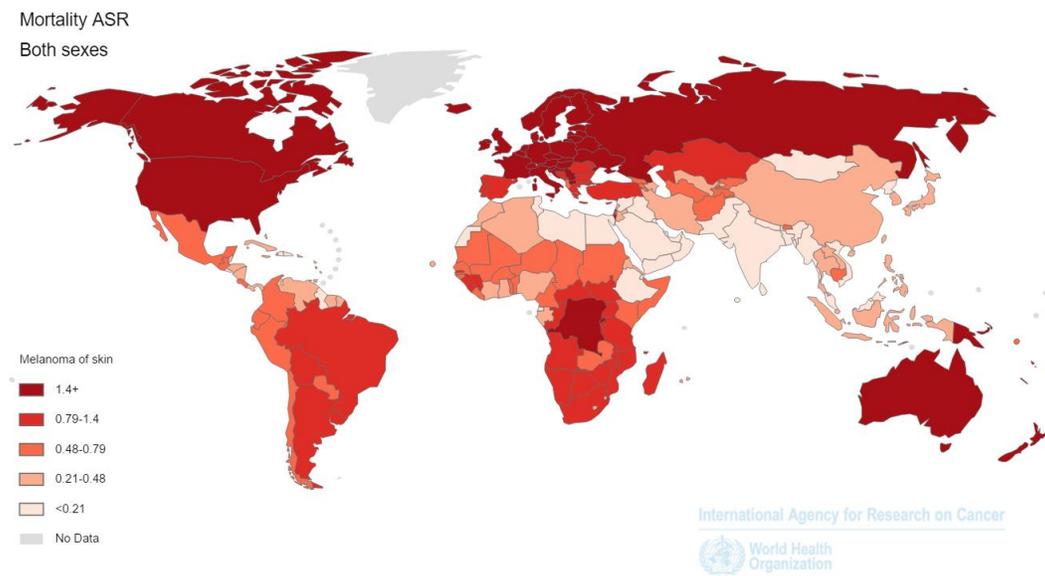


Figura 1.5: Mortalidad de melanoma en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC)

El melanoma tiene una media de diagnóstico en los 57 años de edad. Sin embargo, a diferencia de otros tipos de cáncer sólidos, el melanoma presenta una elevada incidencia en la segunda y tercera década de edad. El melanoma es el cáncer más común en los adultos jóvenes de 25-29 años y el segundo tipo de cáncer en personas jóvenes de 15-29 años de edad^{57,61,64}.

En relación al sexo, el melanoma tiene una ligera predominancia en los hombres, con una relación 1.3/1 para hombres/mujeres. En los hombres el melanoma tiende a generarse con mayor frecuencia en el tronco, mientras que en las mujeres es más frecuente en las piernas ⁵⁵.

1.4.2. Factores de riesgo

Los factores de riesgo son todos aquellos que aumentan la probabilidad que se produzca una enfermedad, como por ejemplo el cáncer. Los factores de riesgo pueden ser prevenibles o no, por ejemplo, la exposición a luz UV es prevenible, pero la edad no lo es. Dentro de los factores de riesgo asociados con melanoma se incluyen ^{57,61,65,66}:

- Exposición a la radiación ultravioleta A y B, ambiental o artificial ej.: camas solares.
- Piel tipo I y II: individuos de piel blanca, cabello rubio o pelirrojo, ojos claros, con incapacidad de broncearse.
- Historial de quemaduras solares en la niñez: más de 5 con ampollas.
- Lunares (llamados nevus o nevo): lunares atípicos (displásicos), síndrome de nevus displásicos, nevus melanocíticos congénitos.
- Antecedentes familiares de melanoma.
- Antecedente personal de melanoma u otros cánceres de piel.
- Sistema inmune debilitado: personas VIH positivo, personas en tratamiento con inmunosupresores (ej.: trasplante de órganos, enfermedades autoinmunes).
- Edad avanzada.
- Sexo masculino.
- Xeroderma pigmentoso (XP): es una enfermedad hereditaria, que afecta la capacidad de las células de la piel de reparar el daño causado a su ADN.

El aumento de la incidencia del melanoma en las últimas tres décadas ha motivado el estudio de los factores de riesgo. La radiación UV tiene propiedades carcinogénicas demostradas, en relación a esto, la depleción de la capa de ozono es un factor importante, ya que causa mayor irradiación solar ^{57,67}.

Por otro lado, las tendencias culturales son también un factor importante. Vinculado a esto, el aumento de cáncer de piel especialmente en la población joven en países desarrollados se ha asociado al uso de la cama solar. Inicialmente las camas solares estaban clasificadas por la Food and Drug Administration (FDA) como clase I (riesgo bajo), pero en setiembre del 2014, la clasificación cambio a clase II (riesgo moderado). De acuerdo con un metanálisis realizado en 2006 por IARC, el uso de camas solares en personas menores a 35 años, aumenta 1.75 el riesgo relativo de tener melanoma ^{68,69}.

En cuanto a los factores genéticos, existen mutaciones de genes que son hereditarias y otras no hereditarias que son somáticas y se producen durante el desarrollo del tumor. Las mutaciones hereditarias en los genes supresores de tumores como CDKN2A (codifica la proteína p16) y CDK4 se asocian con una mayor probabilidad de desarrollar melanoma. Dentro de las mutaciones somáticas, una que ha creado interés en los últimos años como objetivo de terapia, es la mutación del oncogén BRAF, el cual estimula la proliferación celular. Un 40 a 60 % de los melanomas presentan mutación en este gen ⁷⁰⁻⁷². En cuanto a mutaciones del MC1R, algunas mutaciones de este receptor afectan el fenotipo de pigmentación (piel y cabello pelirrojo) y se podrían asociar a una mayor probabilidad de cáncer de piel (melanoma y no melanoma) ¹⁵.

1.4.3. Clasificación histopatológica del melanoma cutáneo

Existen principalmente cuatro subtipos de melanoma que han sido caracterizados:

- Melanoma de extensión superficial: constituye aproximadamente el 70 % de los melanomas y tiene un crecimiento radial en la epidermis. Los sitios más comunes son: en el tronco en los hombres y en las piernas en las mujeres ^{55,73}.
- Melanoma nodular: corresponde a un 15 – 30% de los casos. Se caracterizan por un crecimiento vertical, con poco crecimiento radial. Puede aparecer en cualquier sitio. Generalmente son de color marrón, rojo, gris o negro, pero pueden no tener color. La epidermis frecuentemente sufre ulceración ^{55,73}.
- Melanoma lentigo maligno: corresponde a 4 – 10 %, con mayor frecuencia en adultos mayores y en áreas de exposición crónica al sol (cara, cuello, espalda y extremidades superiores). Su

precursor es un lentigo maligno, que presenta un lento crecimiento, de forma irregular y con una mácula pigmentada. El melanoma lentigo maligno se determina cuando existe un cambio de pigmentación o un cambio en la superficie palpable ^{55,73}.

- Melanoma acral lentiginoso: representa un 2 al 8 % de los casos. Frecuente en asiáticos y afroamericanos. Se presenta en zonas desprovistas de pelo: palmas de manos, regiones subungueales y planta de los pies ^{55,73}.

Otros subtipos menos frecuentes de melanoma constituyen: melanoma de mucosas, melanoma desmoplástico y melanoma amelanótico. El melanoma de mucosas se localiza generalmente en mucosas de cavidad nasal y oral, mucosas vulvar y anorrectal. En el melanoma desmoplástico, los melanocitos malignos están rodeadas por tejido fibroso, pueden aparecer dentro de un lentigo maligno. Los melanomas amelanóticos, carecen de color, o son rosado claro, su diagnóstico es muy difícil ya que pueden confundirse con otras condiciones de la piel ^{55,73}.

1.4.4. Detección precoz

La detección precoz y consiguiente diagnóstico son limitantes en el pronóstico de la enfermedad. La detección inicial muchas veces surge del propio paciente que consulta a su médico tratante ante la sospecha. La señal más importante para la detección es algún lunar nuevo en la piel o uno existente que haya cambiado en su tamaño, forma o color. Otra señal importante es algún lunar que luzca distinto a los otros presentes en la piel. La regla ABCDE es un método para identificar las señales habituales de melanoma en estadios iniciales ⁷⁴ (Figura 1.6).

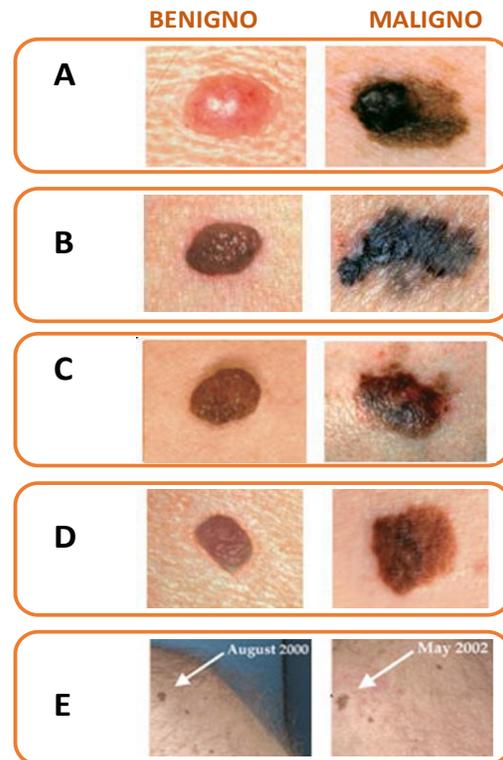


Figura 1.6: Criterios ABCDE de melanoma. Comparación entre lunar benigno y maligno.

Fuente: Skin Cancer Foundation ⁷⁴.

La regla ABCDE corresponde a:

- A de Asimetría: la mitad del lunar o marca de nacimiento no corresponde a la otra mitad.
- B de Borde: los bordes son irregulares, desiguales, dentados o poco definidos.
- C de Color: el color no es uniforme y pudiera incluir sombras color marrón o negras, o algunas veces con manchas rosadas, rojas, azules o blancas.
- D de Diámetro: el lunar mide más de 6 milímetros de ancho, aunque algunas veces los melanomas pueden medir menos.
- E de Evolución: el tamaño, la forma o el color del lunar cambian.

Otras señales de advertencia son la inflamación, sangrado y cambio de sensibilidad.

1.4.5. Diagnóstico, estadificación y pronóstico

El diagnóstico del melanoma se basa en el examen clínico del especialista (dermatólogo) para la identificación de la lesión, en la confirmación histopatológica y en la estadificación de la enfermedad. La estadificación del melanoma es un punto crítico en la selección del tratamiento ⁵⁷. Una vez confirmado el melanoma se aplican otros criterios de clasificación. La clasificación tumor-nódulos-metástasis (TNM) de la *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* ⁷⁵, por ejemplo, es un sistema de estadificación estándar que permite clasificar la progresión del cáncer. El sistema TNM considera el índice de Breslow (espesor del tumor en fase de crecimiento vertical), el índice de Clark (nivel de invasión en capas cutáneas), grado de afectación linfática, ulceración y la presencia de metástasis. Así, 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 en lugares distantes ^{57,75,76}.

En dermatología, una de las técnicas más utilizadas para observar áreas de la piel con mayor claridad e identificar alteraciones pigmentadas es la *dermatoscopia* (también llamada microscopia de epiluminiscencia [ELM] o microscopia de superficie). Es una técnica de diagnóstico por imagen no invasiva la cual contiene lentes de ampliación, una fuente de luz colocada cerca de la piel y

posibilidad de obtención de fotografías digitales. Una vez identificada la lesión el diagnóstico es confirmado mediante una biopsia y su estudio histopatológico ¹³.

De confirmarse el diagnóstico de melanoma cutáneo, se pueden realizar biopsias de los ganglios linfáticos adyacentes para determinar si el cáncer se ha propagado a ellos. La biopsia de ganglio linfático centinela se realiza para determinar si existe propagación del melanoma a los ganglios linfáticos adyacentes. Para la detección de ganglios linfáticos adyacentes se emplean técnicas centellográficas con radiotrazadores como marcados con ^{99m}Tc (ej. ^{99m}Tc nanocoloide), híbridos (radioactivos-fluorescentes, ^{99m}Tc nanocoloide-indocianina verde). Una vez removido el ganglio centinela son analizados por histopatología ^{55,77-81}.

Los estudios por imágenes se realizan para localizar una posible propagación del melanoma en los ganglios linfáticos o en otros órganos distales del cuerpo. También se emplean para realizar un seguimiento de la enfermedad o para evaluar una reincidencia. Los estudios de imágenes pueden ser: radiografía de tórax, tomografía computada (*computed tomography, CT*), resonancia magnética (*magnetic resonance imaging, MRI*) y tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography, PET*) ^{55,57}.

El factor determinante en el pronóstico de la enfermedad es el estadio al momento del diagnóstico. Con un diagnóstico temprano de melanoma la sobrevida es de 5 años en aproximadamente un 92 % de los casos. La sobrevida a 5 años decae a 63 % cuando la enfermedad llegó a los ganglios linfáticos y a un 17 % cuando existe metástasis en órganos distantes ^{62,63}. El predictor más importante de la sobrevida es el estatus tumoral de los ganglios linfáticos adyacentes al tumor, al detectarse metástasis en estos los factores pronóstico basados en el tumor primario pierden relevancia en la predicción de la recurrencia o sobrevida. La posibilidad de desarrollar metástasis es proporcionalmente directa a la capacidad metastatizante de las células del melanoma, la profundidad de la lesión, la presencia de ulceraciones y otras variables dependientes del tumor primario y el paciente ^{65,82-84}.

1.5. Imagenología molecular

La imagenología molecular es definida como la caracterización y medición de los procesos biológicos en los seres vivos a nivel celular y molecular, empleando técnicas de imágenes. La imagenología molecular investiga anormalidades moleculares que constituyen la base de la enfermedad, en lugar de evaluar por imágenes los efectos finales de estas alteraciones moleculares. Los principios de imagenología molecular son aplicados a medicina molecular ⁸⁵. Uno de los grandes campos de aplicación de la imagenología molecular es la oncología, brindando información necesaria para mejorar el diagnóstico precoz, estadificación y planeamiento de terapia ^{86,87}.

La imagenología molecular combina métodos de imagen no invasiva con herramientas de biología molecular y celular. Las técnicas de imagenología molecular PET (tomografía de emisión de positrones del inglés *Positron Emission Tomography*) y SPECT (tomografía por emisión de fotón simple del inglés *Single Photon Emission Computer Tomography*) son modalidades de imagen que utilizan moléculas marcadas radioactivamente que se distribuyen en el organismo luego de su administración. Estas técnicas varían en sus características y presentan diferente sensibilidad y resolución espacial ⁸⁸⁻⁹⁰.

En medicina es tan importante conocer la morfología, como la fisiología en condiciones normales y patológicas. Técnicas de imagen como la Tomografía Computarizada (CT del inglés *Computed Tomography*) y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*), a través de su alta resolución espacial sirven para identificar alteraciones morfológicas, mientras que el PET y el SPECT brindan información funcional. Es así que la imagen molecular tiende a la fusión de técnicas como CT y NMR, con PET y SPECT, combinando de esta forma la información anatómica con la funcional ⁸⁸⁻⁹⁰.

La gamma cámara es un dispositivo que permite detectar la radiación gamma y a partir de la misma generar una imagen sobre su distribución en el espacio. Es así que luego de la administración al paciente en estudio de un radionucleido emisor gamma puro (^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²³I y ¹²⁵I), una o varios detectores gamma rotan alrededor del paciente en estudio para obtener y reconstruir los datos obtenidos por la emisión de un fotón simple en forma de rayos 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 estudio en pequeños animales existen cámaras micro SPECT las cuales permiten obtener imágenes de mayor resolución y sensibilidad que las utilizadas en humanos ⁹¹. En la Figura 1.7 se muestra el esquema del proceso de adquisición de una imagen centellográfica planar y en la Figura 1.8 se muestra los equipos micro PET/SPECT/CT y SPECT-CT de humanos capaces de adquirir imágenes tridimensionales.

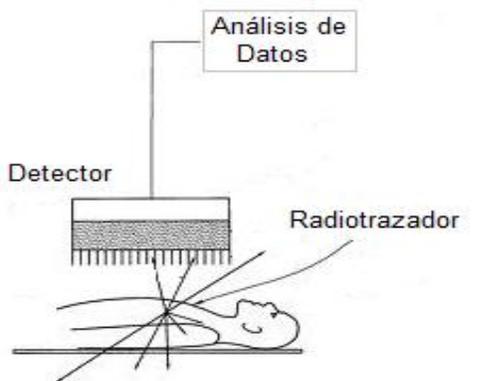


Figura 1.7: Esquema del proceso de adquisición de una imagen centellográfica planar.

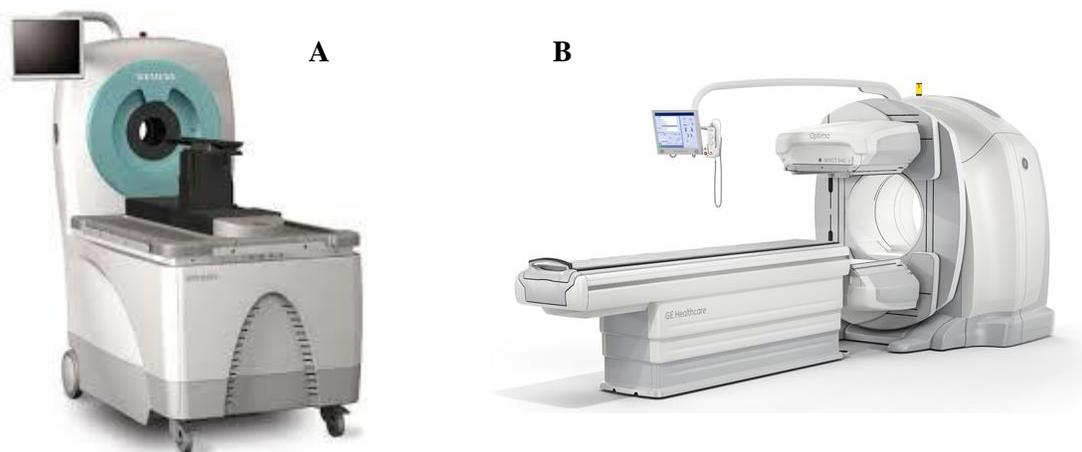


Figura 1.8: (A) Equipo comercial para pequeños animales Siemens Preclinical Inveon PET/SPECT/CT (Siemens Medical Solution Incorporated, TN, EEUU)⁹². (B) Sistema SPECT-CT utilizado en humanos.

En el caso de PET la molécula es marcada con un radionucleido emisor de positrones (^{18}F , ^{15}O , ^{13}N y ^{11}C) los que por aniquilación producen dos fotones en direcciones opuestas de 511 KeV. Los detectores de un tomógrafo PET están dispuestos en anillo alrededor del paciente, las detecciones en coincidencia de los fotones generados en cada aniquilación permiten la construcción de la imagen PET. En la Figura 1.9 se muestra un esquema del proceso de adquisición de una imagen PET ^{88,93}.

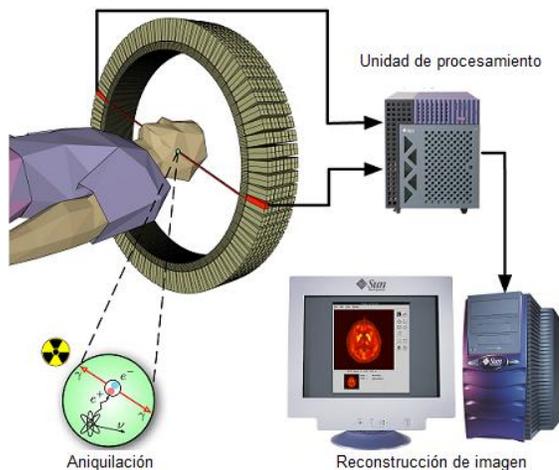


Figura 1.9: Esquema del proceso de adquisición de una imagen PET

1.5.1 Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia química definida, que contiene átomos radiactivos en su estructura y es apto para ser administrado en seres humanos con fines de diagnóstico o terapia en medicina nuclear. Pueden ser moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, o macromoléculas (anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y péptidos) que son marcadas radioactivamente y son administrados por vía venosa. No tienen efecto farmacológico, sino que su efecto está mediado por la radiación emitida. Según su aplicación médica se pueden clasificar en radiofármacos de diagnóstico o terapia. También se pueden clasificar según sus características de biodistribución en: aquellos en los cuales su biodistribución es determinada exclusivamente por sus propiedades químicas y físicas; y aquellos que la distribución final es determinada por su capacidad de unión a un receptor determinado o por otra interacción biológica. Estos últimos son los llamados radiofármacos específicamente dirigidos a blancos moleculares ^{94,95}.

1.5.2 Radiofármacos de Diagnóstico

Con la imagenología molecular, existe una elevada demanda para el desarrollo de nuevos agentes de imagen (radiofármacos de diagnóstico) que sean sensibles y específicos; y que rápidamente puedan ser traducidos de pequeños modelos animales a pacientes. Las técnicas de imagen SPECT y PET poseen la habilidad para detectar y monitorear en forma seriada y no invasiva una variedad de procesos biológicos y fisiopatológicos.

Un radiofármaco de diagnóstico es la molécula marcada con isótopos emisores de un fotón simple en forma de rayos gamma para el caso de ser empleado en gamma cámaras o con isótopos emisores de positrones para PET. En general, los radiofármacos de diagnóstico se utilizan en concentraciones muy bajas (10^{-6} - 10^{-8} M), y no se pretende que tengan efectos farmacológicos. El objetivo de la aplicación de radiofármacos de diagnóstico es que pueda ser capaz de brindar información morfológica y fisiológica mediante su acumulación en el tejido u órgano de interés. Requieren que su pureza radioquímica (PRQ) sea mayor a 90%, puesto que la inyección de una mezcla de diversas especies del radionucleido disminuye la captación en el órgano blanco, y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos ⁹⁶.

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). Los radionucleidos metálicos principalmente empleados en diagnóstico son ^{99m}Tc, ¹¹¹In y ⁶⁷Ga para SPECT y ⁶⁴Cu y ⁶⁸Ga para PET. También se pueden incorporar isótopos no metálicos como es el caso de ¹⁸F, ¹¹C, ¹⁵O (PET) e ¹²⁵I (SPECT) ^{94,95}.

1.5.3 Radionucleido: ^{99m}Tc

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 por sus ventajas frente a otros radionucleidos es el tecnecio 99-metaestable (^{99m}Tc). Este es un emisor gamma puro con un tiempo de semidesintegración ($t_{1/2}$) de 6.01 h, decae por transición isomérica mediante la emisión de un fotón gamma de 140.5 KeV al isótopo estable ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,5 \times 10^5$ años). La vida media de 6 h es el tiempo suficiente para permitir que se lleve a cabo la radiosíntesis, se prepare la dosis, y se obtengan las imágenes necesarias. Al mismo tiempo, la vida media es lo suficientemente corta como para permitir la administración de cantidades milicurios de ^{99m}Tc -radiofármaco sin causar una dosis de irradiación elevada en el paciente. La emisión monocromática de fotones de 140 KeV es totalmente colimada obteniéndose imágenes de alta resolución ^{94,95,97}.

Por otro lado, el ^{99m}Tc es altamente accesible y económico, dado que se obtiene de generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ que permiten disponibilidad permanente a bajo costo del radionucleido en cualquier Servicio de Medicina Nuclear, a diferencia de otros radionucleidos. El ^{99m}Tc es producto del decaimiento β^- del ^{99}Mo ($T_{1/2} = 66$ h), y es obtenido a partir de generador. Un generador $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$ 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 $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$ es llevada a cabo mediante fisión nuclear de ^{235}U o por irradiación neutrónica del ^{98}Mo ^{94,98,99}. En la Figura 1.10 se puede apreciar un esquema de un generador $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$ y la imagen de un generador comercial.

El ^{99m}Tc se obtiene del generador como el anión pertecneciato, $^{99m}\text{TcO}_4^- (+7)$, para que sea incorporado a un agente quelante debe ser reducido a un estado de oxidación menor con mayor reactividad química. El Tc puede ser reducido a una gran variedad de estados de oxidación menores y adoptar diversas configuraciones al unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación llamados “*cores*” o núcleos. Diversos factores pueden afectar el estado de oxidación final del ^{99m}Tc en el complejo: la naturaleza del

reductor y del ligando, el pH, la temperatura y la naturaleza de los grupos donores de electrones presentes en el ligando.

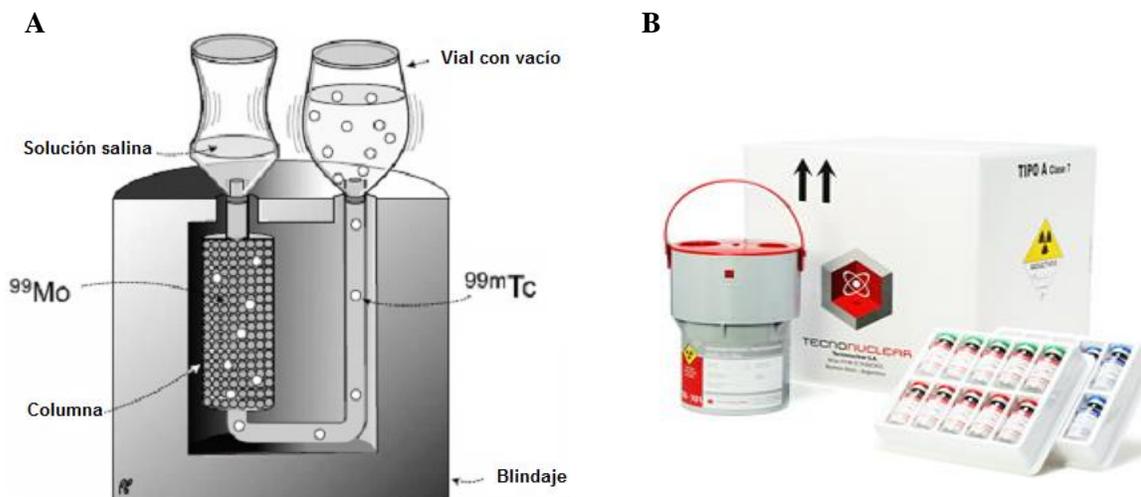


Figura 1.10: A) Esquema de un generador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. B) Generador comercial.

Debido a que durante el proceso de reducción en la marcación se pueden 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^{94,95,97}.

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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, en el preparado final pueden estar presentes por lo menos tres especies radiactivas:

- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ libre bajo la forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 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

El ^{99m}Tc es un radioisótopo perteneciente al Grupo 7B correspondiente a la 2ª serie de los metales de transición. Debido a su configuración electrónica $[\text{Kr}]4d^5 5s^2$ puede presentar múltiples estados de oxidación que van desde -1 a +7, siendo los más estables el estado +7 (TcO_4^-) y +4 (TcO_2). Las formas reducidas de ^{99m}Tc tienen niveles d incompletos por lo que fácilmente forman compuestos de coordinación con un índice de coordinación de 4 a 9. La química del tecnecio es dominada por la formación de complejos en los cuales el metal es deficiente de electrones actúa como aceptor de electrones (ácido de Lewis) provenientes de átomos o grupos funcionales capaces de donar electrones (bases de Lewis). Según el criterio de Pearson los metales “duros” se combinan con ligandos “duros” y metales “blandos” se combinan con ligando “blandos”. Los “duros” son átomos pequeños que retiene toda la densidad de carga electrónica, por ejemplo, estados de oxidación del ^{99m}Tc como (V) y (IV) combinan bien con ligandos “duros” con grupos oxo, nitruros o nitreno. En cambio, los “blandos” son átomos o grupos grandes que son capaces de compartir la densidad de carga electrónica. Para ^{99m}Tc estados de oxidación “blandos” como (III) y (I) combinan con ligandos blandos como isonitrilos, fosfinas o arenos ^{94,95,97,100}.

1.5.4 Estrategias de marcación con ^{99m}Tc

La estrategia de marcación con ^{99m}Tc depende de la molécula a marcar y del propósito del estudio. Las estrategias de marcación se clasifican en tres categorías principales: *i.* marcación directa o integrada, *ii.* mediante el uso de agentes quelantes bifuncionales (ligandos bifuncionales) y *iii.* una estrategia híbrida.

i. Marcación directa o integrada

En una biomolécula el radionucleido ^{99m}Tc es incorporado mediante coordinación con grupos tioles libres de aminoácidos cisteína presentes en la cadena aminoácídica. Esta estrategia de marcación es fácil de llevar a cabo, pero presenta algunas consideraciones críticas como son la

posibilidad de pérdida de actividad biológica, el estado de oxidación del Tc en el radioconjugado final, el número de ^{99m}Tc unidos a la biomolécula y la estabilidad de la solución del radioconjugado ^{99m}Tc -biomolécula. En la Figura 1.11 se esquematiza las estrategias de marcación directa de biomoléculas ⁹⁴.

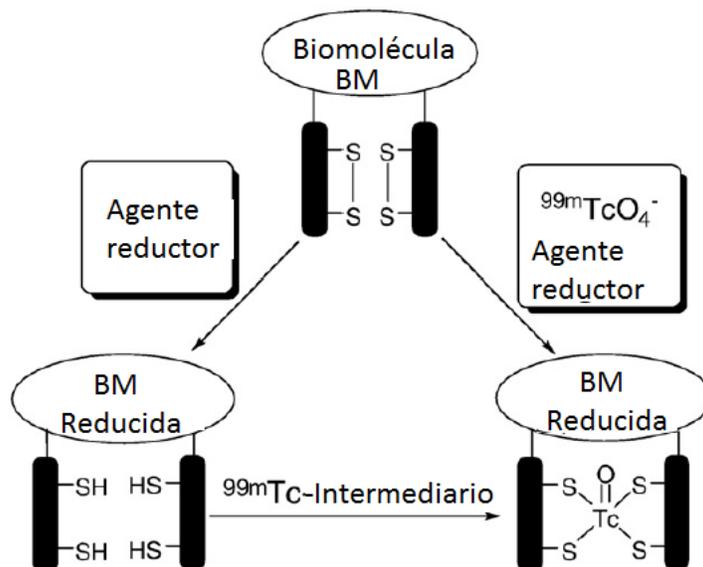


Figura 1.11: Estrategia de marcación directa de biomoléculas. Fuente: *Liu et. al 2008* ⁹⁴

ii. Empleando ligandos bifuncionales

Consiste en el empleo de agentes quelantes (ligandos o agentes bifuncionales, BFC) que coordinan con el radionucleido en un extremo y en el otro extremo se unen a la biomolécula (Figura 1.12). El empleo de conectores o espaciadores es opcional dependiendo de la biomolécula a marcar. La elección del agente bifuncional está determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radiometal. Esta estrategia es una de las más utilizadas, debido a que permite conservar las propiedades de reconocimiento de la biomolécula, y elegir cuidadosamente el agente bifuncional. Esta estrategia también permite la marcación por dos técnicas: a) marcación con ^{99m}Tc de la biomolécula conjugada con el agente bifuncional, o b) un enfoque indirecto donde es posible preformar el complejo de ^{99m}Tc con un agente bifuncional y posteriormente este complejo se conjuga a la biomolécula de interés ^{94,95}

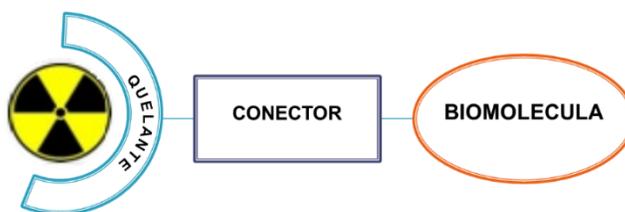


Figura 1.12: Esquema de la estrategia de marcación empleando ligandos bifuncionales.

iii. Estrategia híbrida

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 1.13).

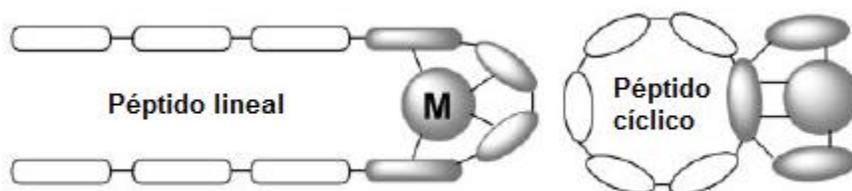


Figura 1.13: Esquema de la estrategia de marcación híbrida Fuente: *Liu S 2004*⁹⁷.

1.5.5 Ligandos bifuncionales de ^{99m}Tc

Los ligandos bifuncionales presentan básicamente dos estructuras: en un extremo átomos que coordinan con el radionucleido y en el otro extremo un grupo funcional que permite la unión a una biomolécula. Un ligando bifuncional (BFC) ideal es el que es capaz de formar un complejo estable con ^{99m}Tc en alto rendimiento a muy baja concentración del conjugado BFC-biomolécula (BM). Para lograr este objetivo, el BFC debe estabilizar selectivamente el estado de oxidación del tecnecio de manera que el complejo con ^{99m}Tc (^{99m}Tc -BFC-BM) no está sujeto a reacciones redox. Los cambios de estado de oxidación suelen ir acompañados de transquelación de ^{99m}Tc de un

complejo de ^{99m}Tc -BFC-BM a ligandos quelantes naturales presentes en los sistemas biológicos. El BFC ideal debe formar un complejo ^{99m}Tc -BFC-BM con estabilidad termodinámica y cinética con respecto a la transquelación o disociación de ^{99m}Tc . El BFC ideal se espera que forme el complejo ^{99m}Tc -BFC-BM con un número mínimo de isómeros de ^{99m}Tc -quelante, ya que diferentes formas isoméricas pueden dar lugar a diferentes características biológicas y farmacocinéticas del complejo de ^{99m}Tc -BFC-BM. Por último, el ligando bifuncional debe ser fácilmente unido a la biomolécula ⁹⁴.

Como se mencionó previamente en la sección 1.5.3 el Tc presenta una gran variedad de estados de oxidación y puede adoptar diversas configuraciones en su primera esfera de coordinación (*cores*). Estos *cores* son formados por los átomos donores de electrones de los ligandos que se desea marcar. En la Figura 1.14 se muestran los diferentes *cores* para marcación de biomoléculas (BM) con ^{99m}Tc . En este trabajo se estudiarán los *cores* $[\text{O}=\text{Tc}(\text{V})=\text{O}]^+$ Figura 1.14 (C) y $[\text{Tc}]_{\text{HYNIC}}$ Figura 1.14 (F).

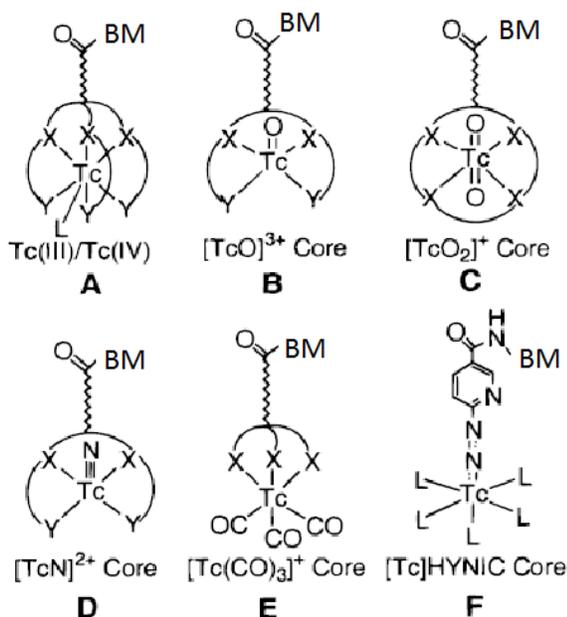


Figura 1.14: Diferentes *cores* para marcación de biomoléculas (BM) con ^{99m}Tc . X, Y= átomos donores de electrones. L= ligando. Fuente: Liu S y Edwards 1999 ¹⁰¹.

1.5.6 Core [O=Tc=O]⁺

El core [O=Tc=O]⁺, es un díoxo con una geometría de coordinación con estructura de octaedro con una alta densidad de carga positiva sobre el Tc en estado de oxidación +5. En esta estructura se unen en posición axial trans dos átomos de O²⁻, formando un complejo polar monocatónico y quedando cuatro posiciones de coordinación disponibles en el plano ecuatorial del octaedro. En estas cuatro posiciones ecuatoriales se unen grupos donores de electrones duros, como por ejemplo, grupos tetraamino de cadena lineal o macrociclos como el cyclam y también se han descrito la unión de fosfinas ¹⁰¹. El grupo de *Maina et al.*¹⁰²⁻¹⁰⁵, ha descrito la utilización de tetraaminos alifáticos (N₄) para la marcación con ^{99m}Tc formando el complejo díoxo en péptidos análogos de somatostatina, bombesina y minigastina en estudios preclínicos con animales y en estudios clínicos con humanos. La marcación es descrita a temperatura ambiente obteniéndose un compuesto sumamente estable en medio biológico con una considerable hidrofiliidad al péptido marcado favoreciendo su excreción por vía urinaria. Otro ligando utilizado para la obtención de este core en la marcación con ^{99m}Tc es un derivado del cyclam (N_{4II}), con una estructura de tetraamino en un anillo cerrado el cual confiere gran estabilidad al radionucleido y buenas propiedades farmacocinéticas ¹⁰⁶.

1.5.7 Core [Tc]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 ¹⁰⁷. 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 ^{94,95,101}.

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 (piramidal u octaedro) del tecnecio. En la Figura 1.15 se muestran algunas estructuras de coordinación del *core* [Tc]HYNIC⁹⁵. Algunos coligandos comúnmente utilizados se muestran en la Figura 1.16, donde la elección de los mismos permite modificaciones en propiedades como la hidrofiliicidad y farmacocinética del compuesto. 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^{94,95,101,108}. 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, es más favorable para la reducción y formación del complejo inicial con tecnecio. Sin embargo, se ha observado estabilidad relativamente baja en soluciones diluidas 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^{108,109}.

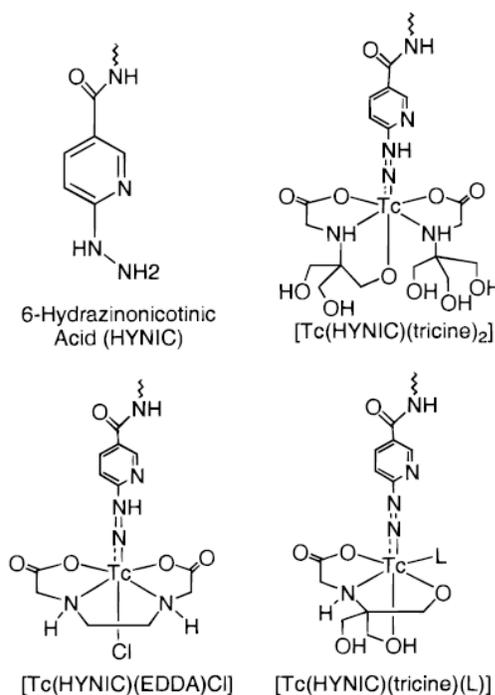


Figura 1.15: Cores de [Tc]HYNIC para unión a biomoléculas, con coligandos tricina, EDDA.

L= puede ser trifenilfosfina o ácido nicotínico. Fuente: *Liu S y Edwards 1999*⁹⁵.

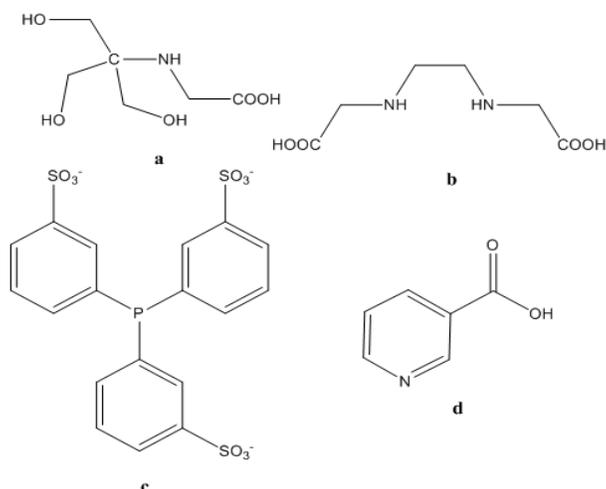


Figura 1.16: Coligandos más utilizados para la marcación de HYNIC con ^{99m}Tc : a) Tricina; b) EDDA; c) derivado hidrosoluble de trifenilfosfina; d) ácido nicotínico.

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 1.17), 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 ¹⁰¹.

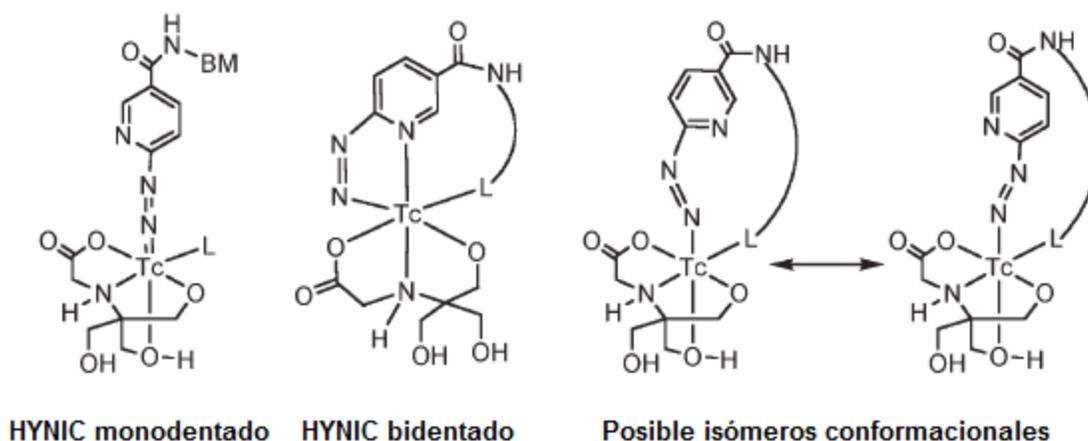


Figura 1.17: Sistema de ligando ternario de ^{99m}Tc : posibles estructuras utilizando tricina como coligando, L= trifenilfosfina. Fuente: *S Liu et. al. 1999*¹⁰¹.

1.5.8 HYNIC: grupos protectores

El grupo hidrazino libre presente en HYNIC tiene una alta susceptibilidad a dar reacciones de oxidación por acción de la luz, provocando la descomposición del agente bifuncional. Por lo cual 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. El derivado Suc-HYNIC (Clorhidrato de 6-hidrazinonicotinato de succinimidilo), el cual presenta un agrupamiento éster activado en su estructura (para formación de enlace amida con BM), puede reaccionar consigo mismo conduciendo a reacciones de polimerización. Varias biomoléculas 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 BM (ϵ -amino de los residuos de lisina o N-terminal)¹¹⁰. 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 1.18), 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 ¹⁰⁹.

Este tipo de reacciones no deseadas puede hacer muy difícil mantener la pureza y estabilidad del complejo HYNIC-BM 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*-butoxicarbonilo (Boc) ^{109,111}, trifluorometilcarbonilo (TFA) ^{109,112} y agrupamientos hidrazona ^{109,113,114} (Figura 1.18). En este sentido, la formación de hidrazonas, en los conjugados HYNIC-BM, 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 ¹¹⁵. El rendimiento de la formación del complejo entre el ^{99m}Tc con el ligando bifuncional y co-ligando depende ampliamente de la cinética del hidrólisis de la hidrazona, así como de la concentración total del conjugado de HYNIC-BM 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 50-100 equivalentes del conjugado BM-HYNIC-hidrazona en exceso por equivalente de tecnecio en la reacción.

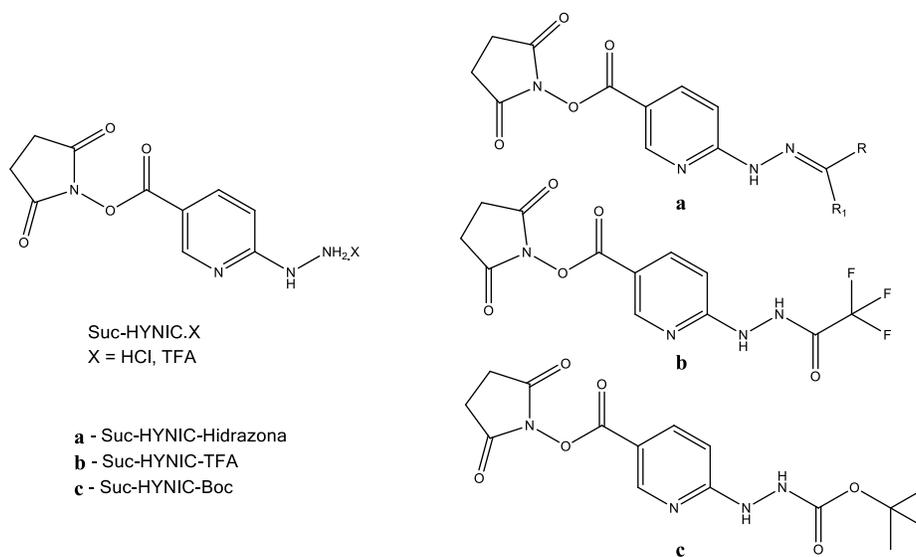


Figura 0.1:

Figura 1.18: 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 ^{108,109}. 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 ¹¹¹. Otro grupo describió que el análogo protegido con un grupo trifluorometilcarbonilo 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 ¹¹⁶.

1.6. Síntesis de Péptidos

La historia de la síntesis de péptidos se remonta a 1901 cuando Emil Fischer ¹¹⁷ logró sintetizar el dipéptido glicil-glicina demostrando que los aminoácidos estaban unidos por un enlace peptídico. Las investigaciones de la síntesis de péptidos continuaron en acenso, con ello el desarrollo de grupos protectores como el benciloxycarbonilo y en 1953 Vincent du Vigneaud sintetizó en disolución el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina ¹¹⁸, ganándose así el premio Nobel de química en 1955. En 1963, Bruce Merrifield dio a conocer la síntesis del tetrapéptido leucilalanilglicilalanina ¹¹⁹ utilizando una metodología de síntesis en fase sólida en resina de poliestireno la cual permitía disminuir los tiempos de reacción y simplificar la purificación del péptido. En 1969 ¹²⁰, Merrifield presentó la síntesis de la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas, empleando la metodología de fase sólida (SPPS, de sus siglas en inglés), ganándose el premio Nobel de química en 1984. En la técnica original de Merrifield se utilizaban condiciones de síntesis muy agresivas las cuales se han ido perfeccionando, siendo hoy en día la técnica basada en la química de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) la de elección en la síntesis de péptidos ¹²¹.

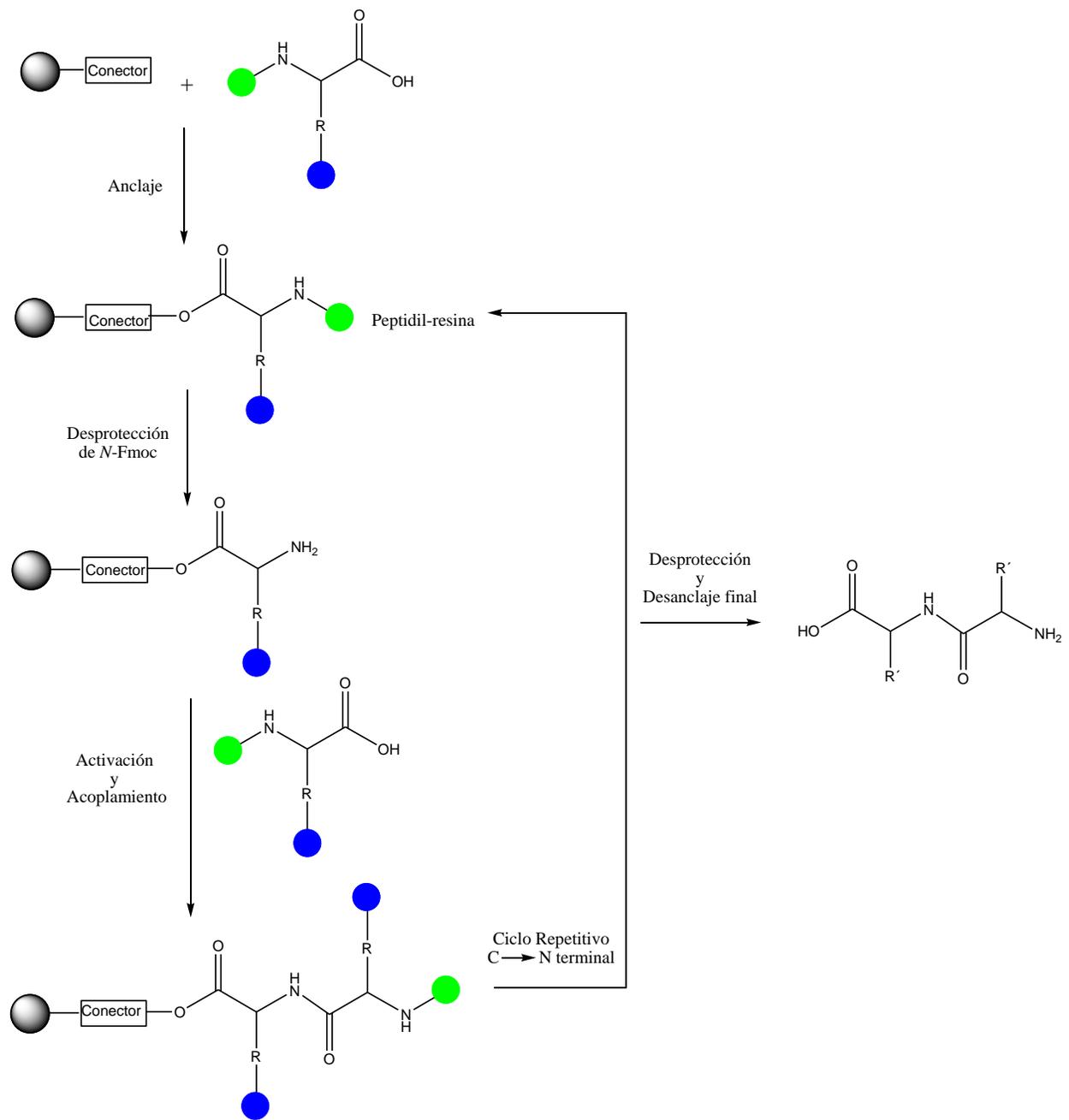
La síntesis de péptidos en fase sólida presenta algunas ventajas frente a la síntesis en disolución como: no se aíslan ni se caracterizan productos intermedios; reacciones completas por exceso de reactivos; permite filtrado de reactivos en exceso; practicidad; el proceso puede ser automatizable. Sin embargo, se presentan nuevos problemas como: reacciones secundarias no deseadas (ej.: alquilación de cadenas laterales de aminoácidos durante la desprotección); reacciones incompletas (acilación incompleta o desprotecciones incompletas) que generan secuencias peptídicas truncadas. Estos productos no deseados se acumulan en la resina y son obtenidos junto con el producto final, dificultando la purificación dado que presentan características muy similares al producto final. Otras limitaciones de la síntesis en fase sólida corresponden a que muchas de las técnicas empleadas en el seguimiento de reacciones de química convencional en fase sólida no sean aplicables, siendo necesario realizar previamente un paso de desanclaje del producto intermedio. Esto último hace que se empleen técnicas de seguimiento con reacciones colorimétricas para aminas o infrarrojo para las cuales no se requiere de un paso de desanclaje previo. Otra desventaja de la metodología en fase sólida sería el costo del proceso y el empleo de exceso de disolventes ¹²²⁻¹²⁴.

En el Esquema 1.1 se puede apreciar los principios de la síntesis en fase sólida. El primer aminoácido es anclado a la resina, la elongación del péptido se realiza desde el extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal, es decir, de forma inversa a la síntesis en disolución para disminuir el riesgo de racemización. Los aminoácidos empleados contienen grupos protectores en el grupo α -amino y en la cadena lateral, estrategia denominada química ortogonal ¹²⁵, lo que implica que la elongación de la secuencia de aminoácidos sea una repetición de ciclos de desprotección del grupo protector en α -amino del aminoácido unido a la resina y activación/acoplamiento del próximo aminoácido. El paso final para la obtención del péptido corresponde al desanclaje y desprotección de las cadenas laterales. La formación del enlace peptídico resulta el paso limitante, de forma que el acoplamiento del próximo aminoácido se realiza con este aminoácido en exceso y con activación *in situ* del grupo carboxilo para formar el enlace amida. Estas condiciones favorecen altos rendimientos y disminuyen la racemización ^{124,126}.

La síntesis de péptidos en fase sólida puede realizarse manualmente o de forma automatizada empleando para ello equipos comerciales: múltiples sintetizadores automáticos de péptidos. Estos equipos dependiendo del modelo, pueden permitir la síntesis de varios péptidos en paralelo en diferentes escalas desde 15 mg hasta 2 gramos ^{124,127}.

1.6.1 Racemización

De los 20 aminoácidos naturales, 19 (con excepción de la glicina) presentan centros quirales con configuración L en los carbonos alfa. Isoleucina y treonina además tienen dos centros quirales en sus cadenas laterales. La actividad biológica de los péptidos y proteínas depende de la quiralidad, por lo cual la integridad de ésta debe mantenerse en la síntesis. Si se tiene una mínima tasa de racemización en cada residuo aminoacídico añadido durante la síntesis, se pueden obtener diversos productos distintos con aminoácidos D y purificar el péptido correcto representaría un serio problema.



Esquema 1.1: Síntesis de péptidos en fase sólida

En los aminoácidos ópticamente activos, uno de los sustituyentes del carbono alfa es un hidrógeno, cuya remoción para el siguiente acoplamiento, representa un potencial mecanismo para la racemización del centro quiral. De esta forma, en la síntesis de péptidos, el riesgo de racemización es mayor en la etapa de activación y acoplamiento del nuevo aminoácido, dado que la acidez del protón en el carbono alfa aumenta con la activación del grupo carboxilo del aminoácido que se va a acoplar.

La racemización puede ocurrir principalmente a través de dos mecanismos^{124,128}:

- I. Enolización de la especie activada (Figura 1.19).
- II. Formación de una oxazolona (ion oxazolonio en el caso de aminoácidos *N*-alquilados) (Figura 1.20).

El grado y mecanismo de racemización depende del método de activación empleado. En los métodos de activación que emplean bases existe una tendencia a la enolización (I) por pérdida del protón del carbono alfa (Figura 1.19). En la práctica, dado que la enolización se da cuando la velocidad de acoplamiento es extremadamente lenta (cosa que no es muy común en la síntesis de péptidos), no es un problema mayor con excepción del empleo del aminoácido fenilglicina en los cuales la formación del enol se ve favorecida por estabilización por efecto resonante dador^{124,128}.

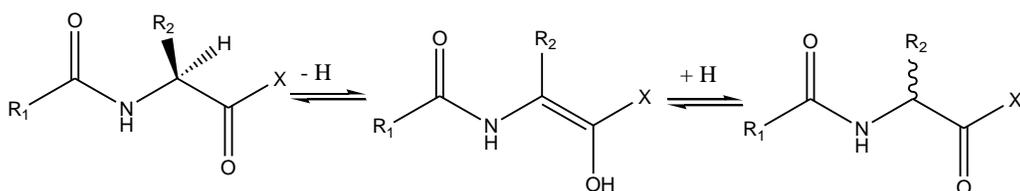


Figura 1.19: Racemización por enolización directa

El otro mecanismo de racemización (II) implica la formación del intermedio oxazolona, formada por el ataque del oxígeno carbonílico del sistema amida sobre el carboxilo activado sobre el grupo amida adyacente (Figura 1.20). La formación de la oxazolona puede ocurrir fácilmente en los péptidos con el grupo carboxilo activado, especialmente si el grupo activante es un buen grupo saliente. El riesgo de formación de una oxazolona se reduce utilizando aminoácido protegido con un derivado de uretano, y en el caso de formarse la oxazolona con estos, ésta generalmente es resistente a la desprotonación y a la racemización. La excepción de esto se da para los aminoácidos

histidina y cisteína, principalmente durante el acoplamiento del residuo en el extremo C-terminal a una resina funcionalizada con un conector del tipo bencílico con un grupo metilhidroxilo ^{124,128}.

La racemización de la cisteína puede ocurrir durante el acoplamiento y durante la remoción del grupo *N*-Fmoc, principalmente cuando la cisteína es anclada como primer aminoácido (C-terminal) a una resina con conector hidroxilo, causando una β -eliminación. Esta racemización de la cisteína se soluciona empleando resinas funcionalizadas con un grupo halometilo, ejemplo: resina 2-clorotritilo, resina 4-(bromometil)fenoxiacetamida (similar a resina de Wang) y la resina bromo-Sasrin. Con estas resinas el anclaje de la cisteína es una esterificación con un desplazamiento nucleofílico del halógeno por el grupo carboxilo y la racemización es muy leve. El acoplamiento seguro de cisteína con mínima racemización incluye también el uso de ésteres preformados de pentafluorofenilo (Pfp) o una pre-activación con DIC/HOBt ^{124,129,130}.

En el caso de la histidina, la proximidad del anillo imidazol con un nitrógeno- π básico al carbono alfa cataliza la racemización. Esto puede evitarse, protegiendo el nitrógeno- π (que es el que se encuentra más próximo al carbono alfa). Para ello, normalmente se puede emplear el derivado Fmoc-His(Trt) (Trt: tritilo) y en los casos de reacciones de agregación lenta se suele preferir el derivado Fmoc-His(Bum) (Bum: *ter*-butiloximetilo). El problema de racemización por acoplamiento de la histidina a una resina funcionalizada con un grupo hidroxilo se soluciona cambiando la resina por una con un conector tritilo ¹²⁴.

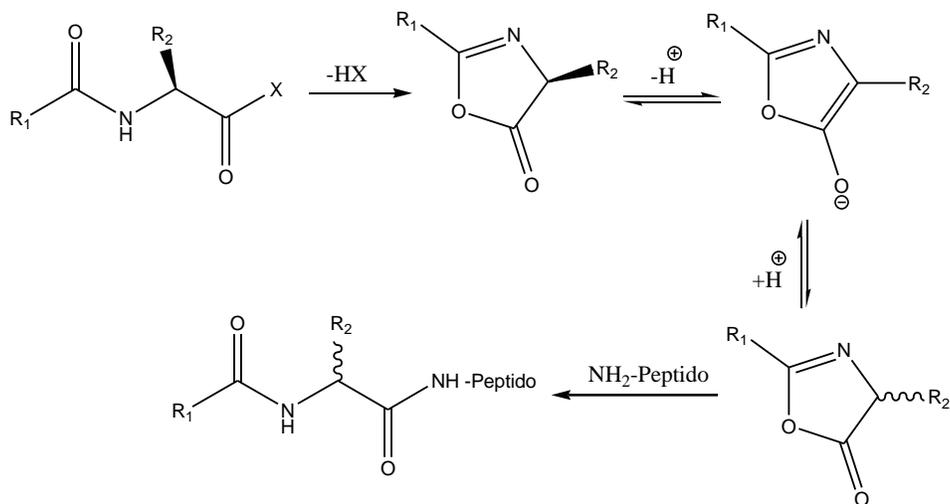


Figura 1.20: Racemización vía formación de oxazolona

1.6.2 Grupos protectores para $N\alpha$ - aminoácidos

La síntesis de péptidos en fase sólida está basada en una secuencia de adición de aminoácidos con grupos protectores en el $N\alpha$ y en la cadena lateral. Algunas de las características que debe tener el grupo protector son las siguientes: ser económico y estar disponible; de fácil y eficiente introducción; de fácil caracterización; no debe introducir nuevos centros estereogénicos; debe ser estable en condiciones de reacción y purificación; debe ser efectiva la desprotección y debe ser selectiva en condiciones específicas; los subproductos de la desprotección deben de ser fácilmente separables.

Si bien existen diversos grupos protectores, los que forman enlaces carbamatos son los más utilizados, como por ejemplo el benciloxicarbonilo (Cbz), *ter*-butiloxicarbonilo (Boc) y el 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) (Figura 1.21). El grupo Cbz es estable en condiciones básicas y ácidas suaves y se elimina con hidrogenación catalítica en presencia de paladio. El grupo Boc es estable en condiciones básicas, eliminándose en condiciones ácidas como diluciones del ácido trifluoroacético (TFA). El Fmoc es estable en condiciones ácidas, eliminándose de forma no hidrolítica en una β -eliminación inducida por algunas bases orgánicas como la piperidina ^{121,129,131}.

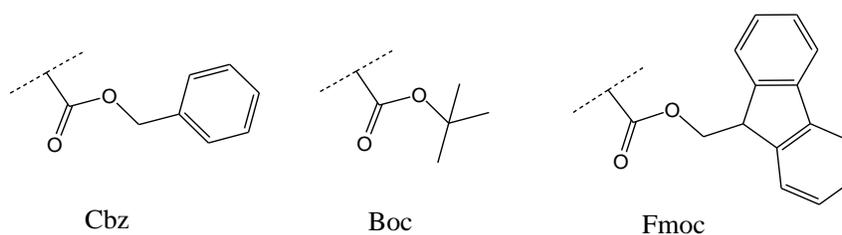


Figura 1.21: Grupos protectores $N\alpha$ -amino

Actualmente los grupos protectores Fmoc y Boc son los más utilizados en la síntesis de péptidos. Utilizando Boc el desanclaje final se logra en condiciones ácidas fuertes, además de TFA en presencia de ácido fluorhídrico o ácido trifluorometanosulfónico. Además de que las condiciones de desanclaje fuerte pueden afectar la estabilidad y actividad del péptido, la manipulación de HF es peligrosa y requiere equipamiento más costoso ^{121,129,131}.

1.6.3. Métodos de acoplamiento

La formación directa del enlace peptídico es una reacción endergónica, por lo que para que se forme el enlace amida de forma eficiente, se requiere de la activación de los grupos carboxilo de los N_α -aminoácidos protegidos. El grupo activante debe ser cuidadosamente seleccionado para lograr altos rendimientos de acoplamiento y al mismo tiempo evitar reacciones secundarias y la racemización. El orden de eficiencia en los métodos de acoplamiento (Figura 1.22) para diferentes ésteres como grupos activantes es: Pfp < Bt (1-benzotriazolil) < DIC/Bt (éster 1-benzotriazolilo preparado en presencia de diisopropilcarbodiimida (DIC)) < HBTU (éster 1-benzotriazolilo preparado con el reactivo hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU)) ~ PyBOP (éster 3-piridotriazolilo preparado con el reactivo hexafluorofosfato de (3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)tripirrolidino fosfonio) < HATU (éster 3-piridotriazolilo preparado con el reactivo hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio)^{126,129}.

- *Ésteres activados*: diversos ésteres han sido estudiados, siendo el Pfp el más utilizado. La principal ventaja del grupo Pfp es que presenta muy pocas reacciones secundarias. Uno de los problemas es que la reacción de formación del éster Pfp es lenta, pero esto se puede mejorar con el empleo de HOBt. Una limitante es que no existen comercialmente todos los Fmoc-aminoácidos derivados con Pfp, por ejemplo: Fmoc-Ser(tBu)-OPfp y Fmoc-Thr(tBu)-OPfp son difíciles de cristalizar y purificar^{126,129}.
- *Carbodiimidias*: han sido muy populares como agentes de acoplamiento *in situ* en la síntesis de péptidos. Las principales carbodiimidias utilizadas son dicitohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC). El uso de DIC es de elección frente a DCC porque el producto secundario obtenido es una urea soluble en dimetilformamida (DMF) de fácil eliminación a diferencia de la urea insoluble obtenida con DCC. Las reacciones de acoplamiento con carbodiimidias son rápidas en disolventes no polares como el diclorometano (DCM), pero también funcionan en DMF. Las carbodiimidias se suelen utilizar en presencia de algún aditivo de tipo HOX que actúa como catalizador y tiene el beneficio de reducir los niveles de racemización, dentro de ellos HOBt y HOAt^{126,129}.

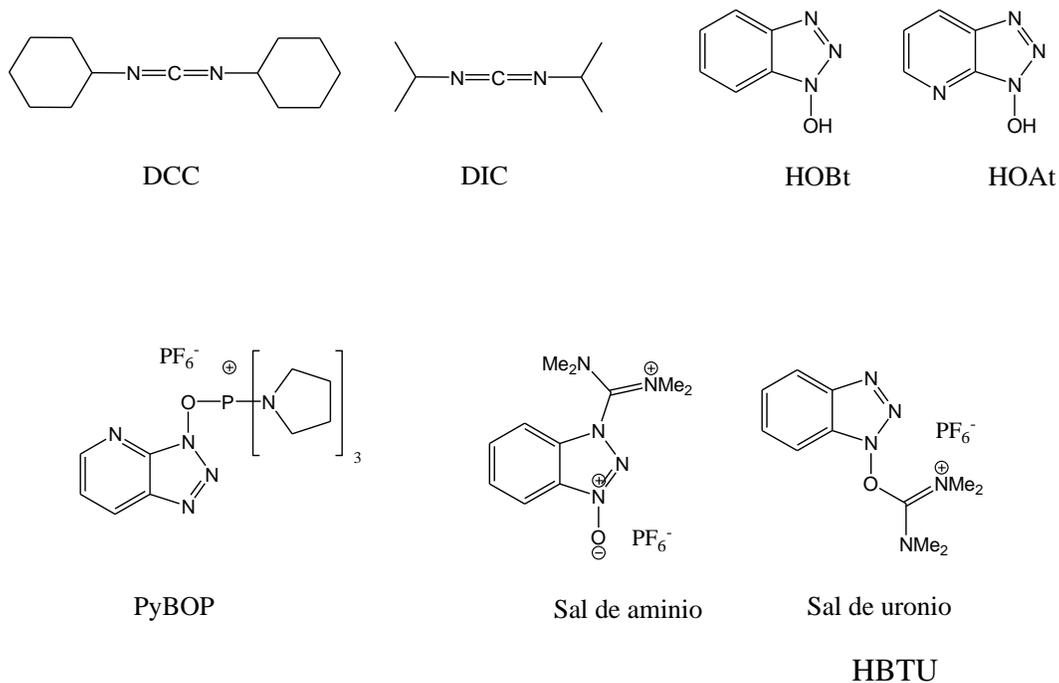


Figura 1.22: Agentes de acoplamiento

- *Sales de uronio/iminio y de fosfonio*: en el último tiempo las sales de iminio (también llamadas de uronio) y de fosfonio se han vuelto los reactivos preferidos para la activación del grupo carboxilo *in situ*. Las más populares son: PyBOP, HBTU. Estas sales en presencia de una base terciaria convierten el Fmoc-aminoácido en una especie activada (ésteres Bt). Han demostrado superioridad frente a otros reactivos de acoplamiento en cuanto a eficiencia y disminución de la racemización^{126,129}.

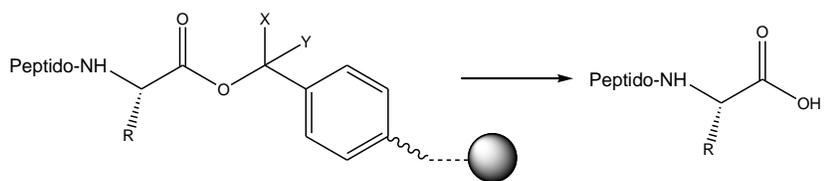
1.6.4. Resinas de fase sólida

La síntesis en fase sólida es una metodología la cual emplea polímeros. Estos polímeros constan de tres partes: soporte sólido, espaciador y grupo funcional conector. El soporte sólido es una matriz polimérica generalmente insoluble, siendo los más utilizados polímeros orgánicos

entrecruzados (microporosos o macroporosos) tales como copolímeros de poliestireno y divinilbenceno, y los copolímeros de poliestireno, divinilbenceno y polietilenglicol. El espaciador, que puede no existir, mantiene unidos el soporte con el conector. El conector es un grupo funcional con características de grupo protector o reactivo. Mientras que el soporte es el que brinda la estabilidad térmica, el conector es el que determina las características químicas. La metodología de síntesis en fase sólida consiste en la secuencia genérica de: i) anclaje del reactivo de partida; ii) lavado; iii) reacción; iv) lavado; v) desanclaje ^{132,133}.

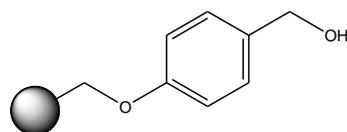
En la síntesis de péptidos el conector actúa como grupo protector reversible del aminoácido en el extremo C-terminal durante la síntesis del péptido. La selección del conector determina la funcionalidad en el extremo C-terminal del producto final y las condiciones de desanclaje. La mayoría de los conectores son diseñados para generar péptidos ácidos o amidas luego del desanclaje con TFA. La concentración de TFA requerida, según el tipo del conector, establece si el péptido final se obtiene con sus cadenas laterales total o parcialmente desprotegidas. Otros conectores permiten el desanclaje final mediante un ataque nucleofílico, generando péptidos con el extremo C-terminal modificado (ésteres o amidas secundarias). Además, otros conectores permiten el desanclaje mediante estrategias de fotólisis. En las Figuras 1.23 a 1.26 se pueden apreciar las resinas más comunes para obtener péptidos ácidos, amidas, por ataque nucleofílico y por fotólisis, con las correspondientes condiciones de desanclaje ¹²⁴.

Resinas para obtener péptidos ácidos por hidrólisis

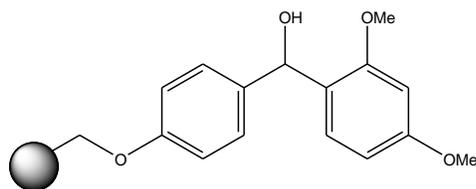


Condiciones de desanclaje

90- 95 % v/v TFA en CH₂Cl₂, 1-2 h

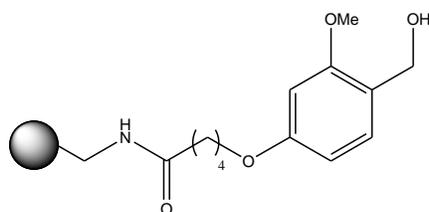


Resina de Wang



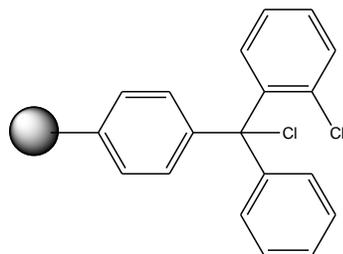
0.2 % TFA en CH₂Cl₂, 3 min
1-5 % TFA en CH₂Cl₂, 5 min

Resina de Rink ácida



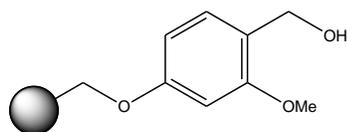
1 % TFA en CH₂Cl₂, 2 - 5 min

Resina HMPB



1-5 % TFA en CH₂Cl₂, 1 min

Resina de 2-Clorotritilo



1 % v/v TFA en CH₂Cl₂, 5 - 10 min

Resina de SASRIN

Figura 1.23: Resinas para obtención de péptidos ácidos por hidrólisis ¹²⁴.

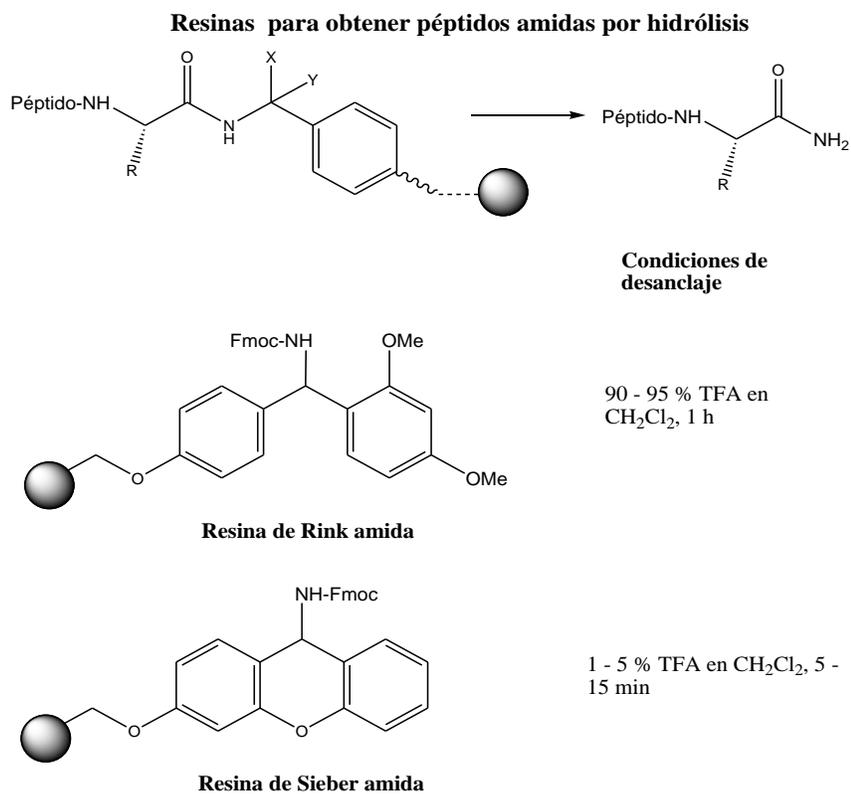


Figura 1.24: Resinas para obtención de péptidos amidas por hidrólisis ¹²⁴.

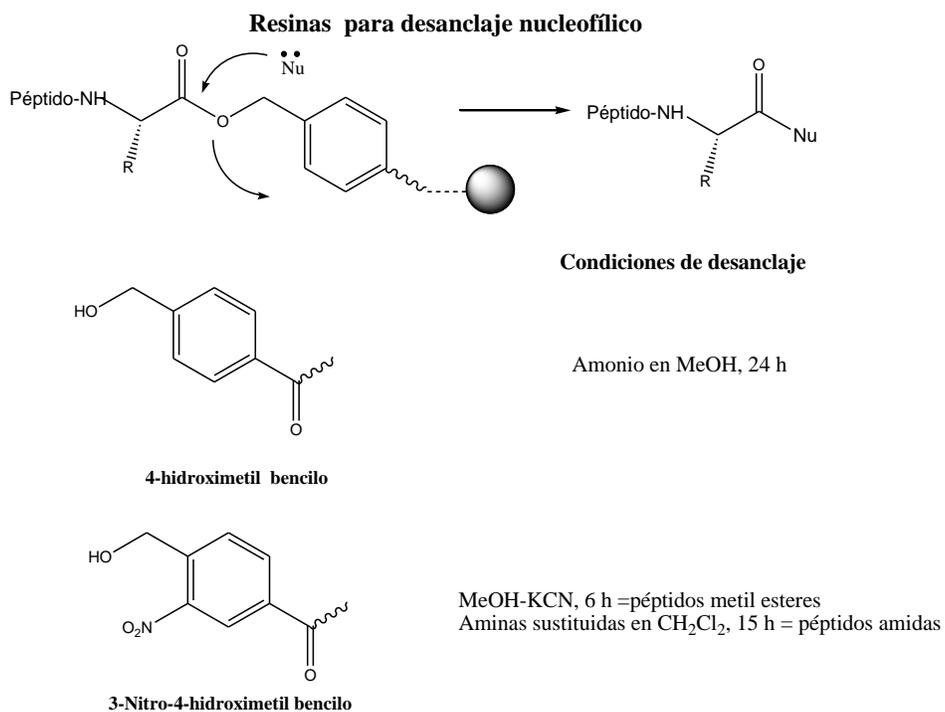


Figura 1.25: Resinas para desanclaje por ataque nucleofílico ¹²⁴.

Resinas para desanclaje por fotólisis

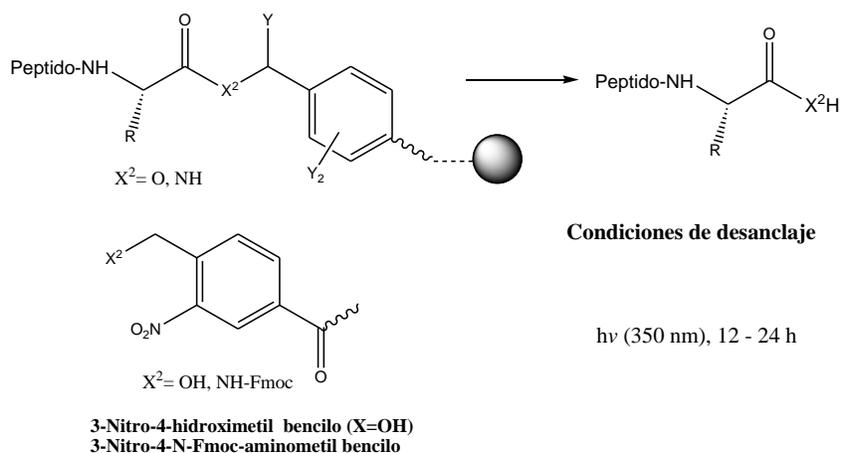


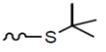
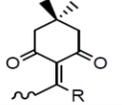
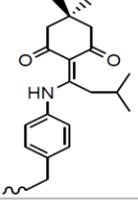
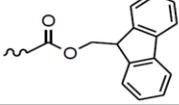
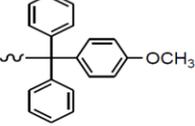
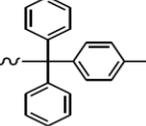
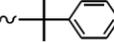
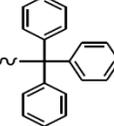
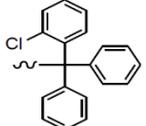
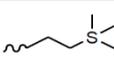
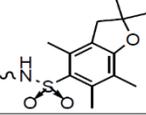
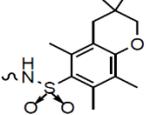
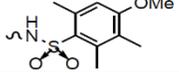
Figura 1.26: Resinas para desanclaje por fotólisis para obtener péptidos ácidos o amidas ¹²⁴.

1.6.3 Aminoácidos

La mayoría de los aminoácidos tienen cadenas laterales muy reactivas, por lo que se deben emplear grupos protectores para evitar formación de enlaces peptídicos no deseados, racemizaciones y otras reacciones secundarias. Estos grupos protectores deben ser estables en las condiciones de la síntesis peptídica y ser removibles en condiciones suaves que no afecten el enlace peptídico. Generalmente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, son tales que son removidos en condiciones de TFA (si se emplean condiciones de síntesis Fmoc) dado que permiten la desprotección total y el desanclaje final en un mismo paso. En la Tabla 1.2 se pueden apreciar los principales grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos con las respectivas condiciones de desprotección y de estabilidad ^{124,131,134}.

Los grupos protectores de las cadenas laterales para una síntesis de péptidos en fase sólida empleando Fmoc como grupo protector α -amino, serían: *Arg*: Pmc, Pbf, Mtr; *Asp/Glu*: OtBu, O-All, O-Dmab, O-2-PhiPr; *Asn/Gln*: Trt, Mtt; *Cys*: Trt, Acn, S-tBu, tBu, Mmt; *His*: Trt, Boc, Bum; *Lys*: Boc, N-Dde, Mtt, Mmt; *Ser/Thr/Tyr*: tBu, Trt, tBu; *Tyr*: 2-ClTrt, *Trp*: Boc ^{124,131,134}.

Tabla 1.2: Principales grupos protectores de las cadenas laterales con sus condiciones de desprotección y estabilidad
124,131,134,135

Nombre	Estructura	Desprotección en	Estable en
O-All/Alloc		3 eq Pd(Ph ₃ P) ₄ en CHCl ₃ /AcOH/NMM (37:2:1)	TFA, piperidina, hidrazina
O-tBu		95 % TFA	1 % TFA, piperidina, Pd(0), hidrazina
S-tButiol		3 eq. TBP en propanol aq. o TFE aq.	TFA, piperidina, hidrazina
N-Dde		2 % hidrazina en DMF o 20 % hidroxilamina/ 15 % imidazol en NMP/ DCM (5:1)	TFA, piperidina, Pd(0), DBU
O-Dmab		2 % hidrazina en DMF	TFA, piperidina, Pd(0), DBU
N-Fmoc		20 % piperidina en DMF	TFA, Pd(0)
S-Mmt N-Mmt		1 % TFA en DCM con 1-5 % TIS AcOH/TFE/DCM (1:2:7)	Pd(0), hidrazina, piperidina
N-Mtt		1 % TFA en DCM con 1-5 % TIS	Pd(0), hidrazina, piperidina
O-2-(PhiPr)		2 % TFA en DCM con 1-5 % TIS	Pd(0), piperidina
O-Trt		1 % TFA en DCM con 1-5 % TIS	Pd(0), hidrazina, piperidina
O-2-ClTrt		1 % TFA en DCM con 1-5 % TIS	Pd(0), hidrazina, piperidina
OTMSEt		1M TBAF en DMF	Pd(0), hidrazina, piperidina
Pbf		95 % TFA en DCM	piperidina
Pmc		50 % TFA en DCM	piperidina
Mtr		90 – 95 % TFA	piperidina

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El melanoma cutáneo es un tipo de cáncer de piel muy agresivo, representa solamente un 5% del cáncer de piel, sin embargo, está asociado a un 75 % de la mortalidad por cáncer de piel ⁵⁵. Presenta una incidencia creciente y una alta tasa de mortalidad a nivel mundial y en el Uruguay ^{8,136-138}. Un diagnóstico temprano y preciso del melanoma es determinante en la selección del tratamiento óptimo y en la supervivencia del paciente, ya que, en sus últimos estadios, el melanoma se mantiene relativamente resistente a los tratamientos disponibles en la actualidad. Sin embargo, todavía el diagnóstico de melanoma continúa siendo un desafío ^{13,55,57,77}.

Actualmente el diagnóstico de melanoma se basa en la morfología y en la biopsia de las lesiones observadas. La precisión del diagnóstico depende ampliamente de la experiencia del médico en el reconocimiento de las lesiones, existiendo reportes con considerable variación en la sensibilidad de detección, de 50 a 86%, siendo inversamente proporcional a la experiencia médica ^{139,140,82,141}. Técnicas empleadas para la evaluación preoperatoria como imagenología por resonancia magnética (MRI), ultrasonido de alta resolución (en EEUU) y tomografía computada (TC), han sido comparadas con la detección observacional del médico, la escisión y evaluación patológica, pero no se han encontrado beneficios significativos ^{142,143}.

Técnicas invasivas con agentes de imagenología no específicos para melanoma como ^{99m}Tc-coloides son usados en la determinación del estadio en melanoma primario en estudios de biopsia de ganglio linfático centinela ^{55,77-79}. Técnicas de imagenología no invasivas como la tomografía computada de emisión de fotón único (SPECT-CT) o tomografía de emisión de positrones (PET), son de extrema utilidad y ventaja en la detección, estadificación y seguimiento del melanoma primario o metastásico ^{55,77,144}. Utilizándose ^{99m}Tc-MIBI en SPECT-CT y la 2-¹⁸F-2-desoxi-D-glucosa (¹⁸FDG) en PET ^{80,145}. Sin embargo, ambos son agentes de imagenología no específicos para melanoma con un elevado porcentaje de falsos positivos (entre 15 -17 %) ¹⁴⁶. ¹⁸FDG es un análogo de la glucosa que es introducida en la célula por transporte activo, pero no puede ser degradado por las enzimas que metabolizan a la glucosa. La ¹⁸FDG se acumula en sitios donde los requerimientos energéticos son mayores, presentando limitaciones en cuanto a la especificidad. Dado que su acumulación en las células de melanoma se debe a un metabolismo celular aumentado, no es un biomarcador específico para melanoma, posibilitando los falsos positivos (ejemplo infecciones), así como también, a falsos negativos (células de melanoma que obtienen energía de fuentes diferentes a la glucosa) ^{144,147}.

Otros agentes de imagen para melanoma estudiados comprenden anticuerpos dirigidos contra antígenos relacionados al melanoma marcados con ^{99m}Tc , como los anticuerpos monoclonales: NR-ML-05¹⁴⁸, 9.2.2¹⁴⁹ y HMW-MAA¹⁵⁰. Sin embargo, los resultados clínicos obtenidos con estos anticuerpos no fueron favorables. Otros agentes estudiados comprenden las moléculas derivadas de benzamidas, las cuales se han marcado con ^{99m}Tc para SPECT-CT y con ^{18}F para PET^{151,152}. Las benzamidas se unen a la melanina, por lo cual se acumulan en los tumores de melanoma. Si bien esta familia de moléculas ha demostrado resultados prometedores como potenciales agentes de imagen de melanoma, presentan como desventaja una farmacocinética desfavorable con elevada captación hepática y limitada captación en tumores amelanóticos de melanoma^{151,152}.

Lo anteriormente expuesto potencia el desarrollo de nuevos radiofármacos de diagnóstico específicamente dirigidos contra blancos moleculares, lo cual resulta de vital importancia para caracterizar la naturaleza tumoral y seguimiento de la enfermedad, permitiendo nuevas y mejores estrategias terapéuticas así como la evaluación de las mismas^{97,153}. Los radiofármacos son sustancias químicas que contienen átomos radiactivos en su composición y que son adecuados para su administración en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos^{97,153}. En general, un radiofármaco consta de dos partes: la molécula vector a la que se une el radionucleido y que condiciona la ruta metabólica dentro del organismo y el radionucleido que emite radiación permitiendo la detección externa del radiofármaco^{97,153}.

Dado que muchos receptores se encuentran sobreexpresados en tumores, la estrategia de marcación de sus péptidos reguladores representa una alternativa atractiva para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Esta estrategia es muy utilizada en biotecnología farmacéutica para el desarrollo de radiofármacos específicos y selectivos. Así, numerosos péptidos marcados con diferentes radionucleidos (radiopéptidos) han sido desarrollados como agentes específicos y actualmente son usados de rutina en la clínica^{146,154–157}. El mejor ejemplo es el empleo de análogos de somatostatina radiomarcados en clínica para la visualización de tumores que sobreexpresan receptores de somatostatina^{155,158–160}. Los péptidos en comparación con otros agentes específicos utilizados como por ejemplo los anticuerpos, presentan algunas ventajas: menor antigenicidad, síntesis más sencilla, superior difusión en los tejidos, corta vida media biológica y fácil accesibilidad al órgano blanco¹⁵⁴.

El receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R) se encuentra involucrado en la pigmentación de la piel y es sobreexpresado en las células de melanoma murino y humano^{32,51}. MC1R pertenece a la familia de las proteínas transmembranas G y es internalizado luego de la unión de su ligando natural, la hormona alfa melanocito estimulante (α -MSH)^{15,24-28}. Esta hormona es un tridecapéptido lineal [Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂], donde la secuencia conservada [His-Phe-Arg-Trp] es la secuencia mínima necesaria para la actividad, garantizando una unión selectiva y de gran afinidad a MC1R^{31,51}. De esta forma, el sistema MC1R/ α -MSH es atractivo para el desarrollo de agentes de imagenología específicos para melanoma.

En las últimas tres décadas numerosos péptidos análogos de α -MSH han sido reportados en el estudio de búsqueda de agentes de imagen y tratamiento de melanoma^{51,146,161-164}. Los estudios de estructura-bioactividad han demostrado que la secuencia [His-Phe-Arg-Trp] es la responsable de la actividad y que pequeños cambios en esta como Met⁴ por Nle⁴ y Phe⁷ por D-Phe⁷, en el análogo lineal NDP, llevan a un potente aumento en la actividad¹⁶⁵. El análogo NDP es considerado hoy en día el estándar de referencia por su gran afinidad, con una IC₅₀= 0.21 nM¹⁶⁵. Mientras que la α -MSH natural presenta una IC₅₀ = 1.19 nM¹⁴⁶. Numerosos análogos de α -MSH han sido desarrollados con gran afinidad y especificidad por el receptor. Muchos de estos análogos presentan en su secuencia aminoácidos no naturales, como vía para aumentar la unión al receptor MC1R al disminuir la degradación *in vivo* por las enzimas proteasas y aumentar así la estabilidad *in vivo*^{51,146}. Dentro de los diferentes cambios estructurales estudiados, se ha observado que la ciclación de los péptidos análogos de α -MSH aumenta la estabilidad *in vivo*, la afinidad de la unión y selectividad por el receptor MC1R. Las estrategias de ciclación reportadas hasta el momento incluyen: análogo cíclico con enlace disulfuro intramolecular¹⁶⁶, análogo cíclico lactama con enlace amida intramolecular entre residuos Glu o Asp y Lys¹⁶⁷ y por coordinación a un átomo metálico¹⁶⁸. Dentro de los péptidos cíclicos, los que presentan un enlace disulfuro son los menos estudiados, dado que en comparación con un péptido cíclico mediante átomo metálico, el radiopéptido con enlace disulfuro presentó menor captación tumoral y peor perfil farmacocinético¹⁶⁹. De esta forma, tanto la ciclación por enlace lactama como por átomo metálico son estrategias prometedoras para el estudio de nuevos péptidos análogos de α -MSH. En el desarrollo de estos análogos de alfa-MSH, la ciclación se ha utilizado para mejorar la afinidad de unión al receptor MCR1, estabilidad *in vivo*, y la selectividad por el receptor.

En relación a la estrategia de ciclación por enlace lactama se han estudiado y descrito diferentes estrategias de marcación con ^{99m}Tc , utilizando ligandos bifuncionales diferentes y también utilizando diferentes espaciadores entre el *core* de coordinación con ^{99m}Tc y el anillo cíclico con la secuencia [His-Phe-Arg-Trp]. Se ha variado el tamaño del ciclo, observándose que al disminuir el tamaño de este de 12 a 6 aminoácidos la captación tumoral aumenta y disminuye la captación renal ¹⁷⁰. En la Tabla 2.1 se resumen algunos de los análogos descritos con sus propiedades de captación tumoral, renal y hepática. Respecto a los análogos cíclicos por coordinación a un átomo metálico, se encuentran descritos péptidos análogos de α -MSH ciclados por ^{99m}Tc (γ) ^{171,172}, ¹⁸⁸ Re (β^-) ¹⁶⁸ y Re (no radiactivo en estado de oxidación V) ^{169,173–175}, desarrollados para diagnóstico y terapia. De los desarrollados para diagnóstico se encuentran los ciclados mediante ^{99m}Tc directamente y los ciclados mediante Re(V). Los péptidos ciclados por coordinación a Re(V) se han descrito derivatizados con diferentes ligandos bifuncionales como DOTA ^{169,176,177}, CHX-A''-DTPA ¹⁷⁸, CBTE2A ¹⁷⁹ y tricarbonilo ($fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$) ¹⁷⁴, para marcación con diferentes radionucleidos para diagnóstico para imágenes SPECT (^{99m}Tc ^{171,172,174,175}, ¹¹¹In ^{169,172,173,175}) y PET (^{64}Cu ^{179,180}, ^{86}Y ^{178,180} y ^{68}Ga ^{178,181,182}). Si bien se han estudiado diferentes ligandos bifuncionales y radionucleidos, no se ha desarrollado aún un análogo ciclado por Re y marcado con ^{99m}Tc , con propiedades farmacocinéticas ideales. Para mejorar la captación tumoral y el perfil farmacocinético se han estudiado diferentes cambios en la secuencia aminoacídica de estos análogos de α -MSH. Inicialmente la coordinación al átomo metálico se realizó mediante coordinación de dos cisteínas ubicadas en posición 4 y 10 (Cys^{4,10}), sin embargo, luego se estudió la coordinación mediante tres cisteínas ubicadas en posición 3, 4 y 10 (Cys^{3,4,10}), observándose mayor estabilidad y captación tumoral ¹⁶⁸. Los análogos de α -MSH llamados CCMSH corresponden a la estructura (Cys^{3,4,10}, D-Phe⁷)– α -MSH₃₋₁₃ ¹⁶⁸. Otro de los cambios corresponde a la sustitución de Lys ¹¹ por Arg ¹¹, con esta sustitución se ha observado una disminución en la captación renal con un aumento en la captación tumoral, este análogo es llamado (Arg ¹¹)CCMSH, siendo ^{99m}Tc -(Arg ¹¹)CCMSH el ciclado por ^{99m}Tc y Re(Arg ¹¹)CCMSH el ciclado por Re. En este trabajo se procederá al estudio de un análogo Re(Arg ¹¹)CCMSH derivatizado con un ligando bifuncional tetraamino para su marcación con ^{99m}Tc . En la Tabla 2.1 se resumen algunos de los análogos descritos con sus propiedades de captación tumoral, renal y hepática.

Radiopéptidos	^{99m} Tc-core	%Act/g Tumor	%Act/g Riñón	%Act/g Hígado	Ref
Lactama					
^{99m} Tc(EDDA)-HYNIC-GGGNle-CycMSH _{hex}	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	9.78 ± 3.40	5.09 ± 2.19	0.26 ± 0.03	164
^{99m} Tc(EDDA)-HYNIC-GSGNle-CycMSH _{hex}	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	7.41 ± 4.26	3.90 ± 1.01	0.23 ± 0.01	164
^{99m} Tc(EDDA)-HYNIC-PEG ₂ Nle-CycMSH _{hex}	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	14.32 ± 2.82	5.79 ± 1.79	0.33 ± 0.03	164
^{99m} Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH _{hex}	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	22.3 ± 1.72	6.52 ± 1.04	0.81 ± 0.03	164
^{99m} Tc-MAG ₃ -GGNle-CycMSH _{hex}	[^{99m} TcO (MAG ₃) ⁻	4.64 ± 1.06	1.20 ± 0.51	1.18 ± 0.15	163
^{99m} Tc-AcCG ₃ -GGNle-CycMSH _{hex}	[^{99m} TcO (AcCG ₃) ⁻	9.76 ± 0.51	2.62 ± 0.45	1.69 ± 0.35	163
^{99m} Tc(CO) ₃ -HYNIC-GGNle-CycMSH _{hex}	[^{99m} Tc(CO) ₃ (HYNIC) (OH ₂) ⁺	5.84 ± 1.26	17.69 ± 4.06	38.11 ± 2.31	163
^{99m} Tc(EDDA)-HYNIC-GGNle-CycMSH _{hex}	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	14.14 ± 4.90	7.52 ± 0.96	0.52 ± 0.05	163
^{99m} Tc(CO) ₃ -pz-βAla-Nle-Cyc[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys]-NH ₂	[^{99m} Tc(CO) ₃ (Pz)] ⁺	9.26 ± 0.83 *	71.06 ± 6.44 *	42.19 ± 5.05 *	183
^{99m} Tc(EDDA)HYNIC-cyc-MSH	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA)	3.92 ± 2.07	2.10 ± 0.71	0.48 ± 0.20	184
^{99m} Tc(Tricina)HYNIC-cyc-MSH	^{99m} Tc-[HYNIC](Tricina) ₂	4.38 ± 1.02	2.52 ± 0.50	0.46 ± 0.15	184
^{99m} Tc(CO) ₃ -pz ³ -βAla-Nle-CycMSH _{hex}	[^{99m} Tc(CO) ₃ (Pz) ³] ⁺	11.82 ± 3.91 *	7.72 ± 1.33 *	2.96 ± 1.15 *	185
^{99m} Tc(CO) ₃ -pz ⁴ -βAla-Nle-CycMSH _{hex}	[^{99m} Tc(CO) ₃ (Pz) ⁴] ⁺	10.55 ± 1.83 *	2.98 ± 0.59 *	5.08 ± 0.12 *	185
^{99m} Tc(Tricina/EDDA)HYNIC-GABA-Nle-CycMSHhept	^{99m} Tc-[HYNIC](EDDA) (Tricina)	5.10 ± 0.08	4.58 ± 0.68	0.51 ± 0.07	186
Cicladados por átomo metálico					
^{99m} Tc-CCMSH	^{99m} Tc-Cys ^{3,4,10}	11.68 ± 1.55	8.85 ± 2.25	1.03 ± 0.37	171
^{99m} Tc-(Arg ¹¹)-CCMSH	^{99m} Tc-Cys ^{3,4,10}	14.03 ± 2.58 *	11.66 ± 1.44 *	1.59 ± 0.19 *	172
^{99m} Tc(CO) ₃ -(Ala-Triazol)Ac-Re(Arg ¹¹)CCMSH	[^{99m} Tc(OH ₂) ₃ (CO) ₃] ⁺	6.08 ± 1.06	12.53 ± 1.73	6.55 ± 0.68	174

Tabla 2.1: Datos *in vivo* de análogos cíclicos de α-MSH para SPECT marcados con ^{99m}Tc. Los %Act/g corresponden a t = 2 h p.i para todos los casos a excepción de * en los cuales %Act/g corresponden a t = 1 h p.i

Dentro de los radionucleidos emisores gamma empleados para imagenología SPECT, ^{99m}Tc presenta las propiedades ideales. ^{99m}Tc es un emisor gamma puro, con una energía de emisión gamma de 140 KeV, vida media de 6 horas, diversos estados de oxidación y amplia disponibilidad a bajo costo en diferentes clínicas de medicina nuclear a partir del de generadores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc^{95,98,99}. Estas características del ^{99m}Tc hacen posible preparar la dosis, administrarla al paciente y realizar la toma de imágenes en un tiempo razonable. La baja dosis de radiación

entregada al tejido biológico lo hace ideal para diagnóstico, siendo hoy en día ampliamente utilizado en la medicina nuclear ^{97,95}.

La conjugación de ^{99m}Tc con moléculas de interés biológico que permitan diagnosticar, ha sido de gran interés en los últimos años. El diseño de los radiofármacos con ^{99m}Tc requiere de nuevas estrategias de marcado que apunten al mantenimiento de la actividad biológica ya que esta puede verse enormemente afectada por la marcación. Dentro de las estrategias de marcado de biomoléculas con ^{99m}Tc podemos distinguir entre: marcado directo y marcado indirecto mediante el uso de ligandos o agentes bifuncionales (BFC) ^{97,95}. Este último consiste en la formación de un complejo biomolécula-BFC, que luego es marcado directamente con ^{99m}TcO₄⁻, en presencia de un agente reductor y un coligando. La elección del ligando bifuncional está determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radionucleido. En relación a los análogos de α-MSH se han descrito en la literatura el empleo de diferentes ligandos bifuncionales para la marcación con ^{99m}Tc: MAG₃ ¹⁶³, Cys-Gly-Gly-Gly ¹⁶³, (CO₃)-HYNIC ¹⁶³, (Tricina)₂-HYNIC ¹⁸⁴, (EDDA)-HYNIC ^{163,164,184}, (CO₃)-pZ¹ ^{183,187}, (CO₃)-pZ² ¹⁸⁵, (CO₃)-pZ³ ¹⁸⁵, (CO₃)-pZ⁴ ¹⁸⁵ y HYNIC-GABA¹⁸⁶.

En este proyecto nos planteamos estudiar el desempeño de tres ligandos bifuncionales N₄, N_{4II} y el grupo 6-hidrazinonicotinil (HYNIC) unidos mediante un enlace amida a los péptidos análogos de α-MSH. En este sentido, HYNIC es un derivado del sistema heterocíclico piridina, es ampliamente utilizado como BFC para preparar radiofármacos de ^{99m}Tc y diferentes biomoléculas como agentes de imagen en medicina nuclear. Las ventajas de utilizar HYNIC como BFC son su alta eficiencia de marcado y que las reacciones se pueden realizar con altas actividades específicas ^{97,95}. Por otro lado, un BFC basado en una estructura tetraamino (N₄) la cual exhibe una fácil complejación con Tc(v)O₂ formando especies monocationicas [O=^{99m}Tc=O]⁺ con una alta estabilidad *in vivo* y significativa propiedad hidrofílica, lo cual conduce a una favorable biodistribución del radiofármaco ¹⁸⁸. Este BFC ha sido utilizado previamente para la marcación con ^{99m}Tc de péptidos análogos de somatostatina, bombesina y minigastina en estudios preclínicos con animales y en estudios clínicos con humanos mostrando buena estabilidad *in vivo* y perfil de biodistribución ^{104,105,102,189}. Recientemente, otro BFC utilizado para la marcación con ^{99m}Tc es un derivado del cyclam (N_{4II}), con una estructura de tetraamino en un anillo cerrado el cual confiere gran estabilidad al radionucleido y buenas propiedades farmacocinéticas ¹⁰⁶.

En este contexto, dado que si bien han sido reportados numerosos péptidos análogos de α -MSH, todavía no existe un consenso del mejor radiopéptido para translación a la práctica clínica en medicina nuclear. De esta forma, en el presente trabajo nos planteamos estudiar las propiedades de cuatro péptidos en el diagnóstico de melanoma, empleando dos estrategias de ciclación (enlace lactama y átomo metálico), derivatizados con tres ligandos bifuncionales (N4, N4_{II} y HYNIC), para su marcación con ^{99m}Tc . Así, buscando mejorar la captación tumoral, se estudia el efecto de la introducción del ácido amino hexanóico (-Ahx-) como espaciador entre el *core* de ^{99m}Tc y la secuencia de reconocimiento al receptor en el análogo HYNIC-cyc-MSH₄₋₁₃ descrito por *García MF et. al*¹⁸⁴ obteniéndose el radiopéptido ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃. También se estudia el efecto del ligando bifuncional tetraamino derivado de cyclam (N4_{II}) en el péptido N4_{II} - Ahx-cycMSH₄₋₁₃. Péptidos análogos de α -MSH cíclicos mediante enlace lactama descritos por *Guo y Miao*^{163,164} presentan una estructura de cycMSH_{hex} sin el extremo C-terminal Gly-Pro-Val-NH₂. De esta forma en este trabajo en un intento de mejorar la captación tumoral al eliminar toda posibilidad de impedimento estérico sobre la secuencia de reconocimiento [His-Phe-Arg-Trp] se plantea estudiar el efecto de eliminar el extremo C-terminal Gly-Pro-Val-NH₂. Así se evalúa el péptido N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, empleándose el ligando tetraamino N4_{II} dada su estabilidad y perfil de biodistribución descrito en bibliografía. Como se mencionó anteriormente se han descrito en la bibliografía diferentes análogos ciclados con átomos metálicos para terapia y diagnóstico, sin embargo, poco se ha estudiado referente a la marcación de análogos Re(Arg¹¹)CCMSH con ^{99m}Tc . De esta forma, en este trabajo se plantea evaluar la marcación de Re(Arg¹¹)CCMSH con ^{99m}Tc , empleando el ligando bifuncional tetraamino N4 por su estabilidad y perfil de biodistribución previamente descrito en bibliografía.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar nuevas estrategias de marcación de péptidos análogos de la hormona α -melanocito estimulante (α -MSH) con ^{99m}Tc , utilizando un ligando bifuncional, para su aplicación como potencial radiofármaco de diagnóstico específico de melanoma. Ver Figura 3.1.

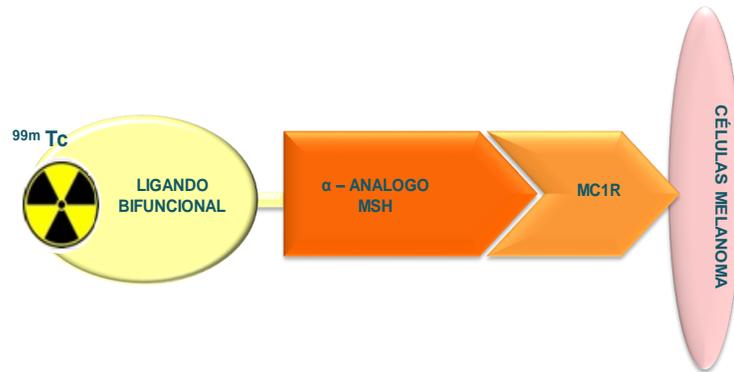


Figura 3.1: Representación de un análogo de α -MSH marcado con ^{99m}Tc unido específicamente al receptor MC1R en las células de melanoma

3.2. Objetivos específicos

1. Diseño y síntesis de ligandos bifuncionales tetraamino y HYNIC adecuadamente funcionalizados.
2. Síntesis de análogos cíclicos de α -MSH derivatizados con ligandos bifuncionales obtenidos en 1. Ver Figura 3.2.
3. Optimización de las condiciones de marcación con ^{99m}Tc de los conjugados obtenidos en 2.
4. Evaluación fisicoquímica de los productos radiomarcados obtenidos en el objetivo anterior.
5. Ensayo de unión, internalización y externalización en células de melanoma B16 F1 y B16 F10 (altamente metastásica) de los productos radiomarcados obtenidos en el objetivo 2.

- Estudios de biodistribución en ratones portadores de melanoma inducido por células B16 F1 de los productos radiomarcados obtenidos en el objetivo 2.
- Obtención de imágenes centellográficas y mirco SPECT-CT en modelo murino de los productos radiomarcados obtenidos en el objetivo 2 y su evaluación como potenciales agentes de diagnóstico.

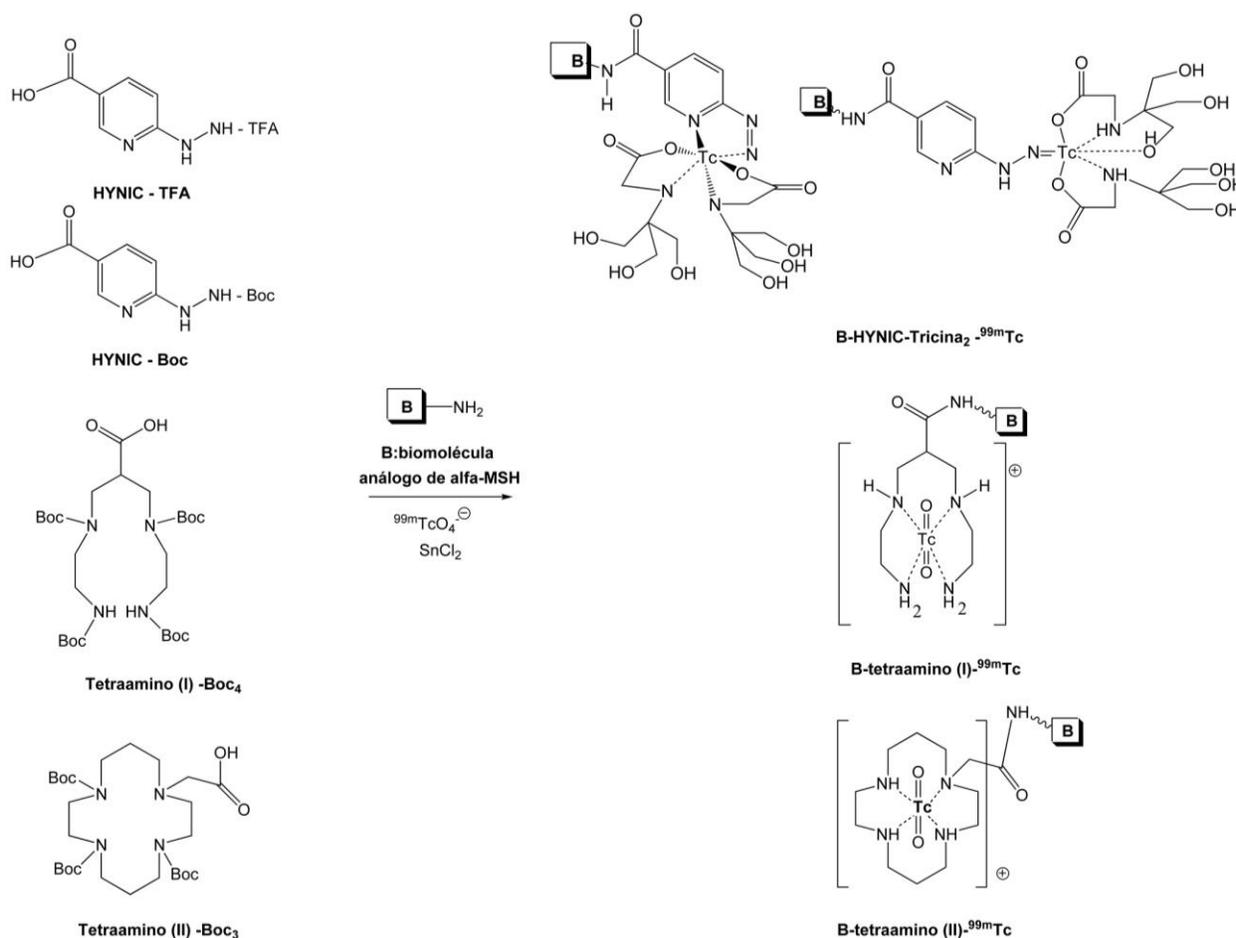


Figura 3.2: Estrategia de conjugación de los ligandos bifuncionales a las biomoléculas y marcación con ^{99m}Tc .

4. SÍNTESIS ORGÁNICA

4.1. Materiales y métodos

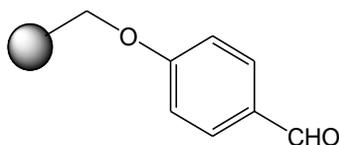
Consideraciones generales:

- Se utilizaron metodologías tradicionales en química orgánica y también metodologías de síntesis en fase sólida y calentamiento por energía microondas, lo que permite minimizar los tiempos de reacción y automatizar procedimientos.
- Los disolventes utilizados fueron comerciales de pureza mayor al 98 % o fueron purificados y secados por métodos convencionales.
- Se utilizaron reactivos comerciales: SIGMA-ALDRICH, MERCK, FLUKA, entre otros.
- Los experimentos con irradiación 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 20 mL. La temperatura fue controlada mediante una fibra óptica 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 IR se realizaron en un equipo SHIMADZU DR-8031.
- Los espectros de masas se realizaron 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.
- Los espectros de RMN se realizaron en un equipo BRUKER DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y tetrametilsilano (TMS) 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 completa caracterización se realiza con la combinación de experimentos HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), y COSY (CORrelated SpectroscopY).

- El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizó sílicagel 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. Se revelaron por alguno de los siguientes métodos:
 - exposición a la luz ultravioleta a 254nm
 - asperjado con reactivo de Brady (disolución de 2,4-dinitrofenilhidracina en EtOH).
 - exposición a vapores de yodo.
- Para las cromatografías en columnas (CC) se utilizó: sílicagel (SAI, 63-200 µm), sílica flash (SAI, 32-63 µm) o alúmina neutra (SAI, 50-200 µm).
- Para determinar el avance y pureza de las reacciones en fase sólida se realizó:
 - Desanclaje de los productos finales o intermedios de la resina de fase sólida mediante mezclas de TFA:DCM, en diferentes proporciones según el tipo de resina empleada, en agitación a temperatura ambiente por 1-2 h. CCF de la mezcla de reacción.
 - Obtención de espectro IR del producto anclado en su resina.
 - Reacciones colorimétricas de la resina en suspensión de DCM (por ejemplo con reactivo de Brady).
- En la síntesis con resinas de fase sólida para el cálculo de las cargas teóricas se utilizó la siguiente fórmula:
 - Nueva carga =
$$\frac{\text{carga vieja de la resina}}{1 + ((\text{carga vieja} \times \text{PM ganado}) / 1000)}$$
.

4.1.1. Síntesis de resina de Wang

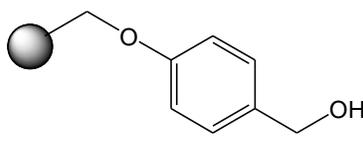
Resina de Merrifield derivatizada con *p*-hidroxibenzaldehído (1): en un balón seco se coloca la resina de Merrifield (0.25 g, 1.0 mmol, carga de resina 4 mmol/g), se adiciona 2 mL de DMF seca y se deja 10 minutos con agitación orbital suave en un shaker para permitir el hinchamiento. En otro balón se prepara una mezcla de NaH (0.12 g, 3 mmol, pureza 60%), *p*-hidroxibenzaldehído (0.37 g, 3 mmol) en 5 mL de DMF seca. Esta mezcla se adiciona al balón de la resina lentamente con cuentagota y se deja en reacción 24 h a temperatura ambiente. Luego de 24 h la resina se filtra a vacío y se lava con 3 ciclos de: H₂O/ MeOH (metanol) / THF (tetrahidrofurano) / H₂O: THF (2: 1)/ H₂O/ THF/ MeOH (6 mL de cada disolvente), el lavado final se realiza con 5 mL de éter etílico anhidro. La resina obtenida se deja secar en desecador por 24 h. Se obtienen 0.244 g de la resina 1, nueva carga de resina 2.98 mmol/g, R= 73 %.



Reacción Brady: positiva. **IR** (KBr): 1686 cm⁻¹ (característico grupo aldehído)

Resina de Merrifield derivatizada con *p*-hidroxibenzaldehído (2): en un reactor de microondas de teflón se coloca la resina de Merrifield (0.25 g, 1.0 mmol, carga de resina 4 mmol/g), se adiciona 3 mL de DMF seca y se deja 10 minutos con agitación orbital suave en un shaker para permitir el hinchamiento. En un balón se prepara una mezcla de *p*-hidroxibenzaldehído (0.25 g, 2 mmol), *t*-BuOH (0.152 g, 2 mmol) en 3 mL de DMF seca. Esta mezcla se adiciona lentamente al reactor de teflón con la resina. El reactor se cierra herméticamente y se calienta en el microondas durante 10 minutos, potencia 100 W con una temperatura final de 105 °C y presión máxima de 5 atm. Luego el reactor con la mezcla se enfría en baño de hielo y la resina se filtra a vacío y lava con 3 ciclos de 6 mL de la mezcla H₂O: EtOH (1: 1). El lavado final se realiza con 5 mL de éter etílico anhidro. La resina obtenida se deja secar en desecador por 24 h. Se obtuvieron 0.278 g de la resina 2, nueva carga de resina 2.98 mmol/g, R= 83 %.

Resina de Wang (3): en un balón seco se coloca la resina de Merrifield derivatizada con *p*-hidroxibenzaldehído (**1** ó **2**) (0.2 g, 0.6 mmol, carga de resina 2.98 mmol/g), se adiciona 2 mL de THF seco, 1 mL EtOH absoluto y *N*-metilmorfolina (NMM) y se deja 10 minutos con agitación orbital suave en un shaker a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se agrega NaBH₄ (0.09 g, 2.4 mmol) y se deja en agitación orbital a temperatura ambiente. Luego de 24 h la resina se filtra a vacío y se lava con 3 ciclos de: H₂O/ MeOH/ THF/ THF/ MeOH (5 mL de cada disolvente), el lavado final se realiza con 5 mL de éter etílico anhidro. La resina obtenida se deja secar en desecador por 24 h. Se obtuvieron 0.18 g de la resina 3, nueva carga de resina 2.96 mmol/g, R= 89 %.

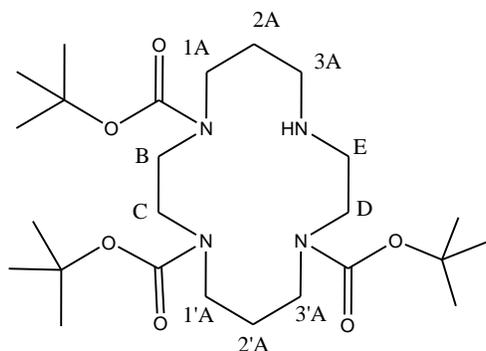


Wang

Reacción Brady: negativa. **IR** (KBr): 3430 cm⁻¹ (característico grupo alcohol)

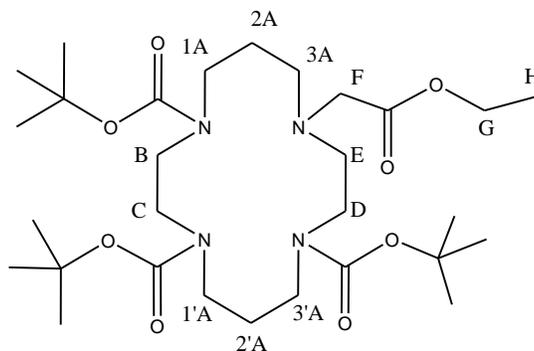
4.1.2. Síntesis de ligando bifuncional tetraamino (**II**)

Cyclam-(Boc)₃ (4): Se disuelve dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc₂O) (1.2 g, 5.7 mmol, pureza 97 %) en 6 mL de DCM seco. A esta disolución se le añade Cyclam (0.52 g, 2.5 mmol, pureza 98 %). Al momento de agregar el Cyclam se liberan burbujas de gas. Se deja la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. El avance de la reacción se controla por CCF de SiO₂, diclorometano : metanol (9:1), revelado en cámara de iodo. Luego se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica por CC (sílica flash, diclorometano : metanol, 95:5). Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose el compuesto **4** (0.4509 g, R= 36%).



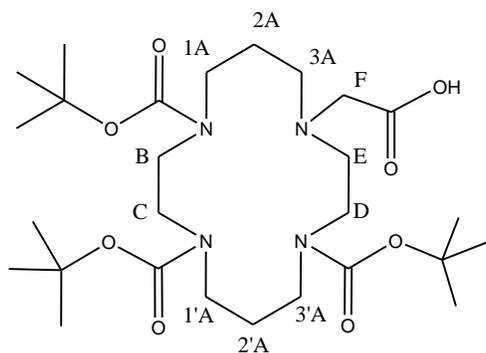
^1H RMN (400 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 1.47 (m, 27H, CH_3), 1.71 (m, 2H, H2A), 1.94 (m, 2H, H2'A), 2.65 (t, 2H, $J = 8.8$ Hz, H3A), 2.81 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, HE), 3.30 – 3.40 (m, 12 H, H1A, HB, HC, H1'A, H3'A, HD).

Cyclam-(Boc) $_3$ -EA (5): El compuesto **4** (0.2 g, 0.4 moles) se disuelve en 2 mL de DMF. 2-Bromoacetato de etilo (0.04 mL, $d = 0.9$ g/mL) y K_2CO_3 (0.06 g, 0.6 moles) se agregan a la disolución. La mezcla se deja en agitación bajo atmósfera de nitrógeno a 80 – 85 °C durante 16 h. El avance de la reacción se controla por CCF de SiO_2 , diclorometano : metanol (9:1), revelado en cámara de iodo. Luego se filtra y lava con tolueno tres veces. Al filtrado obtenido, se le evapora el remanente de DMF por evaporación a vacío con volúmenes de tolueno. El crudo obtenido es purificado por CC (sílica flash, diclorometano : metanol, 95:5). Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose el compuesto **5** (0.1080 g, $R = 51$ %).



^1H RMN (400 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 1.28 (m, 3H, HH), 1.42 (m, 27H, CH_3), 1.67 (m, 2H, 2A), 1.80 (m, 2H, H2'A), 2.47 (m, 2H, H3A), 2.75 (m, 2H, HE), 2.90 (s, 2H, HF), 3.05 – 3.35 (m, 12H, H1A, HB, HC, H1'A, H3'A, HD), 4.03 (m, 2H, HG). **IE-EM**, m/z : 587.40 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

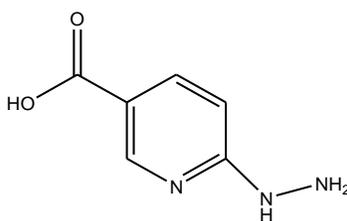
Cyclam-(Boc)3-OH (6): El compuesto **5** (0.1 g, 0.17 moles) se disuelve en 10 mL de MeOH y se agrega NaOH (0.3 mL de una disolución acuosa 1 M) para la hidrólisis. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 2 h. El avance de la reacción se controla por CCF de SiO₂, diclorometano : metanol (9:1), revelado en cámara de iodo. El MeOH se evapora a presión reducida. A la capa acuosa remanente se le ajusta el pH a 6.0 con disolución acuosa de HCl 1M y se extrae con acetato de etilo (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose el compuesto **6** (0.71 g, R = 75 %) sin realizarse otra purificación.



¹H RMN (400 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 1.49 (m, 27H, CH₃), 1.76 (m, 2H, H₂A), 1.88 (m, 2H, H₂'A), 2.62 (m, 2H, H₃A), 2.75 (m, 2H, H_E), 3.27 (m, 2H, H_F), 3.38 (m, 12H, H₁A, H_B, H_C, H₁'A, H₃'A, H_D), 4.03 (m, 2H, H_G). **HSQC** (400 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 27 (C₂A), 28.5 (C-H₃) 29 (C₂'A), 48 (C₁A, C₁'A, C₃'A, C_B, C_C, C_D), 53.5 (C₃A), 55 (C_E), 58.5 (C_F). **HMBC** (400 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 80 (C-(CH₃)₃), 157.1 (C-COOC(CH₃)₃), 172.9 (C-COOH). **IE-EM**, m/z : 558.35 (M⁺). **ESI-EM** m/z : 559.8 (M⁺ + H).

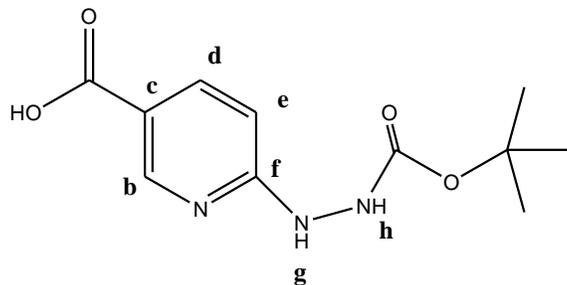
4.1.3. Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-Boc

Ácido 6-hidrazinil nicotínico (HYNIC) (7): En un reactor de microondas de teflón se coloca una mezcla de ácido 6-cloronicotínico (2.0 g, 16 mmol, pureza 99 %) , monohidrato de hidrazina (3.2 g, 64 mmol, pureza 50–60 %) y H₂O destilada (6.4 mL). El reactor se cierra herméticamente y se calienta a 160 °C durante 5 minutos, potencia 300 W, presión máxima 5 atm. Luego el reactor con la mezcla se enfría en baño de hielo. A la mezcla obtenida (de un color violeta) se le ajusta el pH a 5.5 con el agregado lento de HCl (c). El precipitado obtenido se filtra a vacío y se lava con EtOH y éter etílico anhidro y se coloca en un desecador durante 24 h. Se obtiene 1.87 g (R = 75 %) de un sólido color amarillo pálido. No se realizan otros pasos de purificación.



¹H RMN (DMSO-*d*₆) 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-*d*₆) (ppm): 105.87 (C-5), 114.94 (C-3), 139.07 (C-4), 151.09 (C-2), 160.61 (C-6), 167.26 (COOH).

Ácido 6-(*t*-butoxicarbonilhidrazino)nicotínico (HYNIC-Boc) (8): El compuesto **7** (0.15 g, 0.98 mmol) se disuelve en 5 mL de EtOH y se añade dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.22 g, 0.98 mmol). La mezcla se deja con agitación magnética a 35 – 40 °C durante 2 h. El avance de la reacción se controla por CCF de SiO₂, éter de petróleo: acetato de etilo (3:7), revelado UV. A las 2 h se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica por CC (sílica flash, CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose 86 mg (R = 35 %).



^1H RMN (Acetona- d_6) δ (ppm): 1.45 (s, 9H, CH₃), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-e), 8.10 (dd, J_1 = 2Hz, J_2 = 8.8Hz, 1H, H-d), 8.73 (d, J = 2Hz, 1H, H-b). **HSQC** (Acetona- d_6) δ (ppm): 27.7 (CH₃), 105.6 (C-e), 139.4 (C-d), 151.1(C-b). **HMBC** (Acetona- d_6) δ (ppm): 79.5 (C-(CH₃)₃), 117.1 (C-c), 165.7 (C-f). **PF**: 274-276 °C.

Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (9): El compuesto **7** (0.15 g, 0.98 mmol) se disuelve en 5 mL de H₂O y se añade dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.22 g, 0.98 mmol). La mezcla se deja con agitación magnética a 35 – 40 °C durante 2 h. Para el seguimiento del avance de la reacción se procede igual que para el compuesto **8**. A la fase acuosa se le ajusta el pH a 6.0 y se extrae con acetato de etilo (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CC (sílica flash, CH₂Cl₂ : MeOH, 9:1). Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose 102 mg (R = 41 %).

Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (10): El compuesto **7** (0.15 g, 0.98 mmol) se disuelve en 5 mL de EtOH y se añade dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.22 g, 0.98 mmol) y urea (10 % mmol respecto a **7**). La mezcla se deja con agitación magnética a 35 – 40 °C durante 3 h y luego 8 h a temperatura ambiente. Para el seguimiento del avance de la reacción y purificación se procede igual que para el compuesto **8**, obteniéndose 74 mg (R = 30 %).

Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (11): El compuesto **7** (0.15 g, 0.98 mmol) se disuelve en 1 mL de una disolución acuosa de LiBr (2.5 M) y se añade dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.22 g, 0.98 mmol). La mezcla se agita magnéticamente a temperatura ambiente durante 24 h, luego 2 h a 50°C y 24 h más a temperatura ambiente. Para el seguimiento del avance de la reacción se procede igual que para el compuesto **8**. El crudo obtenido se filtra a vacío, se lava con agua. A la fase acuosa obtenida en el filtrado se le ajusta el pH a 6.0

y se extrae con acetato de etilo (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CC (sílica flash, CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). Se coloca en un desecador durante 24 h, obteniéndose 31 mg (R = 13 %).

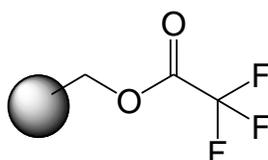
Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (12): El compuesto **7** (0.15 g, 0.98 mmol) se disuelve en 1 mL de H₂O y se añade dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.22 g, 0.98 mmol) y NaOH (0.035 g, 0.88 mmol). La mezcla se agita a 50 °C durante 1 h. Luego se completan las 24 h a temperatura ambiente. Para el seguimiento del avance de la reacción y purificación se procede igual que para el compuesto **11**, obteniéndose 51 mg (R = 21 %).

Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (13): En un reactor de microondas de teflón se coloca una mezcla del compuesto **7** (0.25 g, 1.6 mmol), H₂O (4 mL), *t*-BuOH (4 mL) y NaOH (81 mg, 2.0 mmol). La mezcla se agita en shaker 15 minutos y luego se adiciona dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.36 g, 1.6 mmol). El reactor se cierra herméticamente y se calienta en el microondas durante 5 minutos, potencia 100 W, temperatura máxima alcanzada 120 °C y presión máxima 5 atm. Luego el reactor con la mezcla se enfría en baño de hielo y se controla el avance de la reacción por CCF de SiO₂, éter de petróleo : acetato de etilo (3:7), revelado UV. Se evapora el *t*-BuOH a presión reducida a 40 °C, se ajusta el pH a 6.0 con HCl (c) y se realizan extracciones a la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 15 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. El crudo se purifica por CC (sílica flash, CH₂Cl₂ : MeOH, 9:1), obteniéndose 223 mg (R = 55 %).

Ácido 6-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazinil)nicotínico (HYNIC-Boc) (14): En un balón seco se coloca una mezcla del compuesto **7** (0.5g, 3.3 mmol), H₂O (9 mL), *t*-BuOH (6mL) y NaOH (0.16 g, 3.99 mmol). La mezcla se agita magnéticamente durante 15 minutos y luego se adiciona dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.73 g, 3.3 mmol). El avance de la reacción se controla por CCF de SiO₂, éter de petróleo : acetato de etilo (3:7), revelado UV. La mezcla en reacción se deja con agitación magnética por 24 h a temperatura ambiente. Para la purificación se procede igual que para el compuesto **13**, obteniéndose 348 mg (R = 42 %).

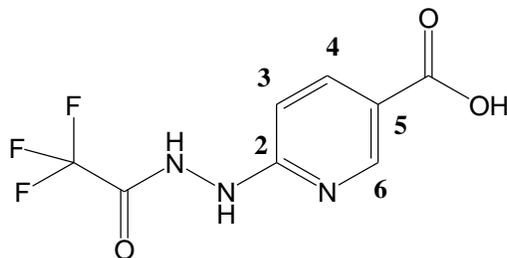
4.1.4. Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-TFA

Resina de Wang derivatizada con trifluoroacetilo (15): En un balón seco en baño de hielo (0 °C) con atmósfera de nitrógeno se colocan 5 mL de dioxano seco, resina de Wang (0.5 g, 0.63 mmol, carga 1.25 mmol/g) se agita orbitalmente en shaker durante 5 minutos para hinchamiento de la resina. Luego se agrega anhídrido trifluoroacético (0.18 mL, 1.3 mmol) y se agita orbitalmente en baño de hielo durante 30 minutos, luego hasta completar 24 h a temperatura ambiente. Luego la resina se filtra a vacío y se lava con ciclos (6 mL de cada disolvente): dioxano seco/ EtOH anhidro o/ THF anhidro/éter etílico anhidro. Se toma 1 mL de las aguas madres de filtración y se le realizan extracciones con H₂O para controlar el pH. Los lavados se continúan hasta que el pH sea 7. El lavado final se realiza con 5 mL de éter etílico anhidro. La resina obtenida se deja secar en desecador por 24 h. Se obtienen 0.54 g de la resina **15**, nueva carga de resina 1.12 mmol/g, R = 96 %.



IR(KBr): 1760 cm⁻¹ (carbonilo), 1170 cm⁻¹ (C-F)

Ácido 6-(2-trifluoroacetilhidrazinil)nicotínico (HYNIC-TFA) (16): En un balón seco coloca la resina de Wang derivatizada con trifluoroacetilo (**15**) (0.79 g, 0.78 mmol, carga 1.12 mmol/g), se adicionan 5 mL de MeOH y se agita orbitalmente durante 5 minutos para favorecer el hinchamiento de la resina. Se agrega HYNIC (**7**, 60 mg, 0.39 mmol), trietilamina (0.054 mL, 0.39 mmol), 10 mL de MeOH y se deja en agitación orbital durante 48 h. Se controla por CCF de SiO₂, CH₂Cl₂ : MeOH (9:1), revelado UV. Luego de 48 h se neutraliza con ácido acético glacial (aproximadamente 0.22 mL) y se filtra a vacío lavando con 3 ciclos de 5 mL de cada disolvente de MeOH/CH₂Cl₂. El filtrado se destila a presión reducida, el crudo obtenido se disuelve en H₂O, se ajusta el pH a 7.0 y se realizan extracciones de la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na₂SO₄ y el disolvente se destila a presión reducida. No se realizan otros pasos de purificación, obteniéndose 29 mg del compuesto **16**, R= 30 %.



$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm): 7.14 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-3), 8.14 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-4), 8.65 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm): 107.0 (C-3), 118.0 (C-F₃), 127.3 (C-5), 139.6 (C-4), 148.6 (C-6), 157.0 (C-2), 167.6 (COOH), 168.3 (COCF_3). **IE-EM**, m/z : 249.04 (M^+). **PF**: 114.3-115.8 °C.

Ácido 6-(2-trifluoroacetilhidrazinil)nicotínico (HYNIC-TFA) (17): En un reactor de microondas de teflón se coloca la resina de Wang derivatizada con trifluoroacetilo (**15**) (0.25 g, 0.25 mmol, carga 1.12 mmol/g), se adicionan 3 mL de DMF seca y se agita orbitalmente durante 5 minutos para favorecer el hinchamiento de la resina. En un balón se disuelve HYNIC (**7**, 26 mg, 0.17 mmol) y trietilamina (0.023 mL, 0.17 mmol) en 4 mL de DMF. Esta mezcla se agrega al reactor con la resina, se cierra herméticamente el reactor y se calienta en microondas durante 10 minutos a 150 °C, 300 W, presión máxima 3 atm. Se controla la reacción neutralizando una alícuota del crudo en 1 mL de H_2O y realizando extracciones de la fase acuosa en acetato de etilo. Alícuotas de la fase orgánica se controlan por CCF de SiO_2 , CH_2Cl_2 : MeOH (9:1), revelado UV. La mezcla en el reactor se neutraliza con ácido acético glacial y se filtra, lavando con MeOH y DMF. Se reducen los disolventes del filtrado mediante evaporación a presión reducida agregando tolueno para co-destilar la DMF. El crudo se disuelve en H_2O (40 mL) se ajusta el pH a 7 y se realizan extracciones de la fase acuosa con 4 x 10 mL de éter de petróleo. Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na_2SO_4 y el disolvente se destila a presión reducida. No se realizan otros pasos de purificación. Se realiza $^1\text{H RMN}$ y se comprueba gran cantidad de productos secundarios e impurezas, con un rendimiento final < 10 %.

Ácido 6-(2-trifluoroacetilhidrazinil)nicotínico (HYNIC-TFA) (18): Se procede igual que para el compuesto **17** sin calentamiento de microondas, dejando la mezcla a temperatura ambiente

durante 48 h. Al igual que con **17** se obtiene el producto final con $R < 10 \%$ y gran cantidad de productos secundarios e impurezas.

Ácido 6-(2-trifluoroacetilhidrazinil)nicotínico (HYNIC-TFA) (19): En un reactor de microondas de teflón se coloca la resina de Wang derivatizada con trifluoroacetilo (**15**) (0.25 g, 0.25 mmol, carga 1.12 mmol/g), se adicionan 3 mL de dioxano seco y se agita orbitalmente durante 5 minutos para favorecer el hinchamiento de la resina. En un balón se disuelve en 3 mL de dioxano, HYNIC (**9**, 21 mg, 0.12 mmol) y trietilamina (0.020 mL, 0.12 mmol). Esta mezcla se adiciona al reactor, se lo cierra herméticamente y se calienta en microondas a 100 °C, 10 minutos, potencia 300 W, presión máxima 5 atm. Luego el reactor con la mezcla se enfría en baño de hielo y se filtra a vacío y lava con el procedimiento descrito para **15**. Para la purificación se procede igual que para el compuesto **16**, obteniéndose 10 mg, $R = 15 \%$.

Ácido 6-(2-trifluoroacetilhidrazinil)nicotínico (HYNIC-TFA) (20): En un balón seco se disuelven en 2 mL de DMF seca, HYNIC (**7**, 0.1 g, 0.65 mmol) y anhídrido trifluoroacético (0.1 mL, 0.72 mmol). La mezcla se deja en agitación magnética durante 2 h a temperatura ambiente. Se controla el avance por CCF de SiO_2 , CH_2Cl_2 : MeOH (9:1), revelado UV, con previo mini work-up de extracción H_2O : AcEot. Luego de 2 h la DMF y el TFA formado se destilan a presión reducida con adiciones de pequeños volúmenes de tolueno. El crudo se disuelve en H_2O (25 mL) se ajusta el pH a 7 y se realizan extracciones de la fase acuosa con 4 x 10 mL de éter de petróleo. Las fases orgánicas se juntan, se secan con Na_2SO_4 y el disolvente se destila a presión reducida. Finalmente se purifica por cromatografía en columna (sílica flash, acetato de etilo), obteniéndose 98 mg del compuesto **20**, $R = 60 \%$.

4.1.5. Síntesis de péptidos análogos de α -MSH

Consideraciones generales

- En este trabajo se evaluaron los siguientes péptidos cíclicos análogos de α -MSH marcados con ^{99m}Tc : $\text{N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$, $\text{N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $\text{HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ (obtenido empleando HYNIC-Boc), $\text{TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-1}$, $\text{N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$. También se estudió el péptido $\text{ICG-Ahx-AhxRe(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ derivatizado con la sustancia fluorescente verde de indocianina (ICG).
- La síntesis y caracterización de los péptidos análogos de α -MSH se llevó a cabo en el Laboratorio del Dr. Fabio Gallazzi, Structural Biology Core, University of Missouri, Columbia (USA) según la metodología de síntesis en fase sólida previamente descrita en la literatura ^{174,184}.
- Todos los reactivos empleados en la síntesis de los péptidos fueron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).
- La síntesis de los péptidos fue realizada empleando metodología de síntesis en fase sólida en un múltiple sintetizador automático de péptidos modelo Apex 396.
- Se utilizó la metodología de síntesis en fase sólida empleando α -aminoácidos *N*-protegidos con el grupo Fmoc para la obtención de péptidos-amidas. La desprotección de los grupos protectores Fmoc de los aminoácidos se realizó con piperidina y el desanclaje final de la resina se realizó con TFA. Como agente acoplante se utilizó HBTU. Como agente antioxidante se utilizó el “Reactivo K”: TFA/tioanisol (TIS)/ H_2O /fenol/1,2-etanoditiol (EDT) (82.5:5:5:5:2.5 v/v).
- Se trabajó con una escala de 75 μmol de péptido, partiendo de 120 mg de resina (carga de 0,75 mmol/g), empleándose los aminoácidos en un exceso de 3 equivalentes la carga de la resina.
- El anclaje del primer aminoácido y la elongación del intermedio lineal consistió en ciclos repetitivos de desprotección de grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos. Cada ciclo consiste de las siguientes etapas:
 1. Lavado de resina con *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) (x 10).

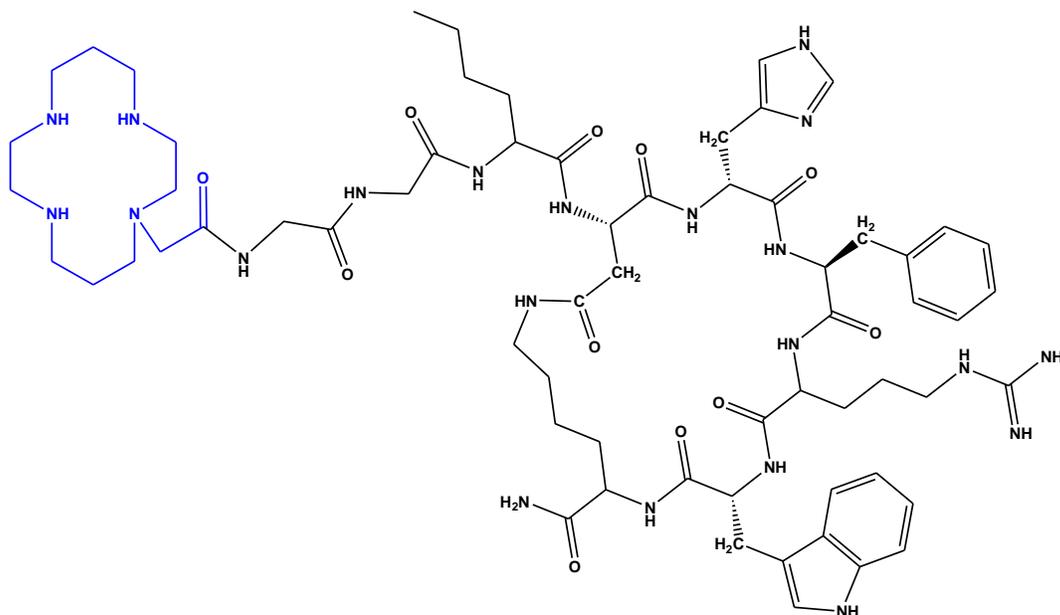
2. Desprotección del grupo Fmoc: el Fmoc-péptido-resina se trata por 3 minutos con 2 mL de piperidina al 25 % en DMF. Se filtran los disolventes y se repite 4 veces el tratamiento con piperidina. Se lava con DMF.
 3. Lavado pre-acoplamiento: se lava con 2 mL de NMP (x 4).
 4. Acoplamiento:
 - Se lava la resina con NMP (200 μ L)
 - Se adicionan 6 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) de la carga de la resina (570 μ L de disolución 0.8 M en NMP).
 - Se adicionan 3 equivalentes de Fmoc-aminoácido disuelto en HOBt (750 μ L de disolución 0.3 M en HOBt 0.3M).
 - Se adiciona 2.7 equivalentes de HBTU (510 μ L de disolución 0.4 M en DMF).
 - Se deja en agitación por 20 minutos.
 - Se filtra y lava con NMP (1 min).
 - Se repite el acoplamiento sin lavado final.
 5. Capping:
 - Se agrega NMP (200 μ L), DIPEA (750 μ L de disolución 15 % en NMP) y anhídrido acético (750 μ L de disolución 10 % en NMP).
 - Se agita por 10 minutos.
 - Se filtra y lava con NMP (x 2).
- El seguimiento y caracterización de los productos intermedios y finales se realizó empleando la metodología de HPLC-MS de fase reversa, con previo desanclaje de los productos de la fase sólida. Las condiciones de la metodología de HPLC-MS fueron:
 - Condiciones HPLC: Equipo HPLC Beckam-Coulter-System-Gold. La fase móvil empleada fue: 0.1 % TFA en H₂O(A): 0.1 % TFA acetonitrilo (B). Se utilizó un gradiente de fase B 10 % a 50 % en 30 minutos. El flujo empleado fue de 1 mL/min. El detector UV con $\lambda_1=214$ nm y $\lambda_2=280$ nm. La columna fue una C18 de 150 x 4.6 mm, 5 μ m de diámetro de partícula, marca Thermo Scientific. El volumen de inyección: 10 μ L de péptido en disolución de H₂O : acetonitrilo (30:70).
 - Condiciones espectrómetro de masas: Equipo: LCQ Fleet™ Ion Trap Mass Spectrometer. El método de ionización empleado fue electrospray (ESI).

- La purificación de los crudos de los péptidos obtenidos se realizó empleando la metodología HPLC fase reversa preparativo. Condiciones HPLC:
 - Equipo HPLC Beckam-Coulter-System-Gold. La fase móvil empleada fue: 0.1 % TFA en H₂O(A): 0.1 % TFA acetonitrilo (B). Se utilizó un gradiente de fase B de 15 % a 35 % en 40 minutos. El flujo empleado fue de 10 mL/min. El detector UV con $\lambda_1=225$ nm y $\lambda_2=280$ nm. La columna fue una C18, 6 μ m, 60Å, marca Waters_Prep Nova Pak ®. Volumen de inyección: 5-10 μ L del crudo de péptido en una disolución de H₂O : acetonitrilo (30:70).

Se detalla a continuación la síntesis de los péptidos N₄_{II}-cycMSH₄₋₁₀ y N₄_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ llevada a cabo en el marco de una beca de movilidad ANII (MOV-CA-2013-1-10984) en Laboratorio del Dr. Fabio Gallazzi, Structural Biology Core, University of Missouri, Columbia (USA).

Síntesis del péptido LBII-GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂ (21): En los pocillos del múltiple sintetizador automático de péptidos se coloca resina de Rink (120 mg, carga 0.75 mmol/g), LBII (3 eq., 0.225 mmol, 126 mg) en 1.5 mL de NMP, HBTU (2.7 eq., 0.2 mmol, 77 mg en 3 mL NMP), DIPEA (6 eq., 0.45 mmol, 58 mg), piperidina al 25 % en DMF y los Fmoc- α -N-aminoácidos en disolución HOBt (0.3M en NMP). Fmoc- α -N-aminoácidos: Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 146 mg), Fmoc-Gly-OH (6 eq., 0.45 mmol, 138 mg), Fmoc-His(Trt)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 139 mg), Fmoc-Trp(Boc)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 118 mg), Fmoc-Nle-OH (3 eq., 0.225 mmol, 80 mg), Fmoc-Asp(O-2-PhiPr)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 107 mg), Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 141 mg), Fmoc-D-Phe-OH(3 eq., 0.225 mmol, 87 mg). El sintetizador automático de péptidos se programa y se comienza con los ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos, obteniéndose el precursor lineal: Fmoc-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-Resina Rink. Luego se procede a la ciclación del precursor lineal. Para ello inicialmente se realiza la desprotección de Asp(O-2-PhiPr)-OH y Lys(Mtt): i) se lava la resina con NMP/CH₂Cl₂ (x 5, 5 mL), ii) se adiciona TFA (3 %) y TIS (5 %) en CH₂Cl₂ y se deja en agitación por 90 minutos a temperatura ambiente. Luego se realiza la ciclación: i) se lava la resina con NMP/CH₂Cl₂ (x 5, 5 mL), ii) se neutraliza el ácido con DIPEA (5 mL disolución 10 % en NMP), iii) se adiciona PyBOP (6 eq., 0.45 mmol, 234 mg), DIPEA (15 eq., 1.125 mmol, 200 μ L), DMF (5 mL) y se deja durante 12 h a temperatura

ambiente con agitación. Luego se lava con DMF/NMP. Se continúa la elongación del péptido mediante ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos. Obteniéndose el precursor Boc-LBII-GG-Nle-cyc[Asp-His-DPhe-Arg-Trp(Boc)-Lys]-Resina Rink. Finalmente se realiza el desanclaje y desprotección final en la condición de 87.5 % TFA en 5 mL de CH₂Cl₂ con 2.5 % de la mezcla de antioxidantes del Reactivo K, durante 1.5 h de agitación a temperatura ambiente. Se lava la resina con 3 mL DCM y las aguas de lavado son neutralizadas con piperidina 10 % en MeOH. Se evapora el MeOH y DCM hasta 2 mL, se adiciona éter etílico para formar un precipitado, el precipitado se centrifuga por 5 minutos y se resuspende en acetonitrilo : H₂O (70:30) y se purifica por HPLC fase reversa preparativo. El purificado es liofilizado. El avance de la reacción se controla por HPL-MS con previo desanclaje de alícuotas de resina para los fragmentos: Fmoc-Nle-Asp-H-dPhe-RW-Lys-CONH₂, Fmoc-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂, GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂ y LBII-GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂. El producto final se caracterizó por HPLC-MS de fase reversa obteniéndose (**21**) 3.5 mg, R = 5 %.

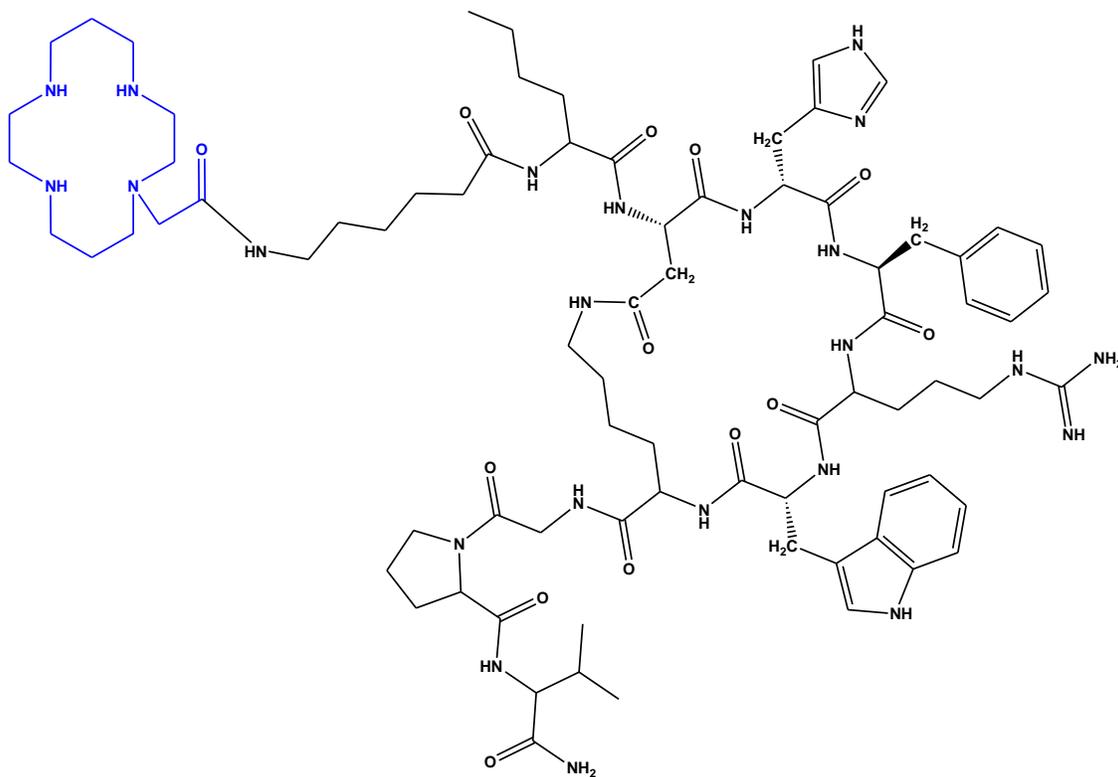


(21)

LBII-GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂ **ESI-MS** m/z : 1337.16 ($M^+ + H$)

Síntesis del péptido LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂ (22): En los pocillos del múltiple sintetizador automático de péptidos se coloca resina de Sieber (120 mg, carga 0.75 mmol/g), LBII (3 eq., 0.225 mmol, 126 mg) en 1.5 mL de NMP, ácido 6-aminohexanoico (Ahx) (3 eq., 0.225 mmol, 79 mg), HBTU (2,7 eq., 0.2 mmol, 77 mg en 3 mL NMP), DIPEA (6 eq., 0.45 mmol, 58 mg), piperidina al 25 % en DMF y los Fmoc- α -N-aminoácidos en disolución HOBt (0.3 M en NMP). Fmoc- α -N-aminoácidos: Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 146 mg), Fmoc-Gly-OH (3 eq., 0.225 mmol, 67 mg), Fmoc-His(Trt)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 139 mg), Fmoc-Pro-OH (3 eq., 0.225 mmol, 76 mg), Fmoc-Trp(Boc)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 118 mg), Fmoc-Val-OH (3 eq., 0.225 mmol, 76 mg), Fmoc-Nle-OH (3 eq., 0.225 mmol, 80 mg), Fmoc-Asp(O-2-PhiPr)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 107 mg), Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq., 0.225 mmol, 141 mg), Fmoc-D-Phe-OH(3 eq., 0.225 mmol, 87 mg). El sintetizador automático de péptidos se programa y se comienza con los ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos, obteniéndose el precursor lineal: Boc-LBII-Ahx-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-GPV-Resina Sieber. Luego se realiza el desanclaje de la resina y desprotección de Asp y Lys: i) se lava la resina con NMP/ DCM (x 8, 5 mL), ii) se adiciona TFA (3.5 %) TIS (5 %) en 2 mL de DCM y se deja en agitación a temperatura ambiente por 1.5 h. Luego se filtra y lava con DCM (x 3). Las aguas de lavado se neutralizan con 500 μ L de piperidina (10 % en MeOH). Se evapora con corriente de N₂ hasta 2 mL, se adiciona éter etílico para formar un precipitado. Se centrifuga durante 5 minutos y se retira el sobrenadante de éter etílico. Luego se realiza la ciclación en disolución: se adiciona PyBOP (4 eq., 0.3 mmol, 156 mg), DIPEA (10 eq., 0.75 mmol, 128 μ L), 5 mL de DMF y se deja durante 12 h a temperatura ambiente con agitación. Se adiciona éter etílico para formar un precipitado y se centrifuga durante 5 minutos, se retira el sobrenadante de éter etílico. Finalmente se realiza la desprotección final con la condición de 87.5 % TFA en DCM (5 mL) con 2.5 % de la mezcla de antioxidantes del Reactivo K, durante 1.5 h de agitación a temperatura ambiente. Luego de 1.5 h se neutraliza la reacción con piperidina 10 % en MeOH. Se evapora el MeOH y DCM hasta 2 mL, se adiciona éter etílico para formar un precipitado, el precipitado se centrifuga por 5 minutos y se resuspende en acetonitrilo : H₂O (70:30) y se purifica por HPLC fase reversa preparativo. El purificado es liofilizado. El avance de la reacción se controla por HPL-MS con previo desanclaje de alícuotas de resina para los fragmentos: Fmoc-dPhe-RW-Lys-GPV-CONH₂, LBII-Ahx-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-

DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-GPV-CONH₂, LBII-Ahx-Nle-cyc[Asp-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys]-GPV-CONH₂ y LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂. El producto final se caracterizó por HPLC-MS de fase reversa obteniéndose **(22)** 25 mg, R = 30 %.



(22)

LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂ **ESI-MS** m/z : 1590.32 ($M^+ + H$)

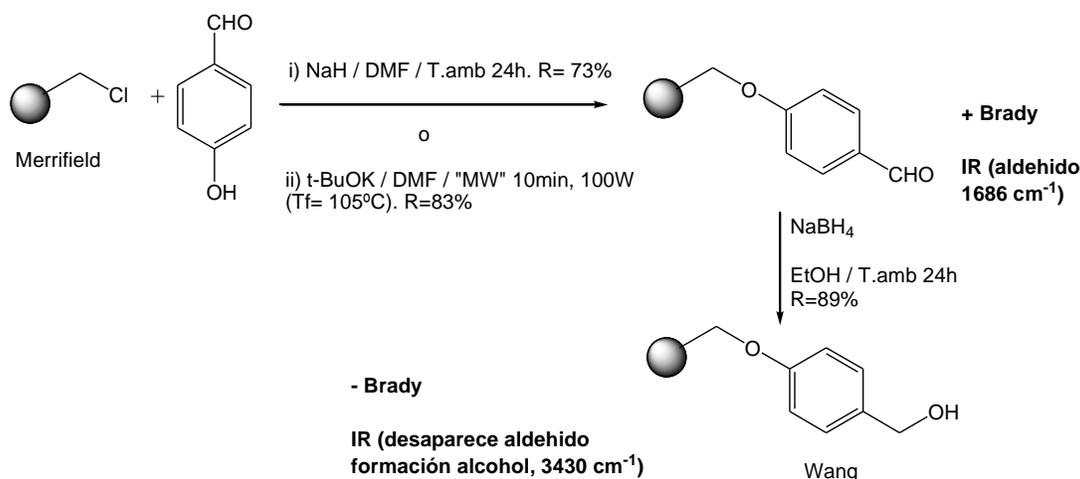
4.2. SÍNTESIS ORGÁNICA: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Síntesis de resina de Wang

La síntesis de los ligandos bifuncionales propuestos se realizó por metodologías tradicionales de química orgánica, y por metodologías modernas de fase sólida y síntesis asistida por microondas. Estas permiten reducir los tiempos de reacción y los procesos de purificación de los productos finales ¹⁹⁰⁻¹⁹².

La estrategia de síntesis en fase sólida comienza con una adecuada selección de la resina a emplear, siendo una limitante las características del ligando unido al soporte. Así, la resina seleccionada fue la de Wang. Esta resina de poliestireno-divinilbenceno presenta un grupo ligante hidroximetilado. La misma se obtuvo comercialmente y por derivatización de una resina comercial de Merrifield (Esquema 4.1). Frente a la resina de Merrifield, la de Wang es más lábil a los desanclajes en medio ácido permitiendo emplear condiciones menos agresivas ^{124,192}.

La transformación de la resina de Merrifield en Wang consistió en dos pasos, para el primero se ensayaron condiciones vía microondas y a temperatura ambiente. El seguimiento de las reacciones se hizo mediante IR (Figura 4.1) y test colorimétrico (utilizando reactivo de Brady) ¹⁹³ selectivo para grupos aldehído (Figura 4.1).



Esquema 4.1: Síntesis de resina de Wang a partir de resina de Merrifield

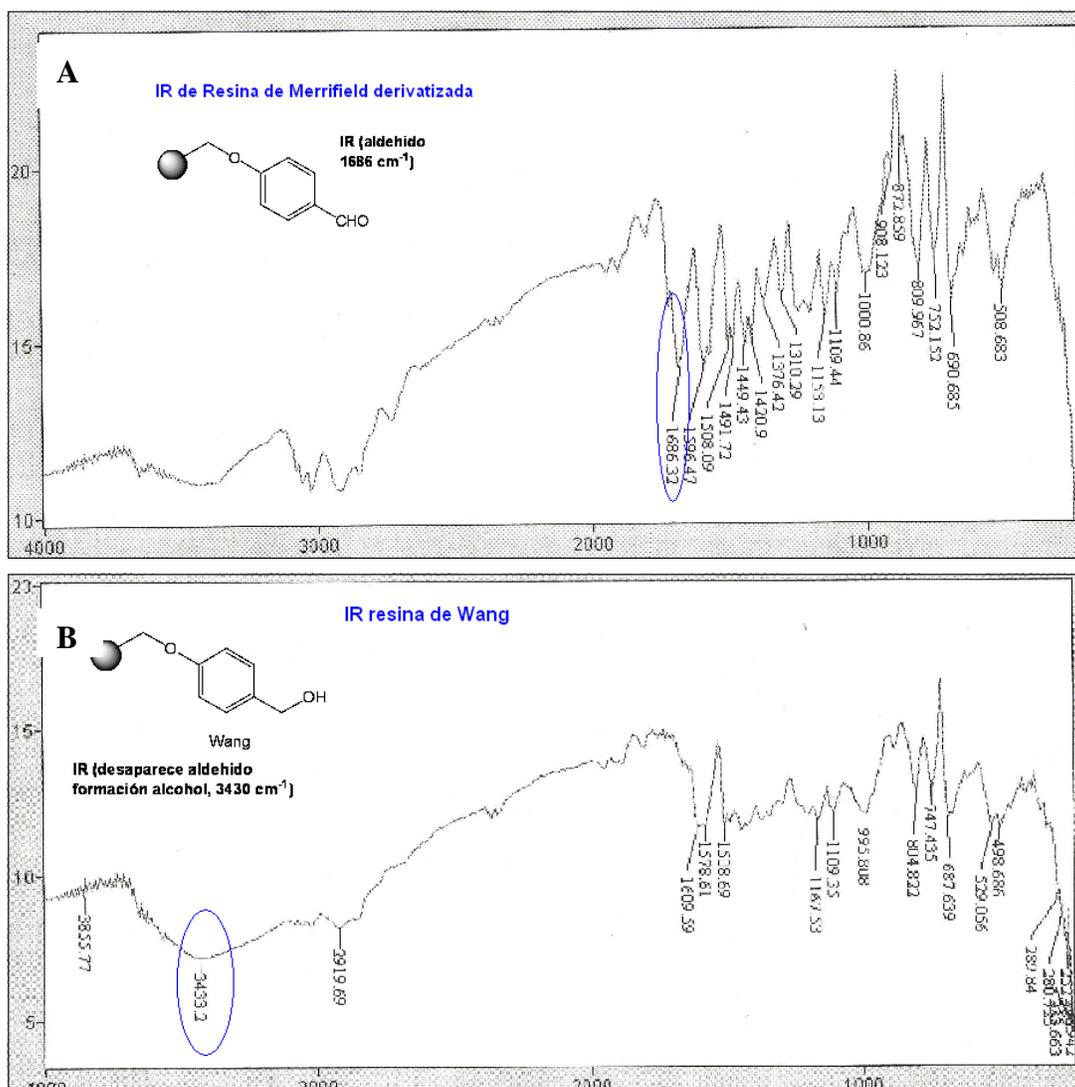
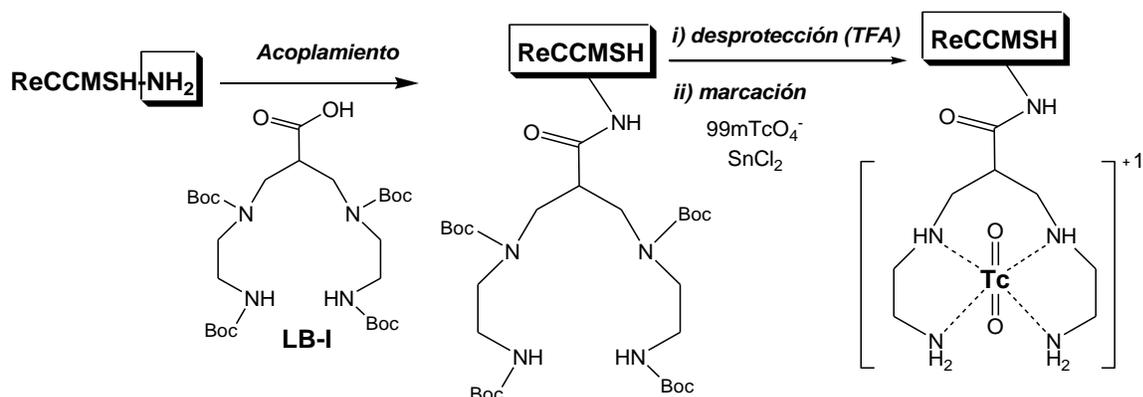


Figura 4.1: IR de la resina de Merrifield derivatizada (A) y de resina de Wang (B)

4.2.2. Síntesis de ligandos bifuncionales tetraamino I y II

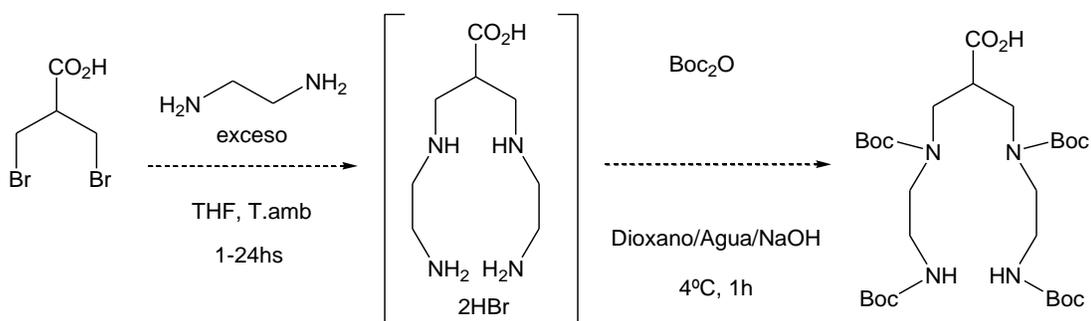
El diseño de los potenciales radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se ha basado en el uso de estructuras capaces de incorporar el átomo de tecnecio y que puedan unirse a la biomolécula sin afectar su conformación biológica, en este caso para que los complejos $\text{cycMSH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ puedan ser reconocidos al enfrentarse a los transportadores de MC1R en las células. De esta forma, se plantea en primer lugar la síntesis de un ligando bifuncional de tipo tetraamino para su adecuada unión al $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Esquema 4.2). Uno de los objetivos iniciales del presente trabajo consistió en la síntesis de

estructuras derivadas del ligando bifuncional tetraamino I (**LB-I**, Esquema 4.2) conteniendo un grupo funcional que permita la correcta derivatización con el derivado de α -MSH.



Esquema 4.2: Representación de derivatización de ReCCMSH con **LB-I** y posterior marcación con $^{99m}\text{TcO}_4^-$

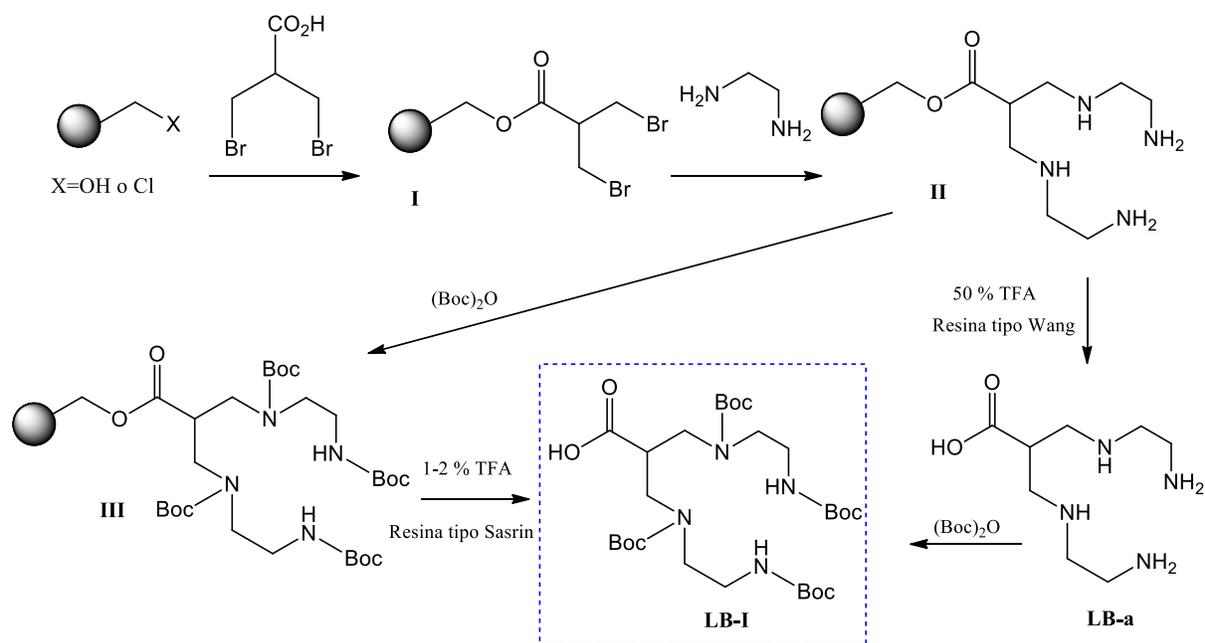
La metodología sintética propuesta para la síntesis del ligando bifuncional tetraamino acíclico I (**LB-I**) se presenta en el Esquema 4.3 y se basa en un reciente trabajo publicado¹⁸⁸. Esta síntesis consistió en un primer paso en la sustitución nucleofílica de la etilendiamina por los átomos de bromo del ácido 3-bromo-2-(bromometil)propanoico para dar la estructura del ligando tetraamino. Para favorecer esta reacción la etilendiamina se utiliza en exceso (40 equiv.), de manera de evitar reacciones de sustitución nucleofílica intramolecular o de polialquilación.



Esquema 4.3: Representación de síntesis de **LB-I**

Seguidamente y dado que el siguiente paso es proteger los grupos amino del derivado deseado con el grupo Boc, se utiliza el crudo de reacción sin otra purificación que la destilación del exceso del reactivo etilendiamina y del disolvente de reacción (THF). Para eliminar el exceso de etilendiamina (P.eb de 116.5 °C) y THF (P.eb de 67 °C) se intentó destilar a vacío utilizando tanto un equipo de destilación a presión reducida (evaporador rotatorio) como una destilación simple a vacío. Seguidamente el crudo de reacción se hizo reaccionar con dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido de Boc) en cantidades estequiométricas a baja temperatura por una hora. Bajo las condiciones de reacción y procesamiento ensayadas se obtuvo etilendiamina di-Boc como único producto. Estos resultados nos llevan a pensar en la posibilidad que nuestros sistemas de destilación a vacío no sean suficientes para la correcta eliminación del exceso de etilendiamina del sistema, y por lo tanto esta última reacción con el anhídrido de Boc principalmente. Por lo tanto, sería necesario contar con un sistema de destilación a alto vacío del cual no disponemos por el momento en nuestro laboratorio. Otra posibilidad es que los tiempos y temperatura de reacción no sean los adecuados para el primer paso de reacción, dado que en la técnica publicada esta etapa no está descrita claramente.

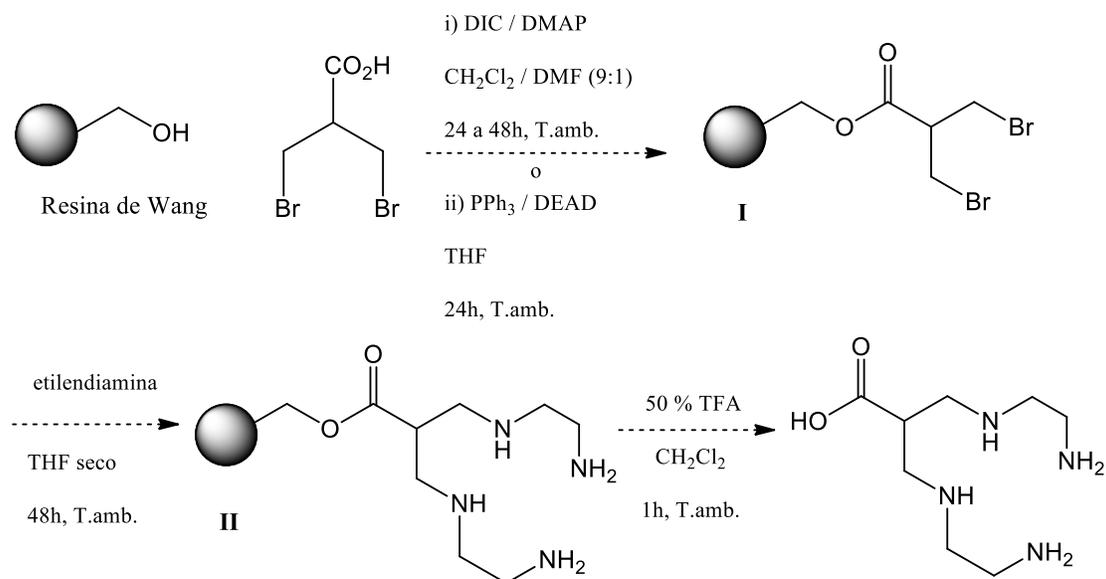
Dado los resultados mencionados anteriormente se plantea una estrategia de síntesis en fase sólida para la obtención del derivado **LB-I**, mediante la cual se pudiera trabajar con exceso de etilendiamina y posteriormente facilitar su eliminación (Esquema 4.4). En este contexto, se plantea utilizar dos resinas con conectores bencílicos, las cuales presentan condiciones ácidas de desanclaje, tales como la resina tipo Wang (50 % TFA).



Esquema 4.4: Metodología de síntesis en fase sólida propuesta para el ligando tetraamino acíclico **LB-I**.

Inicialmente, partiendo de una resina de Wang se llevó a cabo un primer paso de anclaje del reactivo comercial ácido 3-bromo-2-(bromometil)propanoico mediante el empleo de dos condiciones de reacción (Esquema 4.5). La primera condición de reacción consistió en una esterificación para la unión del ácido dibromopropanoico a la resina de Wang utilizando DIC como agente activante. La segunda condición de reacción de unión al soporte polimérico involucra una reacción de Mitsunobu en presencia de trifenilfosfina y DEAD. Seguidamente se realizó la reacción de sustitución nucleofílica utilizando etilendiamina en exceso por períodos de 24 y 48 h. Posteriormente el exceso de etilendiamina es eliminado fácilmente por procesos de lavado con diferentes disolventes orgánicos y posterior secado de la resina. Finalmente se llevó a cabo el desanclaje del producto unido a la resina mediante el empleo de TFA sobre la **resina II** (Esquema 4.5). Lamentablemente bajo ninguna de las condiciones de trabajo ensayadas fue posible obtener el ligando bifuncional tetraamino deseado. Para confirmar el correcto anclaje del ácido de partida bajo las dos condiciones ensayadas, se procedió además al desanclaje de la **resina I** (Esquema 4.5) utilizando TFA (50 %). Luego de las etapas de filtración y concentración a vacío se pudo constatar la no presencia del reactivo de partida. Por lo tanto, se puede concluir que las dos condiciones de anclaje utilizadas no resultaron adecuadas en el primer paso de síntesis en fase sólida. Puesto que

fue posible conseguir el **LB-I** de forma comercial, este fue adquirido para seguir adelante con los objetivos planteados y contar con el péptido ReCCMSH derivatizado con el ligando **LB-I**.

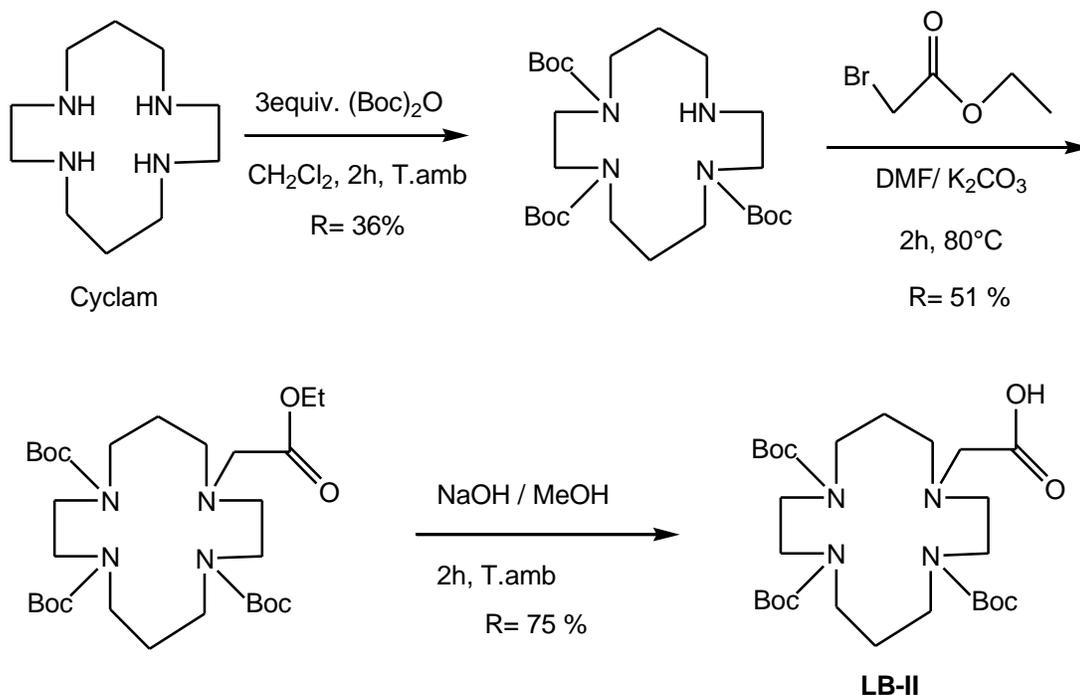


Esquema 4.5: Metodología de síntesis ensayada para el ligando bifuncional tetraamino acíclico en fase sólida.

Dado los resultados obtenidos, se plantea la obtención de un derivado tetraamino cíclico **LB-II** (Esquema 4.6). Este ligando sería empleado posteriormente para derivatizar los dos péptidos análogos de α -MSH para su evaluación como potenciales radiofármacos para diagnóstico oncológico.

Este ligando bifuncional cuenta con una estructura tetraamino, pero a diferencia del primer ligando este presenta una estructura cerrada (derivado conocido como cyclam). El **LB-II** incorpora una funcionalidad ácido carboxílico que permite el acople al péptido análogo de α -MSH. El derivado tetraamino **LB-II** también posee tres grupos protectores Boc, que son removidos al final de la síntesis del péptido.

La síntesis del **LB-II** fue realizada según una metodología sintética publicada recientemente ¹⁰⁶. En el Esquema 4.6 se puede apreciar la ruta de síntesis empleada, primero se realiza la protección de tres grupos amino con Boc mediante una sustitución nucleofílica. Seguidamente se realiza la incorporación de un grupo acetilo por S_N e hidrólisis para generar el ácido carboxílico necesario para la unión a un grupo amino del péptido análogo de α-MSH.



Esquema 4.6: Síntesis de ligando bifuncional tetraamino cíclico **LB-II**.

Se realiza la caracterización del producto obtenido mediante ^1H RMN, COSY, HSQC, HMBC y EM. En la Figura 4.2 se muestra el espectro ^1H RMN obtenido para **LB-II** en CDCl_3 . Los protones de los metilos del grupo Boc se pueden ver claramente en una señal con desplazamiento característico a 1.49 ppm la cual integra 27 H. A continuación, los protones que le siguen en desplazamiento son los $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$ siendo los dos pares de protones equivalentes H2A y H2'A. Estos protones están unidos de forma simétrica (a dos enlaces de distancia) a dos heteroátomos de N de aminas terciarias. Entre estos protones los H2A se encuentran más blindados (menor desplazamiento) que los H2'A, ya que uno de los N presenta como sustituyente un ácido

carboxílico, con mayor efecto inductor que los sustituyentes de los otros tres *N*. De esta forma, la señal para los H2A se encuentra a 1.76 ppm (integración 2H) y la de los H2'A se encuentra a 1.88 ppm (integración 2H). A estos protones le siguen en desplazamiento los protones $-\text{CH}_2\text{-NR}_2$, siendo estos H1A, H1'A, H3A, H'3A, HB, HC, HD y HE. En este grupo de protones, los más blindados son los que se encuentran unidos al heteroátomo *N* de la amina terciaria que presenta un ácido carboxílico como sustituyente, siendo estos los pares de electrones H3A y HE. Los protones HE se encuentran más desblindados (mayor desplazamiento) que los H3A porque a dos enlaces de distancia se encuentra una amina con efecto resonante aceptor, sin embargo, los H3A a dos enlaces de distancia presentan unión a un $-\text{CH}_2-$. Así, la señal de H3A se encuentra a 2.62 ppm (integra 2H) y la señal de HE se encuentra a 2.75 (integra 2H). Esta asignación fue confirmada en el espectro COSY (Figura 4.3). De acuerdo con la simetría de la molécula, los pares de protones HB y HC serían equivalentes entre sí y por otro lado, los pares de electrones H1A, H1'A y H3'A también serían equivalentes. Al observar las señales del espectro $^1\text{HRMN}$ se encuentra una señal a 3.27 ppm (integra 2 H) y otra señal a 3.38 ppm (integra 12 H). Para la asignación de la señal a 3.27 ppm se utilizó como complemento la información brindada por el espectro de HSQC (Figura 4.4), en el cual se puede ver que esta señal se correlaciona con una señal de 58.5 ppm correspondiente al C unido al grupo ácido carboxílico. Por lo cual la señal 3.27 ppm (integra 2 H) del $^1\text{H RMN}$ corresponde a los protones HF y la señal a 3.38 ppm (integra 12 H) corresponde a los protones H1A, H1'A, H'3A, HB, HC y HD. Los protones fueron correlacionados con sus vecinos empleando el experimento COSY (Figura 4.3).

A partir de los espectros HSQC y HMBC fue posible la asignación de resonancias del heteronúcleo ^{13}C directamente unido al ^1H (HSQC) y a 2 o 3 enlaces (HMBC). En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran las correlaciones entre H y C que permitieron determinar los desplazamientos de los C de la estructura de **LB-II**.

En la Figura 4.6 se presenta el espectro de masa (mediante impacto electrónico, EI-EM) del ligando tetraamino **LB-II**. De los resultados obtenidos con EI-MS se aprecia una relación m/z de 558.35 con un porcentaje de abundancia muy bajo (0.3 %) que corresponde al ión molecular (M^+). La baja abundancia del ión molecular se debe al método de ionización empleado y a la existencia de estructuras de fragmentación más estables. El patrón de fragmentación (Esquema 4.7) concuerda con la estructura del **LB-II**, con una pérdida inicial de los sustituyentes de los

grupos amino (fragmento $m/z=201$, abundancia = 82 %) y posterior fragmentación del ciclo para formar estructuras cíclicas menores que estabilizan la carga positiva mediante resonancia, por ejemplo los fragmentos con $m/z=97$ (abundancia = 100 %), $m/z=83$ (abundancia = 44 %) y $m/z=70$ (abundancia = 63 %).

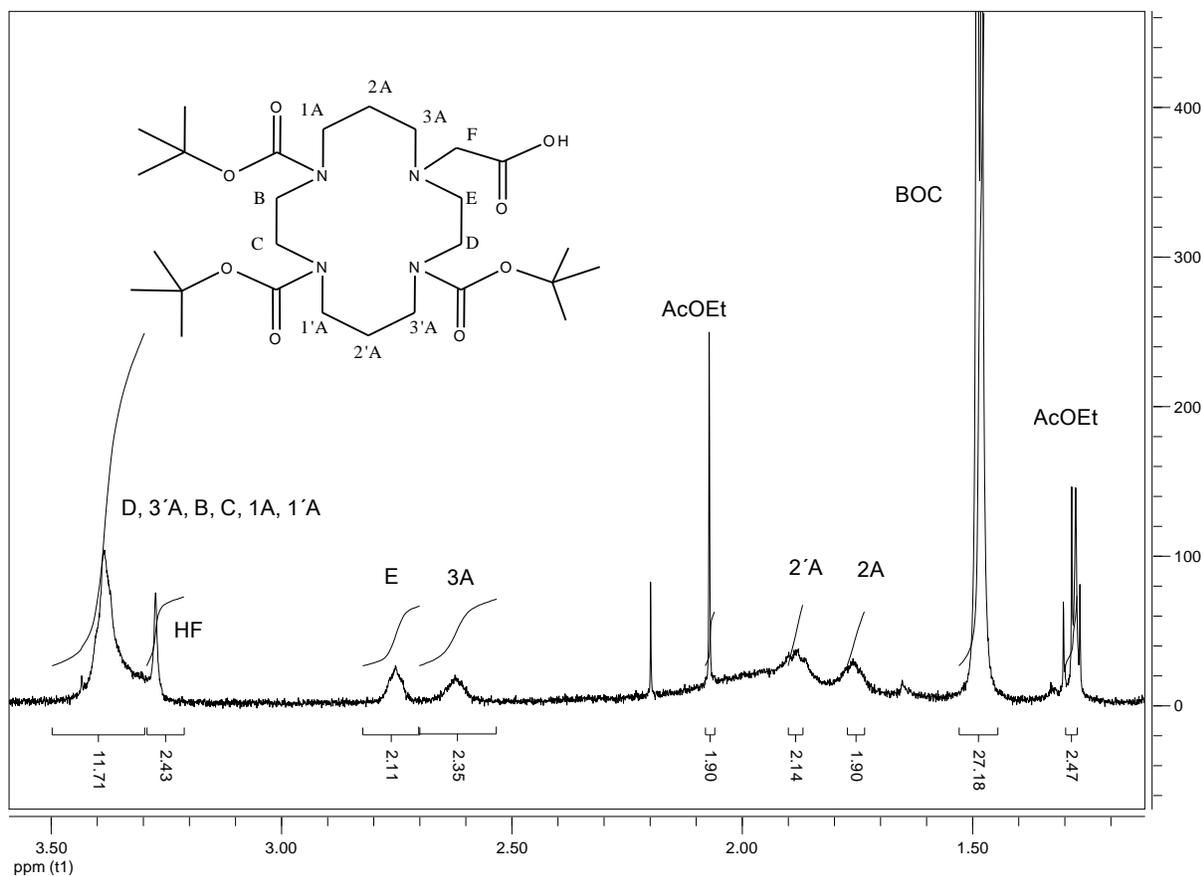


Figura 4.2: Espectro ^1H RMN obtenido en CDCl_3 de LB-II.

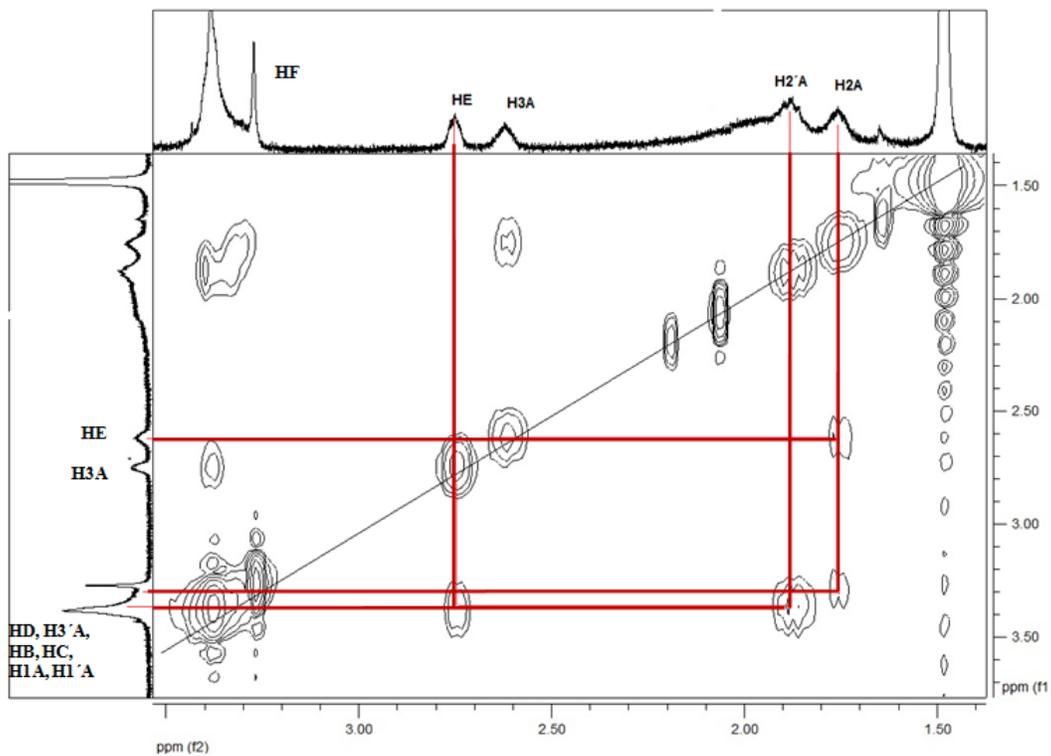


Figura 4.3: Experimento COSY de LB-II.

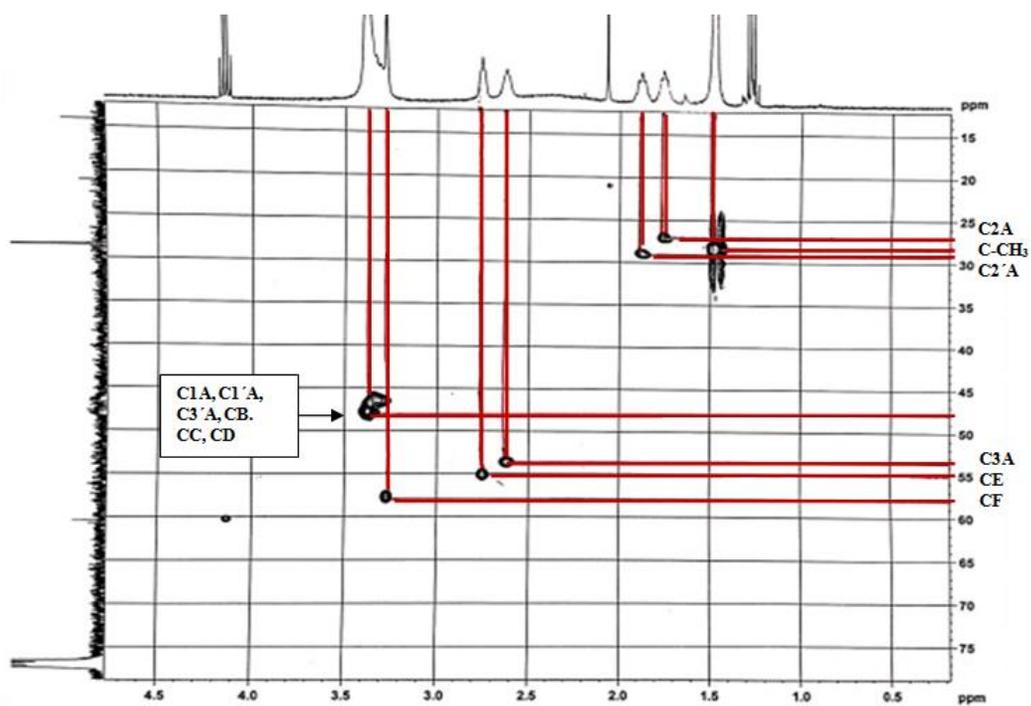


Figura 4.4: Experimento HSQC de LB-II.

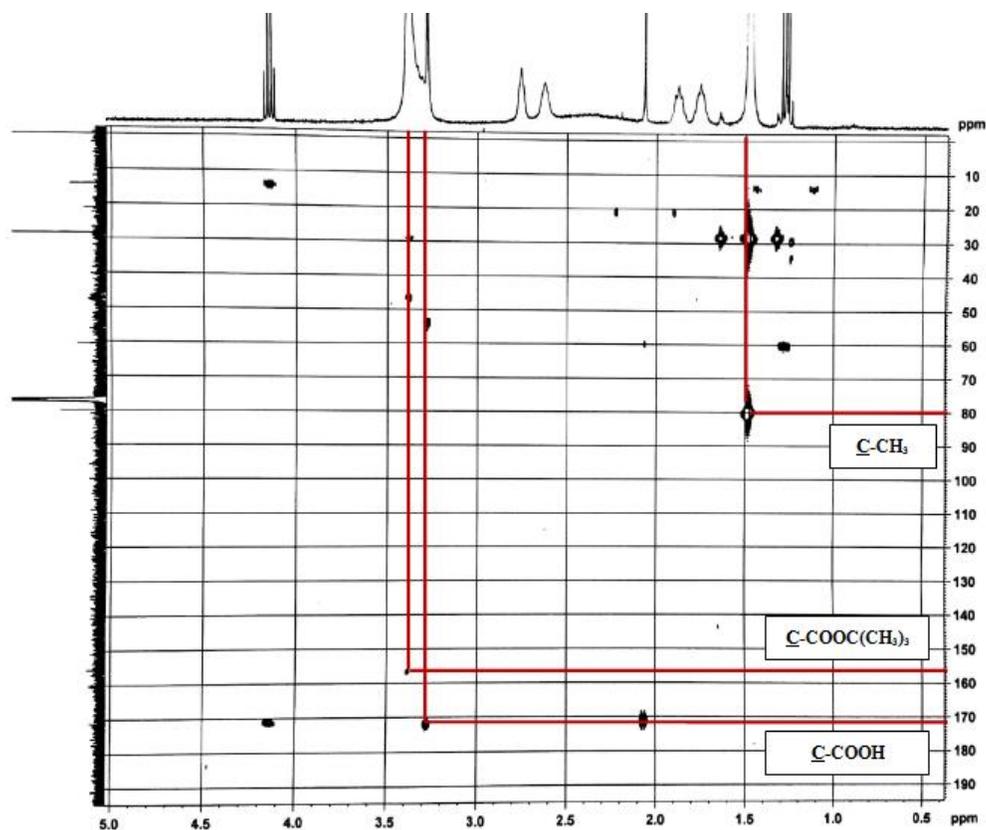


Figura 4.5: Experimento HMBC de LB-II.

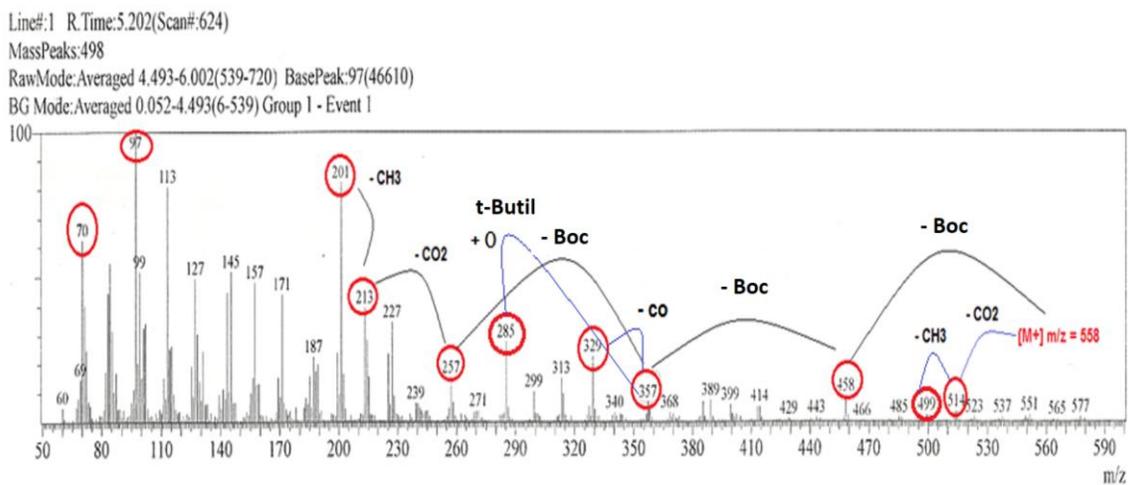
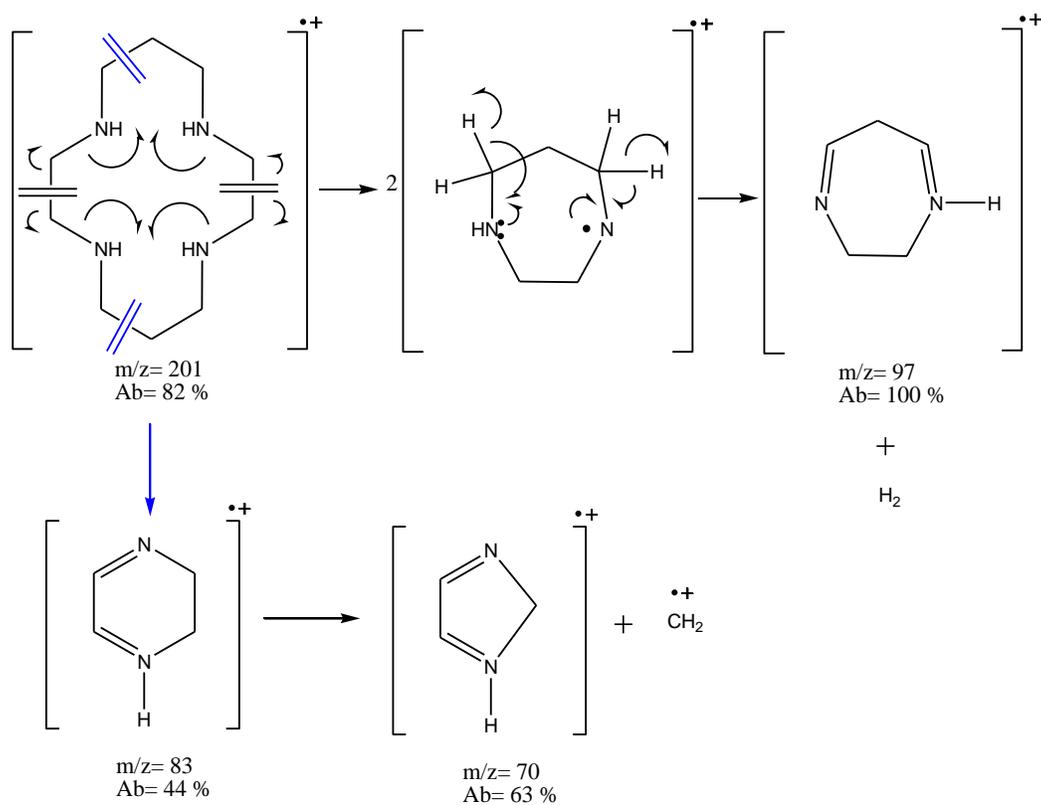


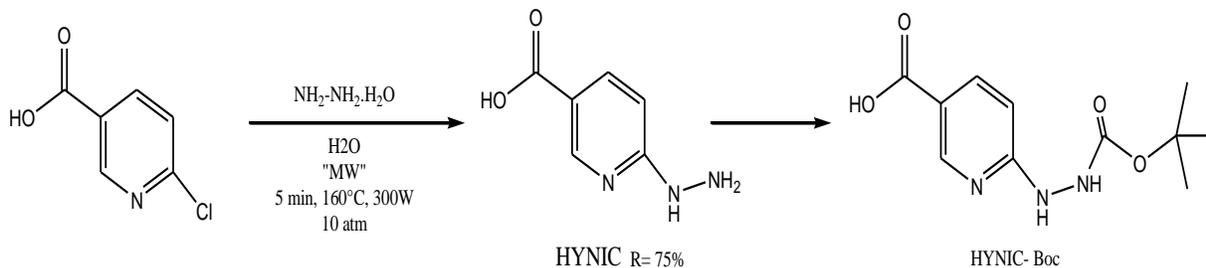
Figura 4.6: Espectro de masas (EI) de LB-II.



Esquema 4.7: Propuesta de fragmentación de **LB-II** en EI-MS.

4.2.3. Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-Boc

Fueron estudiadas diferentes metodologías para la síntesis del ligando bifuncional HYNIC con el grupo protector Boc. Obteniéndose en una primer instancia el ligando HYNIC sin grupo protector (Esquema 4.8), empleado la metodología descrita en la tesis de Msc Ma. Fernanda García ¹⁹⁴, la cual consiste en una S_NAr sobre el ácido 6-cloronicotínico, donde el halógeno es desplazado por el nucleófilo hidrazina. Seguidamente el grupo hidrazino es acoplado al grupo protector Boc, mediante reacción del grupo hidrazino con el anhídrido de Boc [(Boc)₂O]. En la Tabla 4.1 se muestran las condiciones de reacción estudiadas y los rendimientos obtenidos luego de realizada la purificación del producto obtenido.



Esquema 4.8: Síntesis de HYNIC y HYNIC-Boc

Entrada	Condición	Rendimiento
1	(Boc) ₂ O (1eq) / Etanol (5mL) T= 35-40 °C, 2 h	35 %
2	(Boc) ₂ O (1eq) / H ₂ O (5mL) T= 35-40 °C, 2 h	41 %
3	(Boc) ₂ O (1eq) / Etanol (5mL) / Urea (10 % mmol) T= 35-40 °C, 3 h Luego, 8 h a Tamb	30 %
4	(Boc) ₂ O (1eq) / LiBr (sol. aq. 2,5 M, 1mL) Tamb, 24 h Luego T= 50 °C por 2 h + 24 h a Tamb	13 %
5	(Boc) ₂ O (1eq) / NaOH (0,9eq) H ₂ O (1mL), T= 50 °C, 1 h. Luego, Tamb hasta 24 h	21 %
6	i) <i>t</i> -BuOH (3mL) / H ₂ O (3mL) / NaOH (1.2eq) ii) (Boc) ₂ O (1eq) Microondas, 5 min, 100 W, 120 °C	55 %
7	i) <i>t</i> -BuOH (6mL) / H ₂ O (9 mL) / NaOH (1.2eq) ii) (Boc) ₂ O (1eq) Tamb, 24 h	42 %

Tabla 4.1: Condiciones estudiadas para la síntesis de HYNIC–Boc a partir de HYNIC.

El grupo Boc, es ampliamente utilizado como grupo protector en diferentes aplicaciones, entre ellas la síntesis de péptidos. Esto se debe a la resistencia de Boc a hidrólisis en medios básicos, resistencia a otros nucleófilos y a la hidrogenólisis catalítica^{195,196}. Si bien la protección

de grupos amino con Boc, es bastante utilizada y conocida, la protección de grupos hidrazino no lo es, existiendo menos publicaciones al respecto ^{197,198}.

Las condiciones estudiadas involucraron metodologías sintéticas de química orgánica no convencional como el uso de radiación con microondas. La radiación microondas, en el espectro electromagnético está ubicada a longitudes de onda entre 1 mm – 1m, correspondiendo a frecuencias entre 0.3 y 300 GHz. El calentamiento por radiación microondas se basa en dos mecanismos: la rotación dipolar y en la conducción iónica. En relación a la rotación dipolar, las moléculas que poseen dipolos permanentes o inducidos rotan tratando de alinear su dipolo con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética en la región de ondas microondas. Dado que la rotación de dipolos moleculares se retrasa respecto de la oscilación el campo eléctrico en la región de microondas, la energía electromagnética absorbida para la rotación se disipa en el medio en forma de calor. Con respecto a la conducción iónica, el calentamiento se produce por la migración de los iones disueltos en el campo eléctrico oscilante lo que causa un aumento en las colisiones, convirtiéndose así la energía cinética en calor. El calentamiento por radiación microondas presenta ciertas ventajas frente al calentamiento convencional como: la radiación se absorbe directamente por los reactivos; el calentamiento es homogéneo; por el calentamiento homogéneo se producen menos productos de descomposición o productos secundarios; se disminuyen los tiempos de reacción; en condiciones de vacío se puede aumentar rápidamente la temperatura por encima del punto de ebullición del disolvente utilizado; se simplifica el escalado de las reacciones ^{199–201}.

También fueron estudiadas condiciones de química verde, favorables para el medio ambiente que no involucran disolventes orgánicos. La química verde se define como “el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias peligrosas” ²⁰². La química verde cuenta con doce principios, los cuales son directivas en cuanto al uso de reactivos, disolventes y catalizadores alternativos, condiciones de reacción y procesos optimizados con controles ²⁰³. De acuerdo a la química verde, el empleo de disolventes verdes tiene como finalidad disminuir el impacto ambiental derivado de la utilización de disolventes en la síntesis química. Así un disolvente verde debe ser natural, de fácil accesibilidad, no tóxico y barato. Además, éste debe facilitar la transferencia de masa (no necesariamente con disolución), permitir el avance de la reacción, la purificación y el reciclaje de los catalizadores. Por todo lo

mencionado, el agua es el disolvente y reactivo de elección en la química verde, pero también se emplean líquidos iónicos, disolventes biodegradables, fluidos supercríticos y sistemas bifásicos^{204,205}.

Generalmente las condiciones de protección de aminas con Boc se llevan a cabo en disolventes apróticos como THF o DCM y en presencia de una base fuerte como trietilamina. En este trabajo fueron estudiadas condiciones de protección del grupo hidrazino siguiendo los principios de química verde. Así, en las entradas 1 y 2 de la Tabla 4.1, se estudiaron condiciones empleando disolventes como etanol y agua respectivamente, sin la adición de una base. En ausencia de una base para ambos disolventes próticos polares, el mecanismo de activación de los carbonilos de (Boc)₂O se basa en la formación de un estado intermedio con enlaces de hidrógenos entre los protones del disolvente y los oxígenos de los carbonilos del (Boc)₂O. Favoreciéndose así, la electrofilia del carbonilo para el ataque nucleofílico^{206,207}. Para el caso del agua, se propone también que el átomo de oxígeno forma un enlace de hidrogeno con un hidrógeno de aminas aromáticas, aumentando así la densidad electrónica del átomo de nitrógeno y de esta forma la nucleofilia de éste²⁰⁷. Los rendimientos obtenidos para las reacciones en las entradas 1 y 2 de la Tabla 4.1, muestran un leve mejor rendimiento (41 % vs 35 %) para el uso de agua frente al de etanol, que podría estar relacionado a una activación adicional de la nucleofilia del grupo hidrazinilo con este disolvente. Por otro lado, en ambas condiciones de reacción, se obtuvo el producto HYNIC-Boc, y en menor proporción el derivado di-Boc, el cual fue eliminado en la purificación.

En la entrada 3 de la Tabla 4.1, se estudió una condición de reacción empleando como catalizador un compuesto orgánico, la urea. El uso de organocatalizadores ha crecido en los últimos años dado las ventajas económicas, medio ambientales y de enantioselectividad que estos ofrecen²⁰⁸⁻²¹⁰. Las ureas y tioureas han sido estudiadas por su capacidad de activación electrofílica en reacciones mediante la formación de enlaces de hidrógeno²¹¹⁻²¹³. Las guanidinas también han sido utilizadas como organocatalizadores en la protección de aminas y péptidos con (Boc)₂O, demostrando ser una alternativa eficiente y reciclable²¹⁴. Empleando las condiciones de la entrada 3 de la Tabla 4.1, fue posible obtener el grupo hidrazino protegido con Boc, sin embargo, también se obtuvo como producto secundario el derivado di-Boc y el rendimiento final de la reacción fue del orden que las condiciones en 1 y 2.

Otro de los principios de la química verde refiere al no uso de disolventes si es posible. De esta forma, fue estudiada la condición de la entrada 4 de la Tabla 4.1. En esta condición se empleó el LiBr como catalizador, el cual también puede considerarse compatible con química verde, dado que puede ser fácilmente recuperado de la reacción y reutilizado sin pérdida de efectividad. En estas condiciones tampoco fue empleada una base, dado que el Li⁺ del par iónico LiBr presenta una alta afinidad por el oxígeno, activando la electrofilia del grupo carbonilo para el ataque nucleofílico del grupo hidrazino^{215,216}. El rendimiento de la reacción en estas condiciones fue muy bajo (13 %).

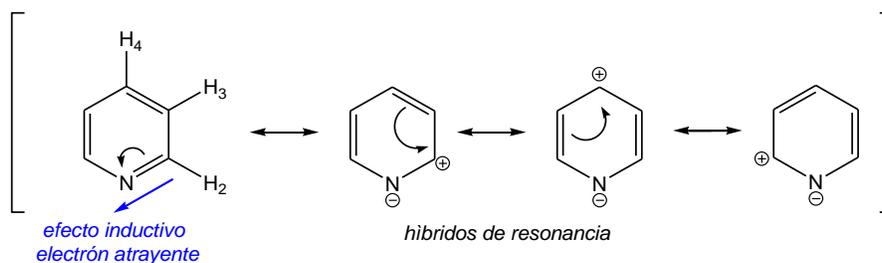
En las condiciones de la entrada 5 de la Tabla 4.1 se ensayó la reacción empleando como catalizador una base inorgánica altamente económica como el hidróxido de sodio. En estas condiciones tampoco fue posible mejorar el rendimiento (21 %).

El compuesto HYNIC presenta un grupo ácido y otro básico, teniendo así características zwitteriónicas similares a las de los aminoácidos y siendo el pH un factor muy importante. Por este motivo, en las condiciones de reacción de las entradas 6 y 7 de la Tabla 4.1 se realizó la protección empleando condiciones usadas en aminoácidos²¹⁷. La protección fue ensayada a temperatura ambiente y empleándose radiación microondas, empleando condiciones similares a las descritas en la tesis de Msc Ma. Fernanda García¹⁹⁴. Los rendimientos obtenidos luego de la purificación con estas condiciones fueron del orden que las condiciones anteriores, siendo mejor el rendimiento y tiempo de reacción en la condición con radiación microondas.

En la Figuras 4.7-4.8 se muestran el espectro de ¹H RMN y los experimentos de HSQC y HBMC correspondiente a HYNIC-Boc.

El rango de 6.8 a 8.5 ppm es característico de protones aromáticos en el espectro de ¹H-RMN. En la Figura 4.7 se puede apreciar esta región del espectro ¹H RMN de HYNIC-Boc, observándose claramente señales correspondientes a los protones Hb, Hd y He. El anillo de piridina presente en HYNIC-Boc es un sistema electrónico π deficiente. En el Esquema 4.9 se muestran las estructuras resonantes del anillo piridina, observándose que por efecto resonante las posiciones 2, 4 y 6 del anillo son deficientes en electrones y el efecto inductivo aceptor del heteroátomo N. En HYNIC-Boc el anillo de piridina se encuentra disustituido. Por un lado en la posición 3 del anillo el sustituyente es un ácido carboxílico, un grupo aceptor por efecto resonante e inductivo. Mientras que en la posición 6 del anillo el sustituyente es un grupo donador por efecto

resonante. En este contexto, el protón He es el más blindado (menor desplazamiento), observándose en el espectro ^1H RMN a 6.75 ppm como un doblete con una constante de acoplamiento (J) de 8.8 Hz por su acople con el protón en posición vecina (Hd). Considerando lo mencionado anteriormente el protón más desblindado del anillo corresponde a Hb, el cual presenta su señal a 8.73 ppm como un doblete con $J = 2$ Hz característica de un acoplamiento con el protón en posición *meta* (Hd). El protón Hd se detecta a 8.10 ppm como doblete doblete con acoplamiento con los protones He ($J = 8.8$ Hz) y Hb ($J = 2$ Hz). Finalmente los protones más blindados son los del grupo protector Boc, con una señal característica a 1.45 ppm la cual integra 9 H.



Esquema 4.9: Estructuras resonantes del anillo de piridina.

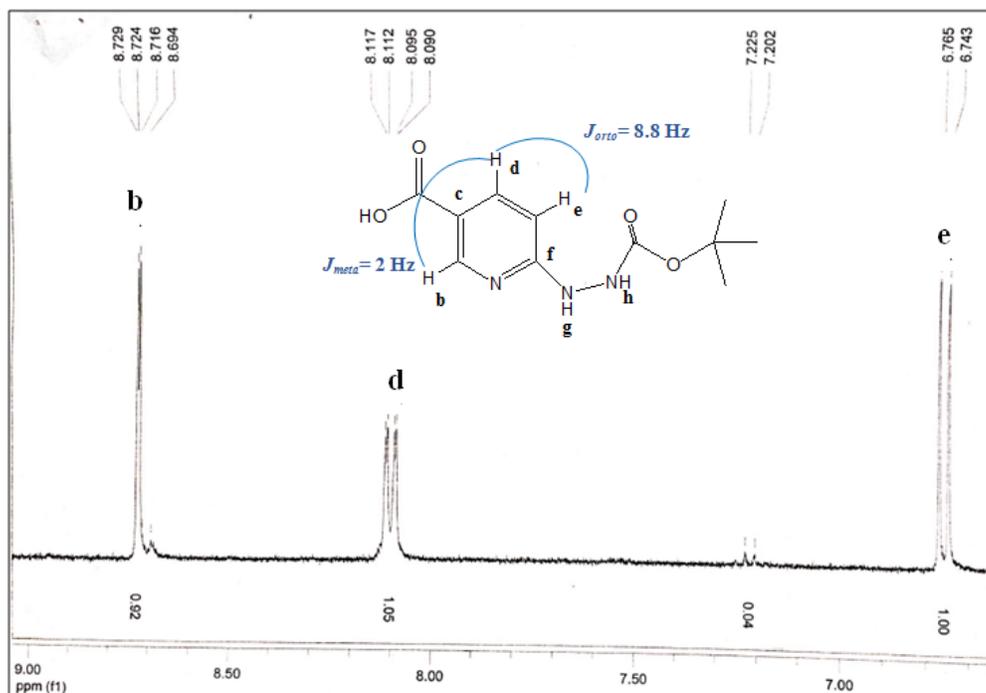


Figura 4.7: Espectro ^1H RMN de HYNIC-Boc (sección protones aromáticos)

En el experimento de HSQC (Figura 4.8) se observan las correlaciones bidimensionales C-H a un enlace de distancia. De esta forma se asignan los desplazamientos de los siguientes átomos de carbono de HYNIC-Boc: 27.7 ppm CH₃, 105.6 ppm C-e, 139.4 ppm C-d y 151.1 ppm C-b. Por otro lado, en la Figura 4.9 se muestra el experimento de HMBC de HYNIC-Boc, apreciándose en este la correlación C-H a más de un enlace de distancia. Así se pueden asignar los desplazamientos de átomos de carbono que no se encuentran unidos directamente a un protón: 79.5 ppm C-(CH₃)₃, 117.1 ppm C-c y 165.7 ppm C-f.

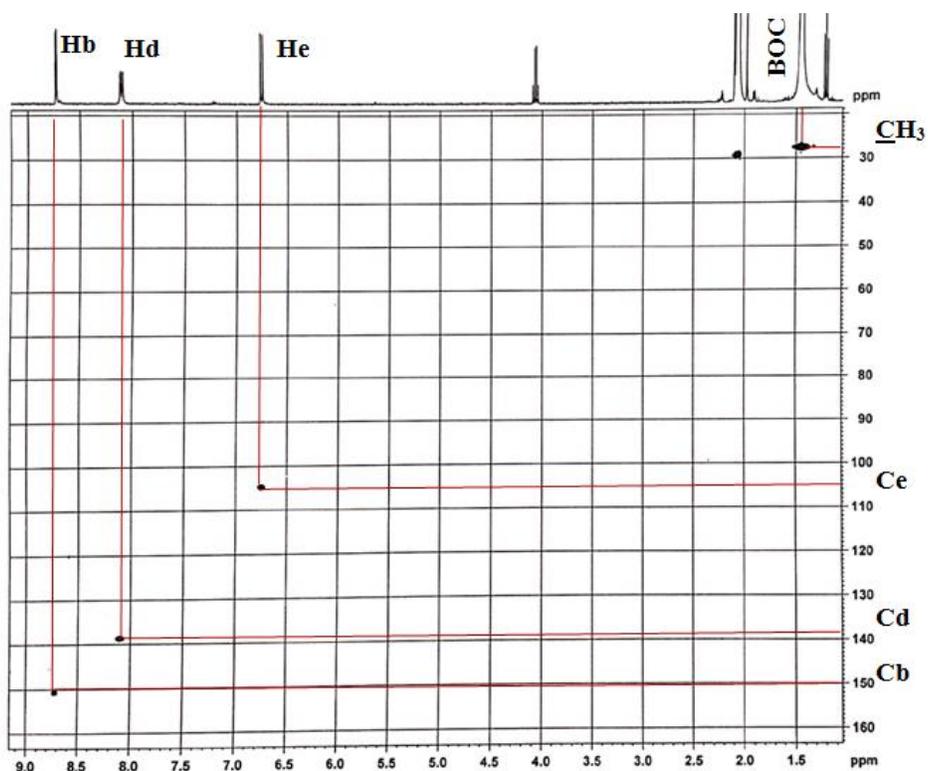


Figura 4.8: Experimento HSQC de HYNIC-Boc

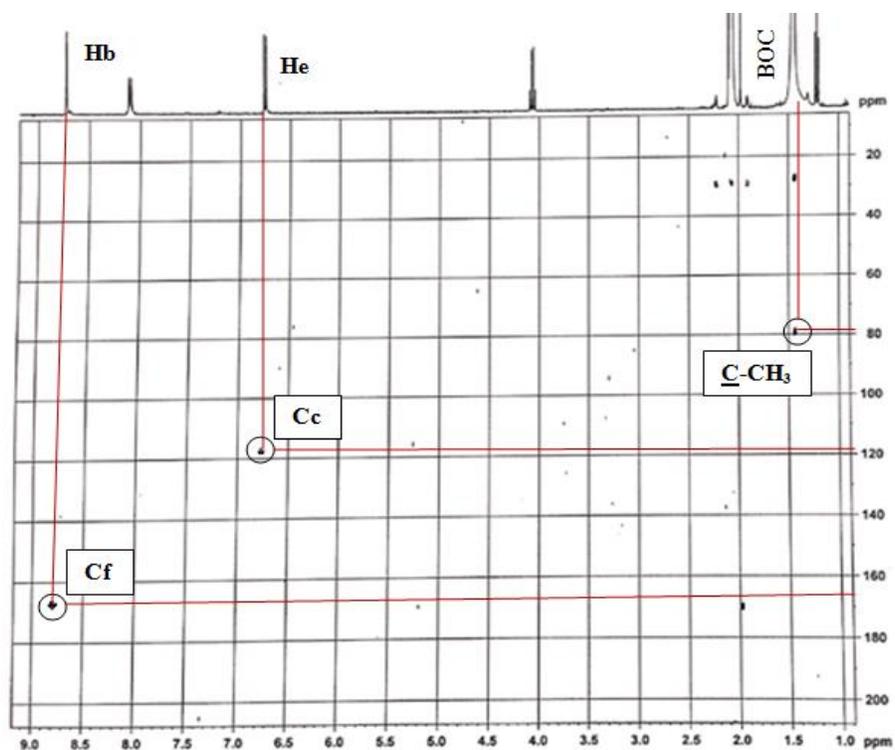
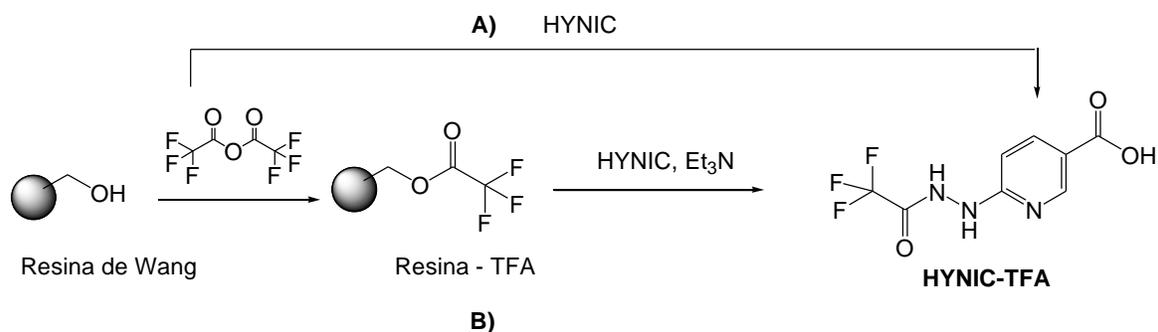


Figura 4.9: Experimento HMBC de HYNIC-Boc

4.2.4. Síntesis de ligando bifuncional HYNIC-TFA

Para la síntesis de HYNIC-TFA se plantearon dos metodologías de síntesis (Esquema 4.10). Por un lado, una estrategia de trifluoroacetilación de grupo hidrazino libre de HYNIC en presencia de anhídrido trifluoroacético en disolución (A). Por otro lado, una estrategia en fase sólida (B) de dos pasos. Siendo el primero la derivatización de la resina de Wang mediante una trifluoroacetilación con anhídrido trifluoroacético y el segundo un desanclaje con un mecanismo diferente, el cual requiere del ataque nucleofílico del grupo hidracino de HYNIC. Para este segundo paso se estudiaron diferentes disolventes y metodologías de calentamiento. Dado que en un ensayo inicial del paso de desanclaje empleando únicamente HYNIC disuelto en dioxano con calentamiento en microondas se constató que no hubo reacción, se estudiaron condiciones empleando la base trietilamina para favorecer la forma desprotonada del grupo hidrazino y mejorar el ataque nucleofílico.

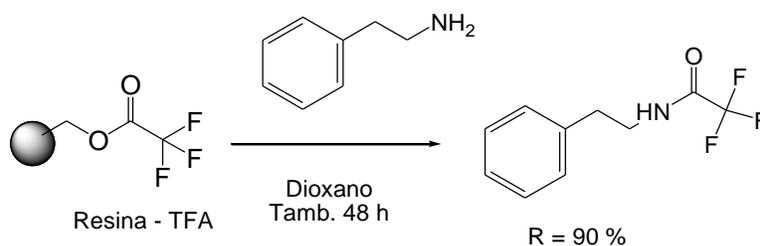


Esquema 4.10: Metodología de síntesis de HYNIC-TFA

En la Tabla 4.2 se resumen las diferentes condiciones de reacción estudiadas y los rendimientos obtenidos luego de realizada la purificación del producto obtenido. Como se puede apreciar el mejor rendimiento se obtuvo con la condición de la entrada 1, estrategia de síntesis en disolución. A modo de prueba para corroborar efectividad de resina derivatizada con trifluoroacético se llevó a cabo una trifluoroacetilación empleando una amina primaria aromática (Esquema 4.11). Así, se ensayó la trifluoroacetilación empleando feniletilamina, dioxano como disolvente en condiciones de agitación a temperatura ambiente durante 48 h, obteniéndose el producto esperado de la amina trifluoroacetilada (caracterizada por ^1H , ^{13}C RMN) con un rendimiento de 90 %. De esta forma, se piensa que los bajos rendimientos obtenidos con la reacción de trifluoroacetilación del grupo hidrazino de HYNIC empleando la estrategia de síntesis en fase sólida se podrían deber a que el grupo hidrazino posee un menor poder nucleofílico sobre la resina modificada.

Entrada	Condición	Rendimiento
1	HYNIC (0.65 mmol), anhídrido trifluoroacético (0.72 mmol) DMF. 2 h Tamb.	60 %
2	Resina-TFA (0.78 mmol, carga 1.12 mmol/g), HYNIC (0.39 mmol), Et ₃ N (0.39mmol) MeOH. 48 h Tamb.	30 %
3	Resina-TFA (0.25 mmol, carga 1.12 mmol/g), HYNIC (0.17 mmol), Et ₃ N (0.17mmol) DMF. "MO" 10 min, 150 °C, 300 W	< 10 %
4	Resina-TFA (0.25 mmol, carga 1.12 mmol/g), HYNIC (0.17 mmol), Et ₃ N (0.17mmol) DMF. 48 h Tamb.	< 10 %
5	Resina-TFA (0.25 mmol, carga 1.12 mmol/g), HYNIC (0.12 mmol), Et ₃ N (0.12mmol) Dioxano. "MO" 10 min, 100 °C, 300 W	15 %

Tabla 4.2: Condiciones estudiadas para la síntesis de HYNIC-TFA



Esquema 4.11: Trifluoroacetilación de feniletilamina.

En la Figura 4.9 se muestra el espectro infrarrojo de la resina derivatizada con trifluoroacetilo obtenida a partir de la resina de Wang. En relación al IR de la resina de Wang (Figura 4.1.B) se puede apreciar que desaparece la señal del alcohol en 3400 cm^{-1} y puede visualizarse la señal del carbonilo en 1760 cm^{-1} y del enlace C-F en 1170 cm^{-1} .

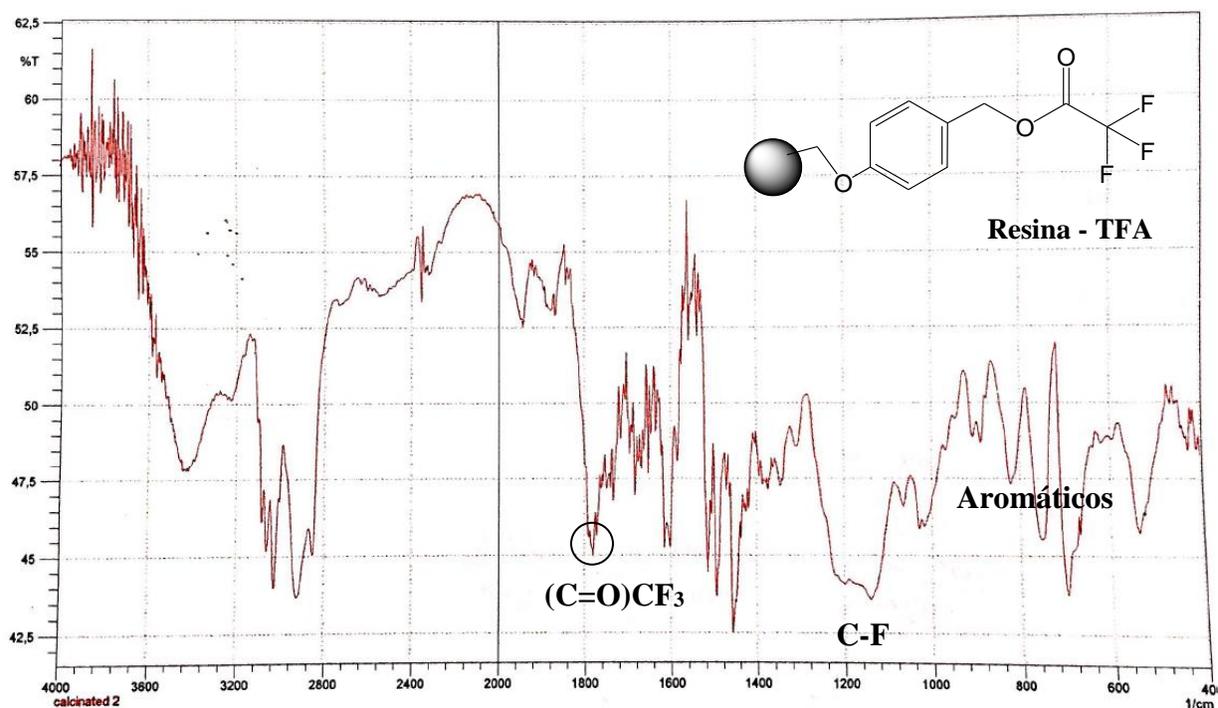


Figura 4.9: Espectro IR de Resina-TFA

HYNIC-TFA fue caracterizado por ^1H RMN, ^{13}C RMN y EM. El espectro de masas se muestra en la Figura 4.10, en el cual se puede ver claramente el ión molecular M^+ de m/z 249.04. En el ^1H RMN se observó el mismo patrón de los protones aromáticos que para HYNIC-Boc. En la Figura 4.11 se muestra el espectro ^{13}C RMN obtenido. En este se puede apreciar que los átomos de carbono C2-6, presentan desplazamientos en la región correspondiente a los C aromáticos y acorde al sistema electrónico π deficiente anillo de piridina disustituido: 107.0 ppm C-3, 127.3 ppm C-5, 139.6 ppm C-4, 148.6 ppm C-6 y 157.0 C-2. El $\text{C}-\text{F}_3$ presenta un desplazamiento característico de 118.0 ppm. Los C de los carbonilos son claramente los más desblindados, siendo $\text{C}=\text{O}$ el más desblindado por el efecto inductivo aceptor de los 3 átomos de F , así las señales se presentan en 167.6 ppm ($\text{C}=\text{O}$) y 168.3 ppm ($\text{C}=\text{O}$).

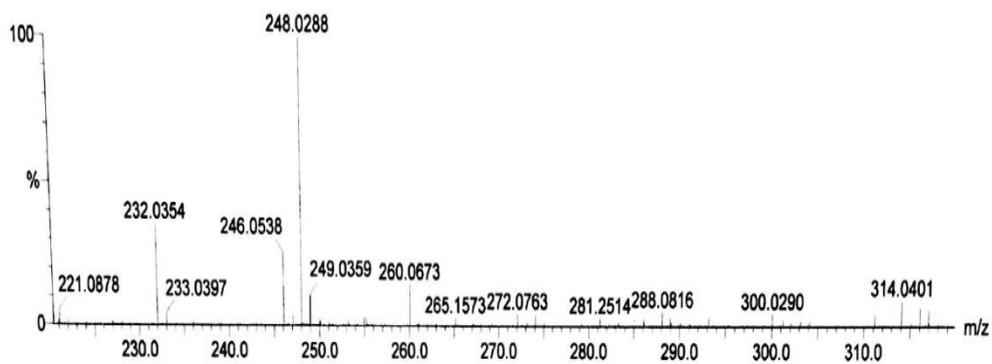


Figura 4.10: Espectro MS de HYNIC-TFA

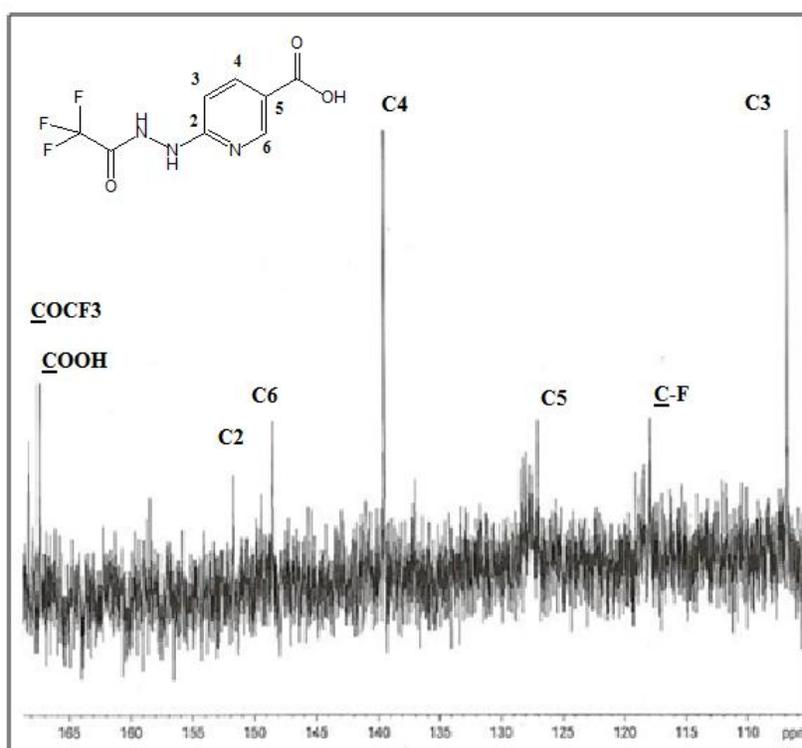


Figura 4.11: Espectro ^{13}C RMN de HYNIC-TFA

4.2.5. Síntesis de péptidos análogos de α -MSH

En esta tesis se trabajó con cuatro péptidos cíclicos análogos de alfa hormona estimulante de melanocitos (α -MSH). Las estructuras de los cuatro péptidos se muestran en la Figura 4.12.

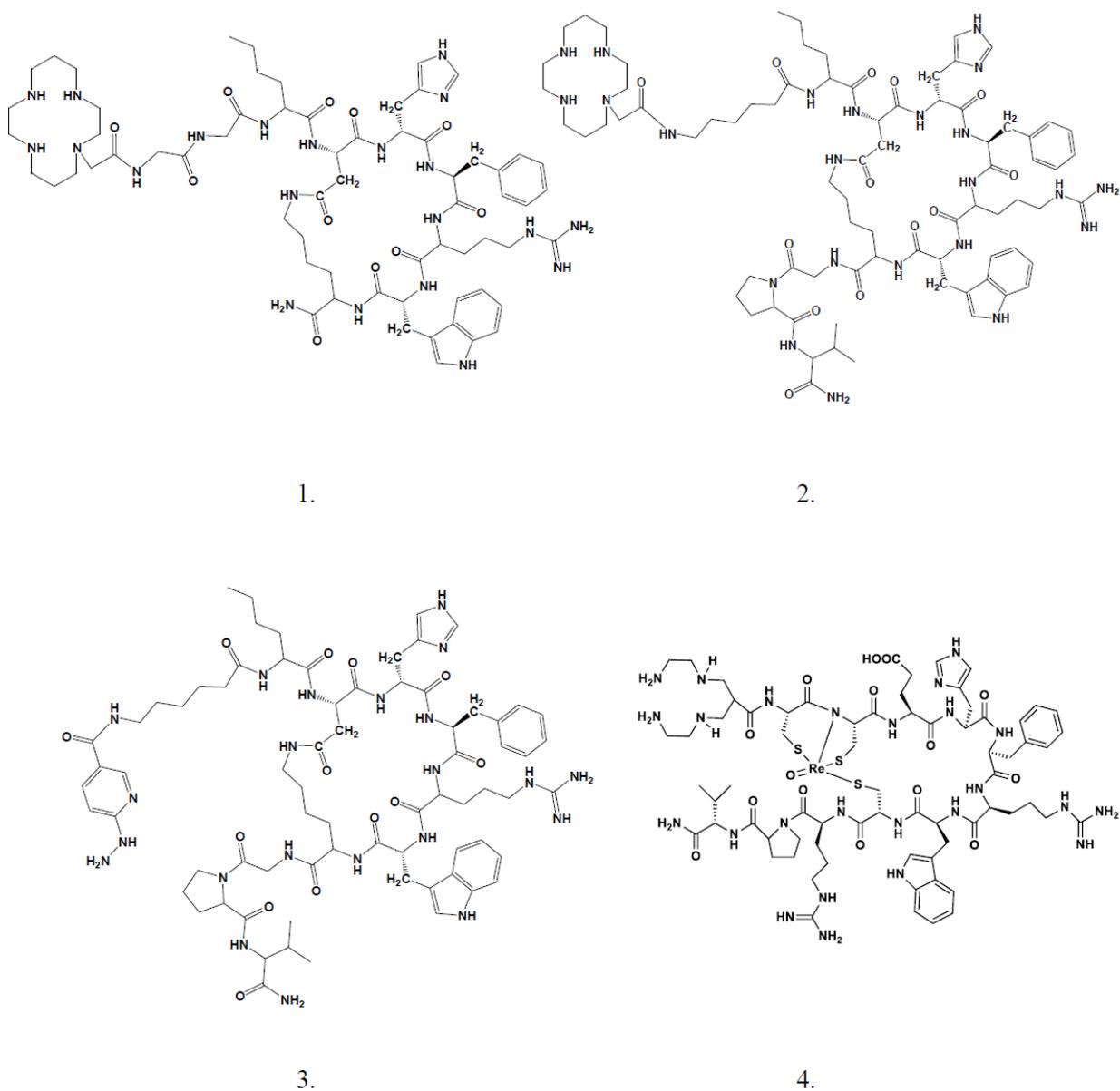


Figura 4.12: Estructura de los péptidos utilizados en este trabajo. 1. N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, 2. N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, 3. HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, 4. N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH.

De estos péptidos, los números 1 y 2, ciclados mediante enlace lactama derivatizados con el ligando bifuncional tetraamino II fueron sintetizados en el marco de una beca de movilidad de ANII: Beca MOV-CA-2013-1-10984 en la Universidad de Missouri (EEUU). El péptido 3, también ciclado mediante un enlace lactama, y derivatizado el ligando bifuncional HYNIC y el péptido 4, ciclado mediante un átomo metálico de renio, fueron sintetizados en el Laboratorio del Profesor Fabio Gallazi de la Universidad de Missouri (EEUU) ¹⁷⁴.

Los péptidos 1 y 2 fueron sintetizados empleando la metodología de síntesis en fase sólida en un múltiple sintetizador automático de péptidos, en una escala de 75 μ mol de péptido.

En la Figura 4.13 se puede apreciar la estrategia de síntesis empleada para obtener el péptido análogo de α -MSH ciclado por un enlace lactama derivatizado con el ligando tetraamino II (**LB-II**), péptido 1 N_{4II}-cycMSH₄₋₁₀ (compuesto **21**), secuencia: **LBII**-GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂ (**21**).

Resumidamente, el péptido 1 fue sintetizado en el sintetizador automático sobre la resina de Rink, construyéndose el precursor: Fmoc-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt). Luego se realizó la desprotección de los grupos protectores del Asp y Lys con un 3.5 % de TFA. Posteriormente se realizó la ciclación con PyBOP (x 6 exceso) en presencia de DIPEA (x 15 exceso) en DMF 12 horas de agitación a temperatura ambiente. Se continúa la elongación del péptido mediante ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos. Obteniéndose el precursor Boc-LBII-GG-Nle-cyc[Asp-His-DPhe-Arg-Trp(Boc)-Lys]-Resina Rink. Finalmente se realizó el desanclaje y desprotección final en la condición de 87.5 % TFA en DCM con 2.5 % de *scavengers*, durante 1.5 h de agitación a temperatura ambiente.

El avance de la reacción en la síntesis del péptido 1 se controló por HPL-MS con previo desanclaje de alícuotas de resina para los fragmentos: Fmoc-Nle-Asp-H-dPhe-RW-Lys-CONH₂, Fmoc-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂, GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂ y LBII-GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH₂. El producto final se caracterizó por HPLC-MS de fase reversa obteniéndose **21** con un rendimiento final luego de la purificación por HPLC preparativo de 5 %. En la Tabla 4.3 se pueden apreciar las masas teóricas y experimentales de los diferentes fragmentos peptídicos intermedios obtenidos. En la Figura 4.14 se muestra para el

péptido 1 purificado A) cromatograma HPLC, B) Abundancia Relativa C) Espectro Masa del compuesto 100 % abundante.

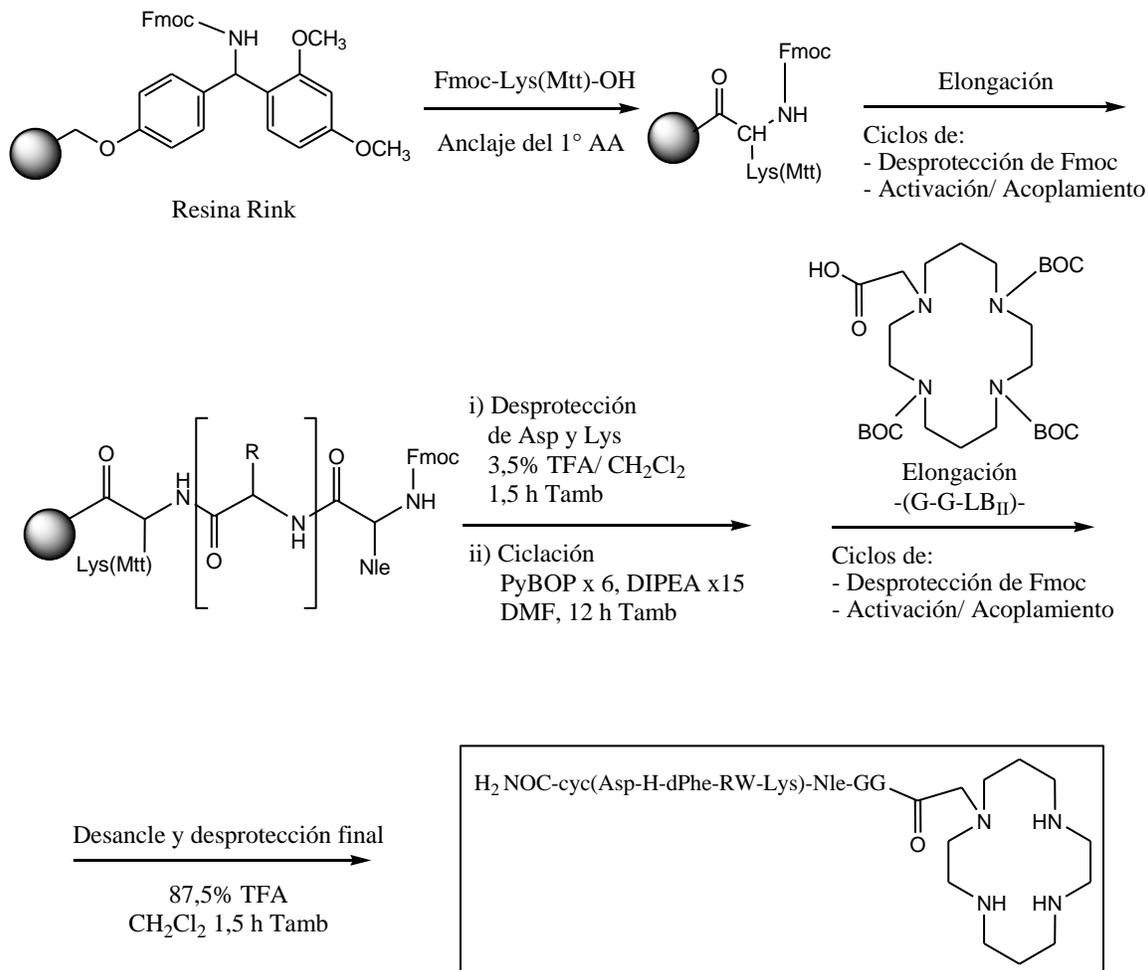
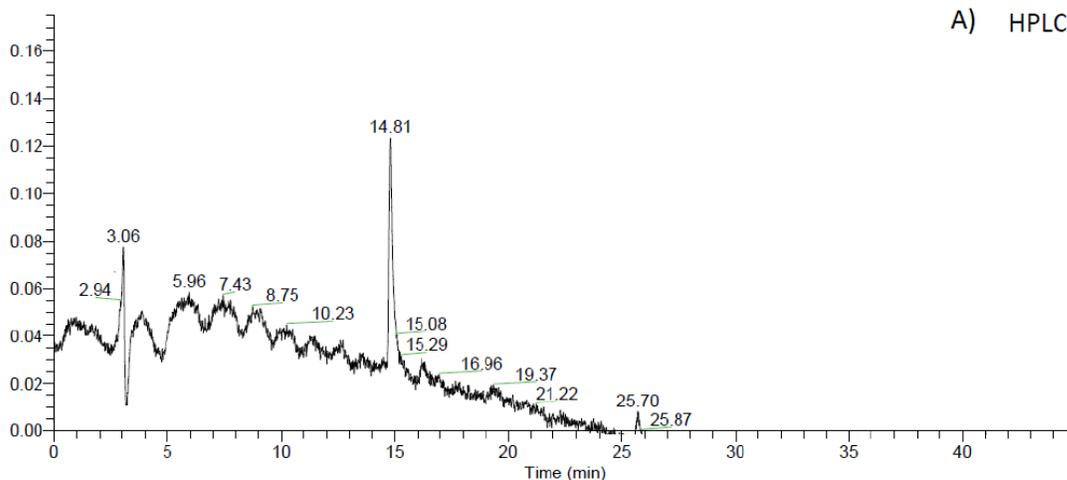


Figura 4.13: Síntesis de péptido 1 N₄_{II}-cycMSH₄₋₁₀ (21)

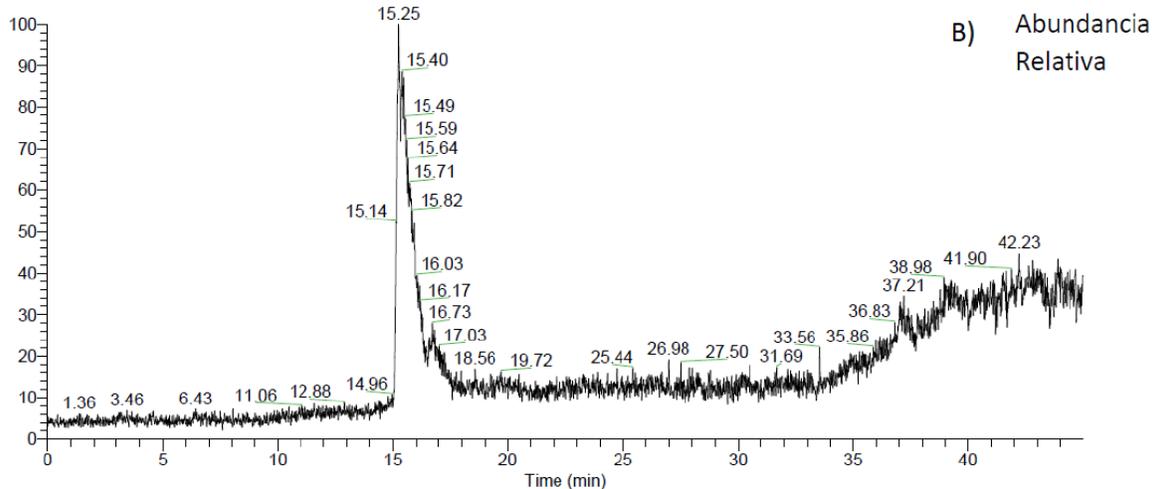
Secuencia	Ión	Calculada			Experimental		
		M	1+ M/2	1+ M/3	M+H	1+M/2	1+M/3
LB _{II} -GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH ₂	GGLDHRWK+	1335.57	668.785	446.19	1337.16	669.45	446.74
GG-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH ₂	GGLDHRWK+	1095.57	548.785	366.19	1096.94	549.29	-
Fmoc-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-CONH ₂	flDHRWK+	1203.61	602.805	402.203	1205.01	603.36	-
Fmoc-Nle-Asp-H-dPhe-RW-Lys-CONH ₂	flDHRWK+	1221.61	611.805	408.203	1223.04	612.34	413.58

Tabla 4.3: Masas teóricas y experimentales del péptido 1 (21).

RT: 0.00 - 44.99



RT: 0.00 - 44.99



372-1f4 #1107-1192 RT: 15.04-16.20 AV: 86 NL: 3.83E2
T: ITMS + c ESI Full ms [250.00-2000.00]

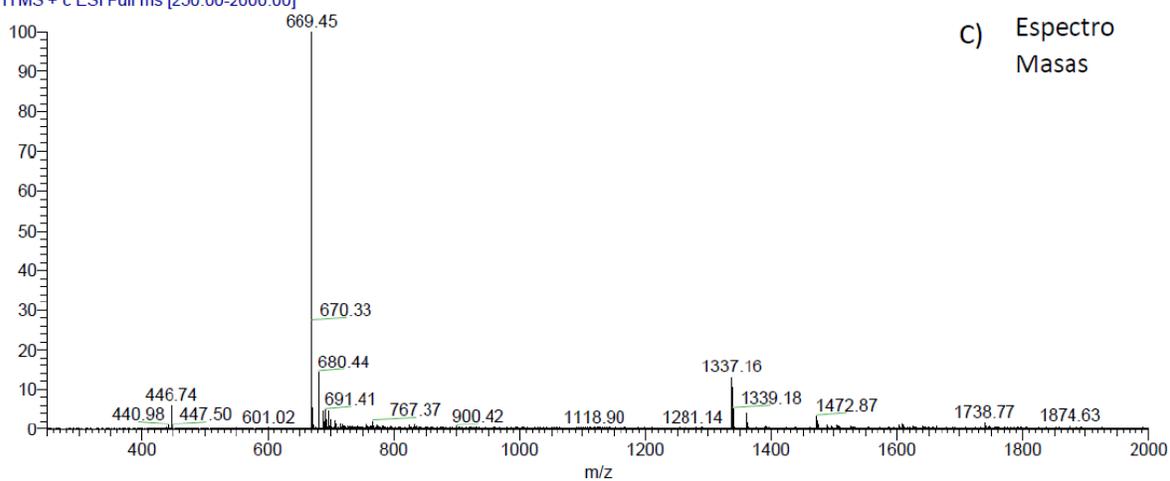


Figura 4.14: HPLC-MS del péptido 1 (**21**) purificado. A) Cromatograma HPLC, B) Abundancia Relativa C) Espectro Masa del compuesto 100 % abundante.

En la Figura 4.15 se puede apreciar la estrategia de síntesis empleada para obtener el péptido análogo de α -MSH ciclado por un enlace lactama derivatizado con el **LB-II**, péptido 2 (compuesto **22**), secuencia: **LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂ (22)**.

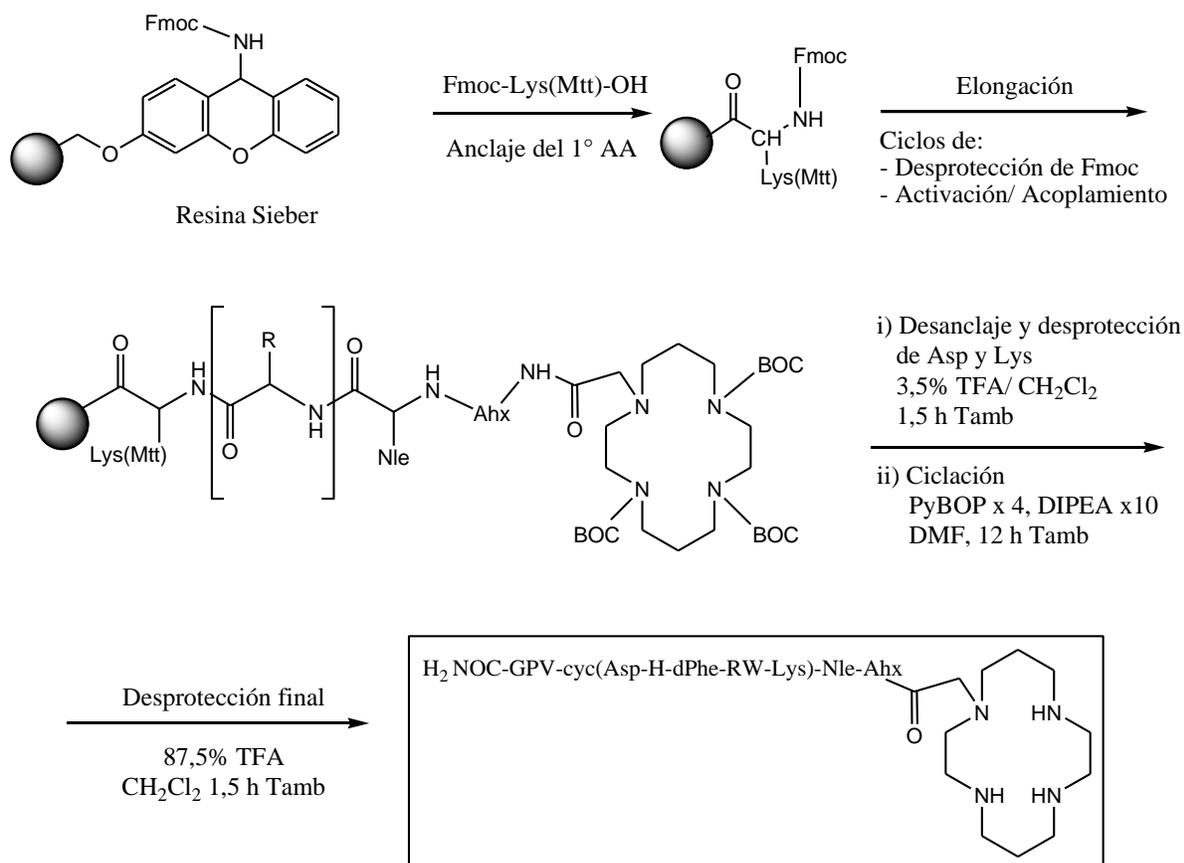


Figura 4.15: Síntesis de péptido 2: **LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂ (22)**

Este péptido fue sintetizado partiendo de la resina de Sieber la cual permite un desanclaje en condiciones menos ácidas que la de Rink y en este caso la ciclación se realizó en disolución luego del desanclaje final. El rendimiento final, luego de la purificación fue de 30 %. Se considera que el menor rendimiento obtenido para el primer péptido podría deberse a un impedimento estérico durante la ciclación en fase sólida.

Brevemente, la estrategia de síntesis para el péptido 2 (Figura 4.15) consistió en construir el precursor lineal: Boc-LBII-Ahx-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-GPV-Resina Sieber, mediante ciclos de desprotección del grupo Fmoc y activación-acoplamiento de los aminoácidos protegidos en su cadena lateral. Luego se realizó el desanclaje y desprotección de los aminoácidos Asp y Lys. Posteriormente se realizó la ciclación en disolución con PyBOP (x 4 exceso) en presencia de DIPEA (x 10 exceso) en DMF 12 horas de agitación a temperatura ambiente. Finalmente se efectuó la desprotección final de las cadenas laterales de los aminoácidos con 87.5 % TFA en DCM (5 mL) y se purificó el péptido obtenido por HPLC-MS preparativo.

El producto final y el avance de la reacción se controlaron por HPLC-MS con previo desanclaje de alícuotas de resina para los fragmentos: Fmoc-dPhe-RW-Lys-GPV-CONH₂, LBII-Ahx-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-GPV-CONH₂, LBII-Ahx-Nle-cyc[Asp-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys]-GPV-CONH₂ y LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH₂. El producto final se caracterizó por HPLC-MS de fase reversa obteniéndose el péptido 2 purificado en un rendimiento de 30 %. En la Tabla 4.4 se pueden apreciar las masas teóricas y experimentales de los diferentes fragmentos peptídicos intermedios obtenidos. En la Figura 4.16 se muestra para el péptido 2 purificado A) cromatograma HPLC, B) Abundancia Relativa C) Espectro Masa del compuesto 100 % abundante.

Secuencia	Ión	Calculada			Experimental		
		M	1+ M/2	1+ M/3	M+H	1+M/2	1+M/3
LBII-Ahx-Nle-cyc(Asp-H-dPhe-RW-Lys)-GPV-CONH ₂	ILDHFRWKGPV+	1587.750	794.875	530.250	1590.32	795.65	530.950
LBII-Ahx-Nle-cyc[Asp-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys]-GPV-CONH ₂	ILDHFRWKGPV+	2482.750	1242.375	828.583	2503.66	1243.86	-
LBII-Ahx-Nle-Asp(O-2-PhiPr)-His(Trt)-DPhe-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Mtt)-GPV-CONH ₂	ILDHFRWKGPV+	2500.750	1251.375	834.583	2502.58	1252.66	-
Fmoc-dPhe-RW-Lys-GPV-CONH ₂	fFRWKGPV+	1109.580	555.790	370.860	1110.99	556.35	-

Tabla 4.4: Masas teóricas y experimentales del péptido 2 (**22**).

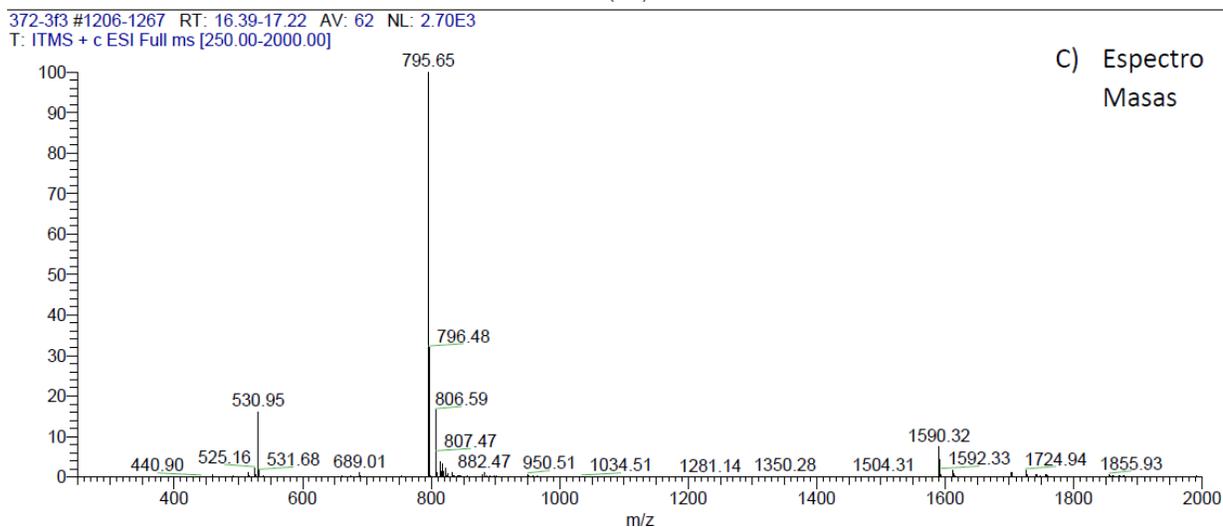
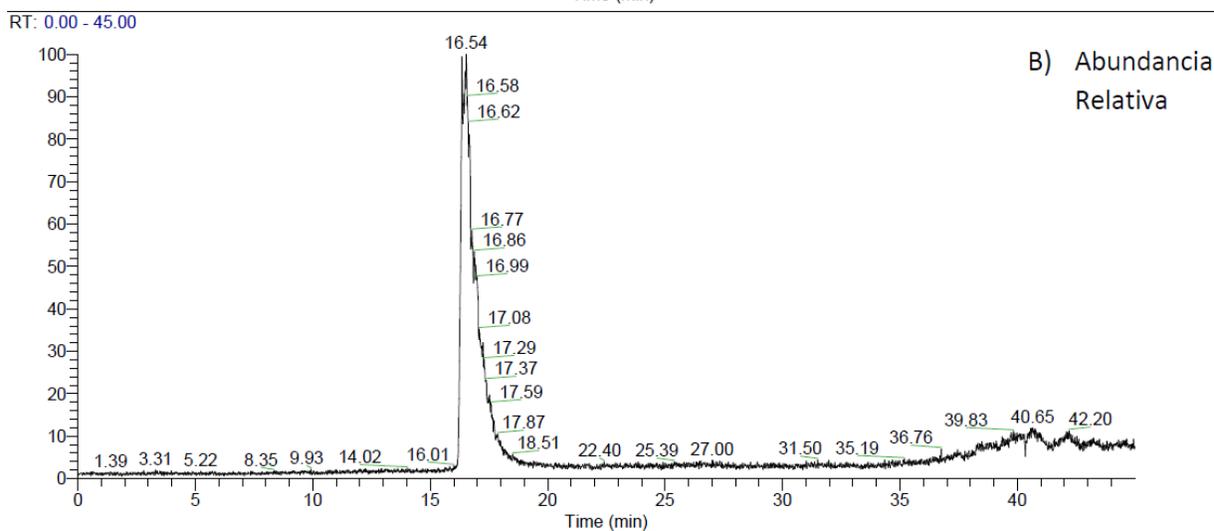
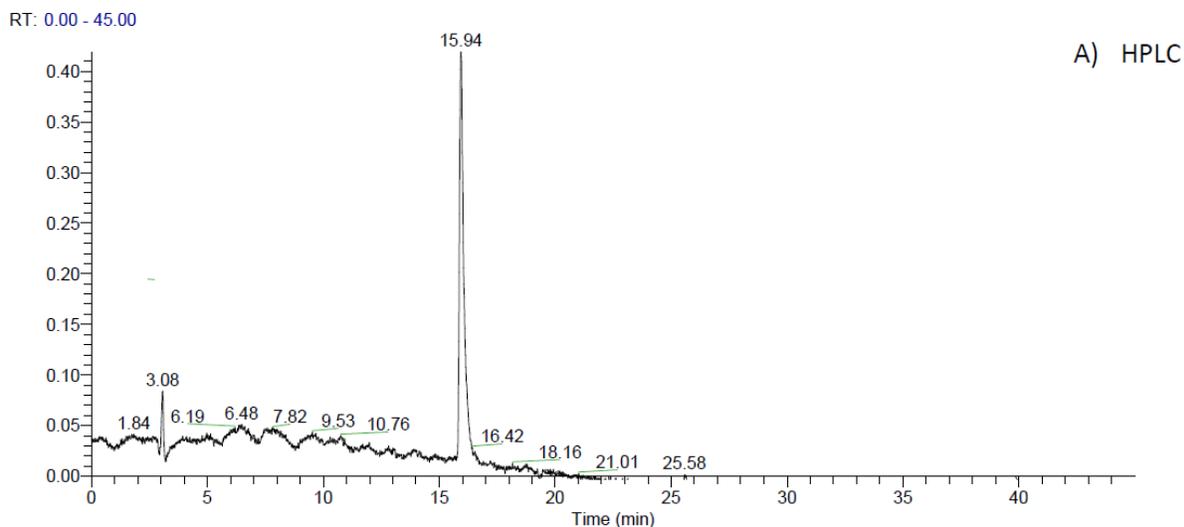


Figura 4.16: HPLC-MS del péptido 2 purificado (**22**). A) Cromatograma HPLC, B) Abundancia Relativa C) Espectro Masa del compuesto 100 % abundante.

Como se mencionó anteriormente en la sección 1.6 y en la sección 4.1.5 la síntesis de los péptidos consistió básicamente en repetición de ciclos de desprotección del grupo *N*-Fmoc del aminoácido unido a la resina y de activación y acoplamiento del siguiente aminoácido. En la Figura 4.17 se muestra el mecanismo de desprotección del grupo *N*-Fmoc en medio básico (piperidina al 20 % en DMF). Con la desprotección del grupo amino se obtiene un producto secundario que absorbe a 290 nm y puede medirse para verificar el avance de la reacción. La piperidina se regenera en esta reacción ^{123,124}.

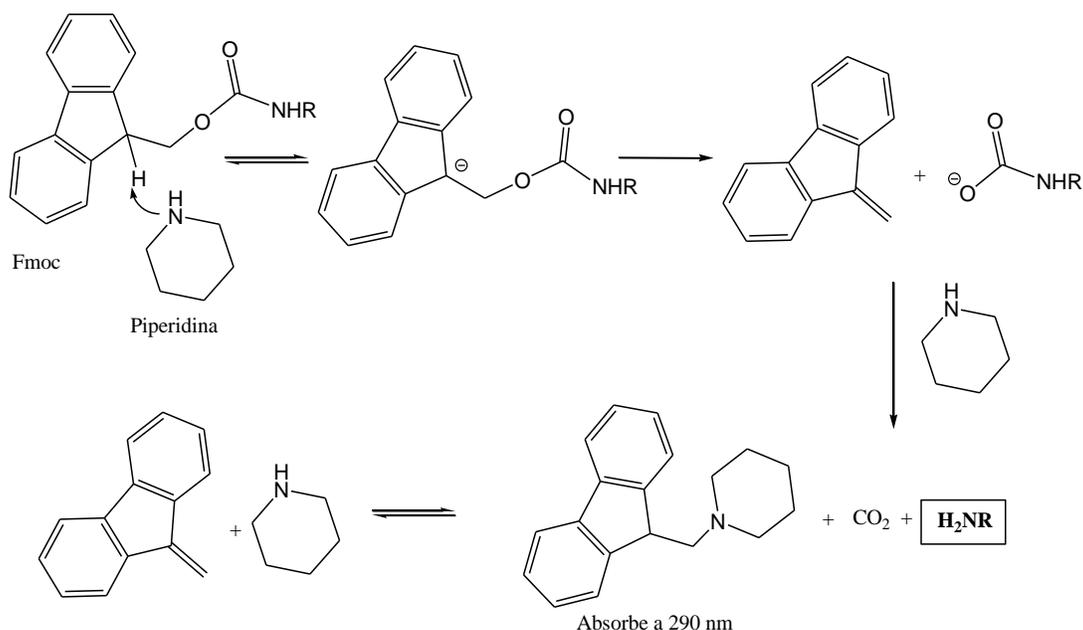


Figura 4.17: Desprotección del grupo *N*-Fmoc

En la Figura 4.18 se presenta el mecanismo de activación del grupo carboxilo del aminoácido mediante la formación de un éster Bt empleando HBTU para ello. Este grupo Bt es un buen grupo saliente favoreciendo la formación del enlace amida mediante el ataque nucleofílico del grupo amino del aminoácido de la cadena peptídica en elongación (ver Figura 4.19) ^{123,129}.

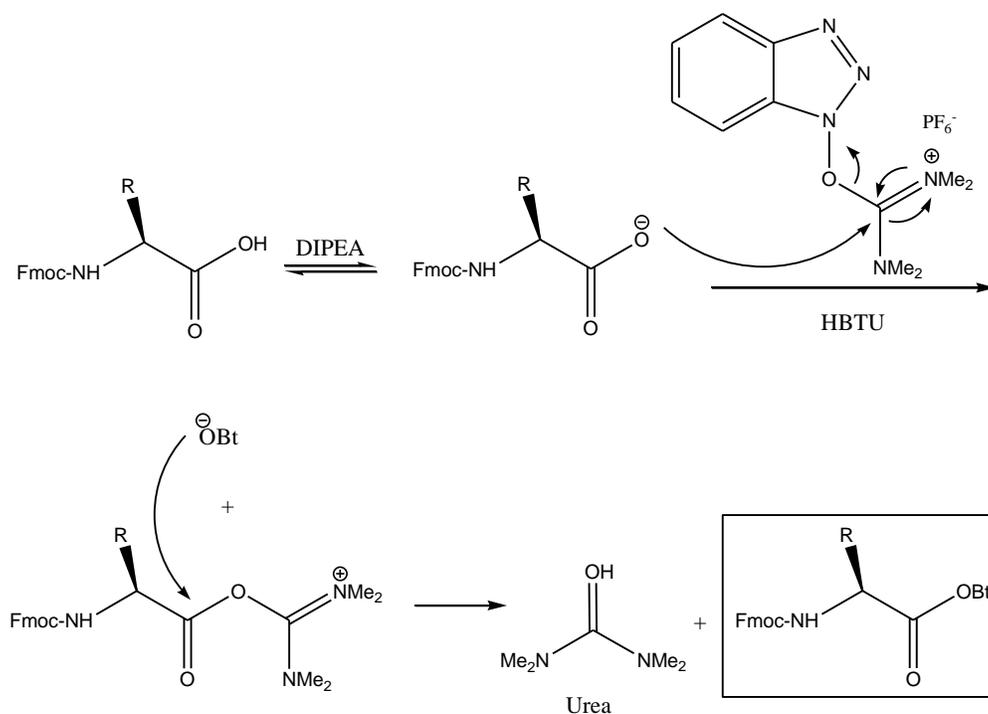


Figura 4.18: Activación del grupo carboxilo empleando HBTU

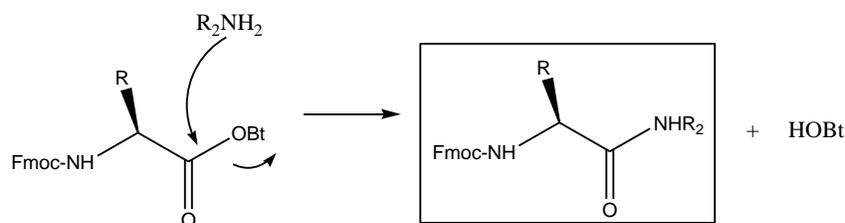


Figura 4.19: Formación del enlace amida

La reactividad entre las sales de uronio/iminio y de fosfonio para el acoplamiento es similar. Sin embargo, las sales de uronio/iminio (HBTU) pueden causar *capping* en los grupos amino de la resinas mediante la formación de una guanidina *N*-terminal (estructura en Figura 4.20). Esta reacción secundaria ocurre con mayor frecuencia durante las reacciones de ciclación en resina. Por lo cual para las reacciones de ciclaciones en resina se prefiere el uso de sales de fosfonio como PyBOP o PyAOP las cuales no producen esta reacción de *capping*^{129,218}.

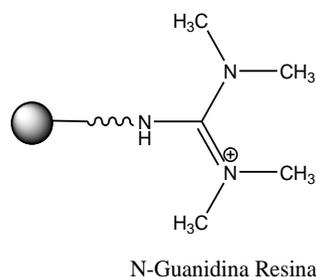


Figura 4.20: Estructura de Resina *N*-Guanidina

Muchas veces el acoplamiento de los aminoácidos no es completo, pudiéndose verificar la presencia de grupos aminos libres con un test colorimétrico con ninidrina. Por lo que la reacción de acoplamiento debe realizarse siempre dos veces seguidas para aumentar el rendimiento. Y además, luego de la segunda reacción de acoplamiento debe realizarse un procedimiento de *capping* (bloqueo) con anhídrido acético. Esto se realiza para evitar que las acilaciones incompletas durante los acoplamientos permitan que los grupos aminos libres remanentes formen cadenas peptídicas más cortas que el péptido final. Estas cadenas peptídicas cortas son muy difíciles de purificar del péptido deseado por su similitud en la secuencia. Al realizarse un *capping* con anhídrido acético se inactivan estos grupos amino que no reaccionaron durante el acoplamiento ^{123,129,218}.

El péptido HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y el péptido N⁴-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH fueron sintetizados en el Laboratorio del Profesor Fabio Gallazi de la Universidad de Missouri (EEUU)¹⁷⁴. Otros dos péptidos utilizados en este trabajo también fueron sintetizados en el Laboratorio del Profesor Fabio Gallazi de la Universidad de Missouri. Estos son el péptido TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ con el grupo protector TFA y el péptido ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH, derivatizado con el compuesto fluorescente en el infrarrojo cercano verde de indocianina (ICG). En las Figuras 4.21 y 4.22 se muestran los HPLC-MS de HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y N⁴-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH. En la Figura 4.23 se muestran la estructura (A) y HPLC-MS (B) de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH.

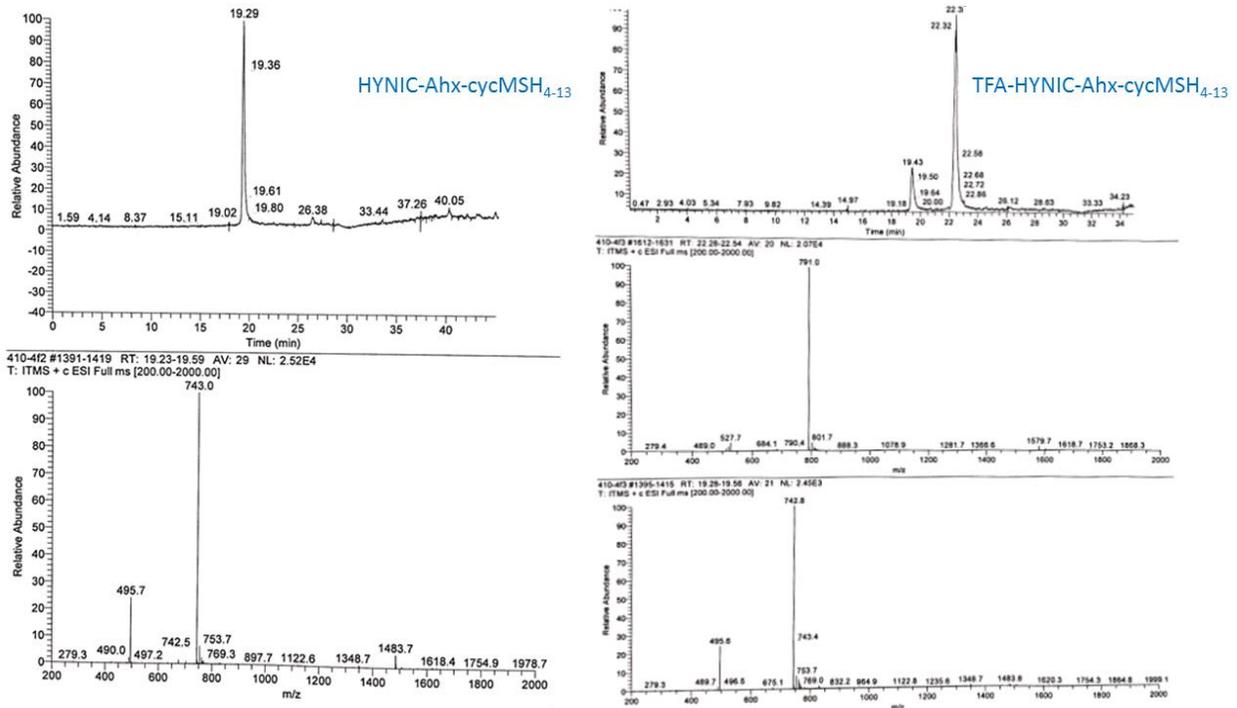


Figura 4.21: HPLC-MS de HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃

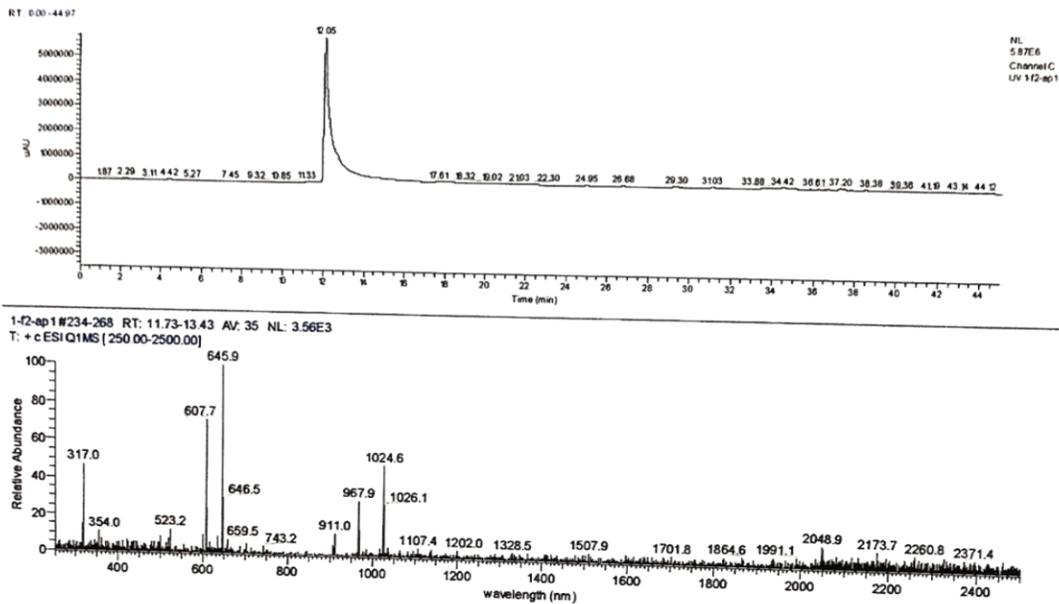


Figura 4.22: HPLC-MS de N4-CO-Re(Arg11)CCMSH

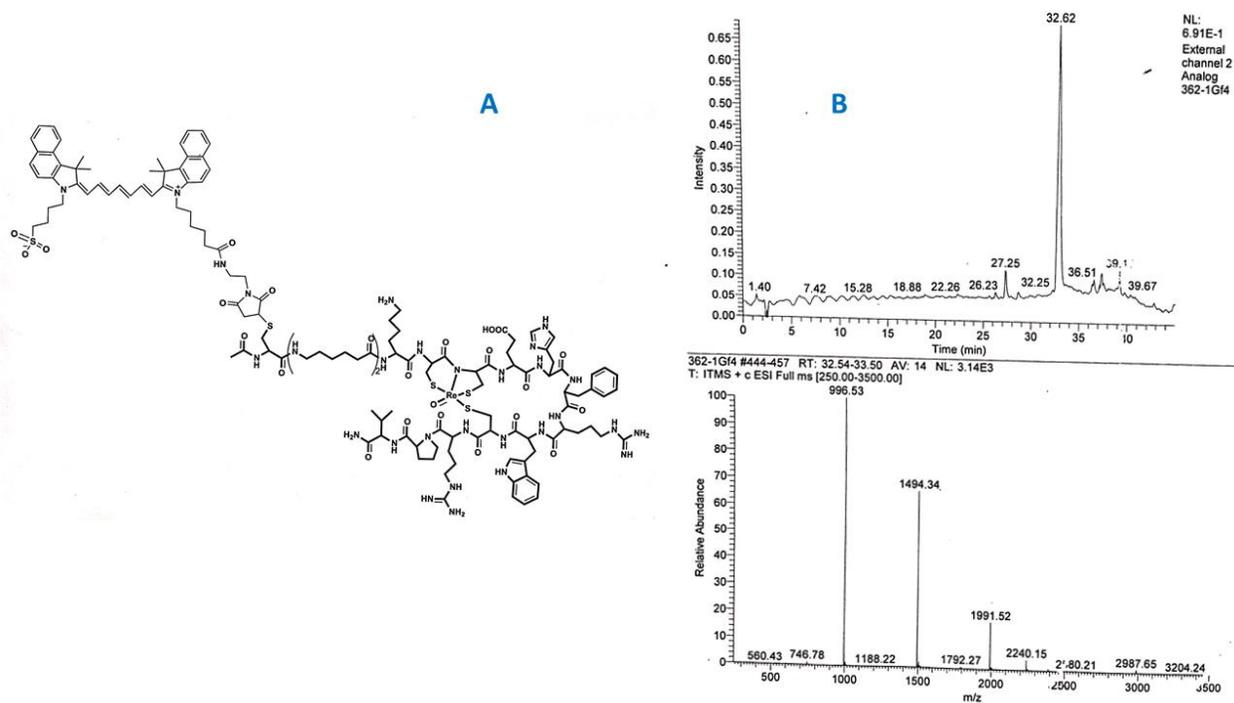


Figura 4.23: Estructura (A) y HPLC-MS (B) de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH

5. MARCACIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE α -MSH CON ^{99m}Tc

5.1. Metodología experimental: Generalidades

- En Uruguay, el pertecneciato de sodio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) empleado en las marcaciones fue obtenido de un generador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aportado por el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas. En EEUU el $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ fue brindado por la Universidad de Missouri.
- En Uruguay, para los estudios *in vivo* en animales se utilizaron protocolos aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias (expediente 240011-002308-14). De la misma manera los estudios en animales realizados en la Universidad de Missouri fueron aprobados para su realización por el Institutional Animal Care and Use Committees, Missouri Univerity.

Se emplearon los siguientes equipos:

- Calibrador de dosis Capintec CRC7
- Contador de centelleo sólido de pozo: detector de cristal de $\text{NaI}(\text{Tl})$ de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC
- HPLC Agilent Serie 1200 Infinity Star equipado con detector gamma GABI y detector UV (λ 240 y 280 nm). Columna de fase reversa C18 (250 mm x 4.6 x 5 μm) Phenomenex Luna.
- Cromatografía en capa fina se realizó utilizando ITLC-SG (Pall Corporation) y Whatman 1 mm (Whatman International Ltd) con distintas fases móviles (Ver apartado 5.1.2)
- 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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, en el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, UdelaR (Montevideo, Uruguay)
- Las imágenes centellográficas se obtuvieron en una gamma cámara Sopher DXR rectangular conectada en serie a un procesador Mirage Segami, en el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, UdelaR.
- Las imágenes micro-SPECT/CT se realizaron en un equipo Siemens Preclinical Inveon PET/SPECT/CT (Siemens Medical Solution Incorporated, TN, EEUU) en el Centro de Imagenología Biomolecular en el Hospital de Veteranos Harry S Truman de la Universidad de Missouri (Missouri, Estados Unidos) ¹⁷⁴.

- Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron en el equipo In-Vivo MS FX PRO Bruker del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN- Facultad de Ciencias) a 800 nm.

5.1.1. Ensayo *in vitro* de unión competitiva (IC₅₀)

La IC₅₀, concentración de péptido requerida para inhibir el 50 % de la unión del radioligando, fue determinada incubando ¹²⁵I-Tyr²-[Nle⁴, D-Phe⁷]α-MSH (NDP), un péptido análogo de α-MSH con afinidad picomolar por los receptores MC1R. Se procede de acuerdo al procedimiento anteriormente publicado ^{174,184}. Resumidamente, se incuban 0.2 millones/pocillo de células de melanoma murino B16/F1 en placa estéril de 24 pocillos, en medio de cultivo DMEM (conteniendo 25 mM HEPES, BSA 0.2 %), durante 24 h a 37 °C. Luego de lavar las células con medio de cultivo, cada pocillo es incubado durante 3 h; con aproximadamente 50.000 cpm de ¹²⁵I-Tyr²-NDP en 0.3 mL de medio de cultivo DMEM, pH 7.4, 0.02 % BSA y concentraciones crecientes de los péptidos análogos de α-MSH en un rango de 10⁻¹³ a 10⁻⁵ M. Luego de 2 h el medio se aspira y las células se lavan dos veces con PBS (fosfato 10 mM pH 7.4, 150 mM NaCl) con 0.2 % BSA. Las células se lisan con 0.5 mL de disolución acuosa de NaOH (1 M) durante 10 minutos. Finalmente, se recoge el medio y 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 ¹²⁵I-Tyr²-NDP en función de la concentración creciente de péptidos análogos de α-MSH estudiados. El valor de IC₅₀ se obtuvo utilizando el Software GraphPad Prism version 4.0.

5.1.2. Marcación con ^{99m}Tc, purificación y estabilidad de los ^{99m}Tc-péptidos α-MSH

Para los péptidos análogos de α-MSH: 1) N_{4II}-cycMSH₄₋₁₀, 2) N_{4II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, 3) HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y 4) N₄-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH se estudiaron diferentes estrategias de marcación con ^{99m}Tc.

Condiciones de marcación estudiadas y optimizadas para cada péptido:

- Péptidos 1) N_{4II}-cycMSH₄₋₁₀ y 2) N_{4II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, se estudiaron dos condiciones:

1. 20 μL del péptido (disolución 1 mg/mL en H_2O) + 0.1 mL SnCl_2 (disolución 1 mg/ mL en H_2O) + 0.5 mL agua + 100 μl $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi). Incubación 15 minutos a temperatura ambiente.
 2. 20 μL del péptido (disolución 1 mg/ml en H_2O) + 50 μL buffer fosfato pH 11.5 + 5 μL de disolución 0.5 M de citrato + 20 μL de SnCl_2 (disolución 2 mg/mL en etanol) + 200 μL $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi). Incubación 30 minutos a 50 °C.
- Péptido 3) HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃:
 1. 20 μL del péptido (disolución 1 mg/mL en H_2O) + 150 μL tricina (100 mg/mL en H_2O) + $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi) + 15 μL SnCl_2 (disolución fresca de 1 mg/ mL en HCl 0.1 N). Incubación 30 minutos a 50 °C.
 - Péptido 4) N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH:
 1. 20 μL de péptido (en disolución de 1 mg/mL en ácido acético 0.01M) + 50 μL de buffer fosfato de sodio dibásico 0.5 M (pH = 11.5) + 5 μL de citrato de sodio (Na_3 -citrato) 0.1M + 50 μL de una disolución preparada en el momento de 1 mg/mL de SnCl_2 en etanol + $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.3 mL; 1.5 – 5.0 mCi). Se incuba a 37° C durante 30 minutos. Después de la incubación el marcado se lleva a pH 7 con el agregado de disolución acuosa de HCl (1 M) (aproximadamente 10 μL).

Para los cuatro péptidos luego de la marcación se realizaron controles de calidad para determinar la pureza radioquímica (PRQ) utilizando las metodologías de HPLC fase reversa e ITLC. Esta última es necesaria para la identificación y cuantificación de la especie reducida de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) también llamada óxido, que no se puede determinar por HPLC ya que por su alta hidrofobicidad queda retenida en la columna.

- Metodología de HPLC en fase reversa C18. Gradiente: t=0-2.9 min, B=3%; t=2.9-3.0 min, B=3-35%; t=3.0-30.0 min, B=35-50%; t=30.0-33.0 min, B=50-90%; t=33.0-38.0 min, B=90-3%. A=0.1 % TFA en H_2O , B=0.1% TFA en acetonitrilo. Detector gamma ChA: (30-1638) keV (unidad: CPS), ChB: (139- 1638) keV (unidad: CPS). Detector UV 2 λ , 280nm (UV A) y 220nm (UV B).

- Sistema ITLC:
 - ITLC-SG-5% BSA, FM= etanol/amoniaco/agua (2/1/5). Rf 0: $^{99m}\text{TcO}_2\text{-H}_2\text{O}$. Rf 0,8-1,0: ^{99m}Tc -péptido, ^{99m}Tc -citrato y $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
 - ITLC-SG, FM= NaCl 0,9%. Rf 0: ^{99m}Tc -péptido, ^{99m}Tc -citrato y $^{99m}\text{TcO}_2\text{-H}_2\text{O}$. Rf 1,0: $^{99m}\text{TcO}_4^-$.
 - ITLC-SG, FM= acetato de amonio 1M / MeOH 1/1 (v/v). Rf 0: $^{99m}\text{TcO}_2\text{-H}_2\text{O}$. Rf 0,8-1,0: ^{99m}Tc -péptido, ^{99m}Tc -citrato y $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Purificación de los péptidos:

La separación de los radioconjugados ^{99m}Tc -péptido se realizó empleando las condiciones HPLC mencionadas en fase reversa C18. A la fracción eluida conteniendo el radioconjugado se le controló la actividad y se diluyó con 500 μL de PBS 0.1 M pH 7.4. Se evaporó el acetonitrilo aplicando una corriente de N_2 . Finalmente, se ajusta el pH a 7 con NaOH diluida y se añade PBS 0.1 M pH 7.4 en caso de ser necesario. Si se van a realizar estudios *in vitro* o *in vivo* se filtra por 0.22 μm .

Evaluación de la estabilidad del marcado:

La estabilidad de los péptidos marcados con ^{99m}Tc purificados se controló por HPLC e ITLC a las 2 y 24 h de incubación a temperatura ambiente.

5.1.3. Evaluación del coeficiente de partición o Log P

El coeficiente de partición (Log P) fue determinado por triplicado según el procedimiento publicado ¹⁷⁴. Para ello 100000 cpm del ^{99m}Tc -péptido purificado se disolvieron en 500 μL de PBS 0.1 M pH 7.4 y 500 μL de 1-octanol. La mezcla bifásica fue agitada vigorosamente en shaker por 1 minuto, y luego centrifugada a 14000 RPM por 10 minutos. Luego, alícuotas de 100 μL fueron tomadas de cada fase para la medición de cuentas un contador de pozo de NaI. El coeficiente de

partición se determinó como el \log_{10} de la relación (cpm 1-octanol/cpm fase acuosa PBS) y representado como la media \pm desviación estándar de nueve mediciones de tres muestras.

5.1.4. Evaluación de unión a proteínas y estabilidad en suero fetal bovino

Se estudió la estabilidad en Suero Fetal Bovino (SFB) y la unión a proteínas de los radioconjugados ^{99m}Tc -péptidos análogos de α -MSH purificados por HPLC con el método previamente descrito. Para ello se incubaron alícuotas de los radioconjugados purificados (150 μL , 50 μCi) en 500 μL de SFB a 37° C, durante 1, 2 y 4 h. Las proteínas fueron precipitadas adicionando 600 μL de acetonitrilo y centrifugadas (1750 g, 5 min). 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 ^{174,184}.

5.1.5. Estudio en células de melanoma murino

En el estudio se utilizaron células de melanoma cutáneo de *Mus musculus*, B16-F1 (ATCC® CRL-6323™)²¹⁹ y B16F10 B16-F10 (ATCC® CRL-6475™)²²⁰. Para ello se procedió a realizar el estudio con los radioconjugados purificados por HPLC, siguiendo un protocolo del Prof. Thomas Quinn (Missouri- EEUU) ¹⁷⁴. Brevemente, 2×10^5 células se sembraron en placas de 24 pocillos durante toda la noche para permitir la adhesión celular a las mismas, con medio de cultivo DMEM alto en glucosa, 10 % SFB, 100 U/L y 100 g/L de penicilina/estreptomicina. Luego de la incubación durante una noche a 37 °C las células fueron utilizadas para realizar estudios de unión, internalización, externalización y bloqueo.

Luego de lavar dos veces con medio de cultivo DMEM-0.2 % BSA, las células fueron incubadas a 25 °C durante 20, 40, 60, 90 y 120 min con 300000 cpm del radioconjugado ^{99m}Tc -péptido en 300 μL de medio DMEM-0.2 % BSA (n = 4). Luego del tiempo de incubación, el medio fue aspirado y las células se lavaron dos veces con 500 μL de PBS-0.2 % BSA pH 7.4, 0.01M. La unión a membrana e internalización del radioconjugado se determinó lavando las células con 500 μL de una disolución buffer ácida (acetato de sodio 40 mM, pH 4.5) con el fin de remover el

radioconjugado unido a la membrana y la actividad remanente dentro de las células se obtuvo mediante la lisis con 500 μ L 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, las células fueron incubadas con 300000 cpm de los diferentes radioconjugados durante 2 h a 25 °C en 300 μ L de medio DMEM-0.2 % BSA (n = 4). Luego de la incubación se removió la actividad unida de forma no específica por aspiración del medio y las células se lavaron 2 veces con 500 μ L de PBS-0.2 % BSA pH 7.4, 0.01M. 300 μ L de medio fresco DMEM-0.2 % BSA fue agregado a los pocillos y las células se incubaron 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.

El bloqueo de la unión específica fue estudiado en paralelo con estudios de internalización, mediante la co-incubación de los radioconjugados con el péptido sin marcar. Así, 300000 cpm de los diferentes radioconjugados con 20 μ g del péptido correspondiente sin marcar durante 2 h a 25 °C en 300 μ L de medio DMEM-0.2 % BSA (n = 4).

5.1.6. Evaluación *in vivo* de perfiles de biodistribución en modelo murino

Los estudios de *in vivo* se realizaron en hembras *Mus musculus* C57 BL/6J, entre 6 - 10 semanas de edad y 18-24 g de peso. Ratonés con melanoma inducido por células de melanoma murino B16-F. La inducción del tumor de melanoma se realizó inyectando 2.5×10^5 células B16-F1 en 0.1 mL de buffer fosfato salino pH 7.4 en el flanco derecho. Luego de 10 a 15 días de la inoculación los tumores alcanzan un peso de 0.2 g - 0.3 g aproximadamente y se pueden realizar los estudios *in vivo* de biodistribución o imagenología.

Los estudios de biodistribución para los cuatro radioconjugados ^{99m}Tc -péptido se realizaron en ratones hembras C57 BL/6J portadores de melanoma. Aproximadamente 1- 3 MBq del radioconjugado purificado por HPLC se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical luego de 1, 2, 3, 4 y 24 h post inyección (n = 5 para cada punto). 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. Todos los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. 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 $p < 0.05$.

5.1.7. Evaluación *in vivo* en modelo murino: imágenes centellográficas y micro SPECT/CT

Los estudios de imagenología para los cuatro radioconjugados ^{99m}Tc -péptido se realizaron en ratones hembras C57 BL/6J portadores de melanoma murino. Aproximadamente 18.5 MBq de cada radioconjugado purificado por HPLC fue inyectado por vía intravenosa a través de la vena de la cola ($n = 3$). Luego de 1 o 2 h de la administración, los animales son anestesiados con anestesia general Ketamina (10 mg/kg) – Xilazina (100 mg/kg) por vía intraperitoneal para la adquisición de imágenes estáticas con la gammacámara o micro-SPECT/CT.

5.1.8. Evaluación *in vivo* en modelo murino mediante trazador fluorescente (ICG- α -MSH)

40 μg de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH se disolvieron en 50 μL de DMSO. De esta disolución se realizó una toma de 35 μL y se diluyó con H₂O destilada filtrada por 0.22 μm hasta 100 μL . La disolución se filtró por 0.22 μm y 0.1 mL se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola de los ratones hembras C57 BL/6J portadores de melanoma murino. Luego de 1 h p.i se obtuvieron imágenes fluorescentes empleándose el equipo In-Vivo MS FX PRO del CIN.

MARCACIÓN: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2. Resultados

5.2.1. Ensayo *in vitro* de unión competitiva (IC₅₀)

La IC₅₀ (concentración de péptido necesaria para inhibir 50% de la unión de radioligando) fue realizada en células B16 F1, el ensayo de competencia para los cuatro péptidos se realizó contra ¹²⁵I-Tyr²-[Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH (NDP), un péptido análogo de la α -MSH radioiodado con afinidad del orden picomolar. Los resultados obtenidos para los cuatro péptidos estudiados se muestran en la Tabla 5.1 y las gráficas correspondientes en la Figura 5.1.

	Péptido	IC ₅₀ (nM)
1	N4 _{II} -cycMSH ₄₋₁₀	1.68
2	N4 _{II} -Ahx-cycMSH ₄₋₁₃	0.77
3	HYNIC-Ahx-cycMSH ₄₋₁₃	0.30
4	N4-CO-Re(Arg ¹¹)CCMSH	2.45

Tabla 5.1: IC₅₀ de los péptidos

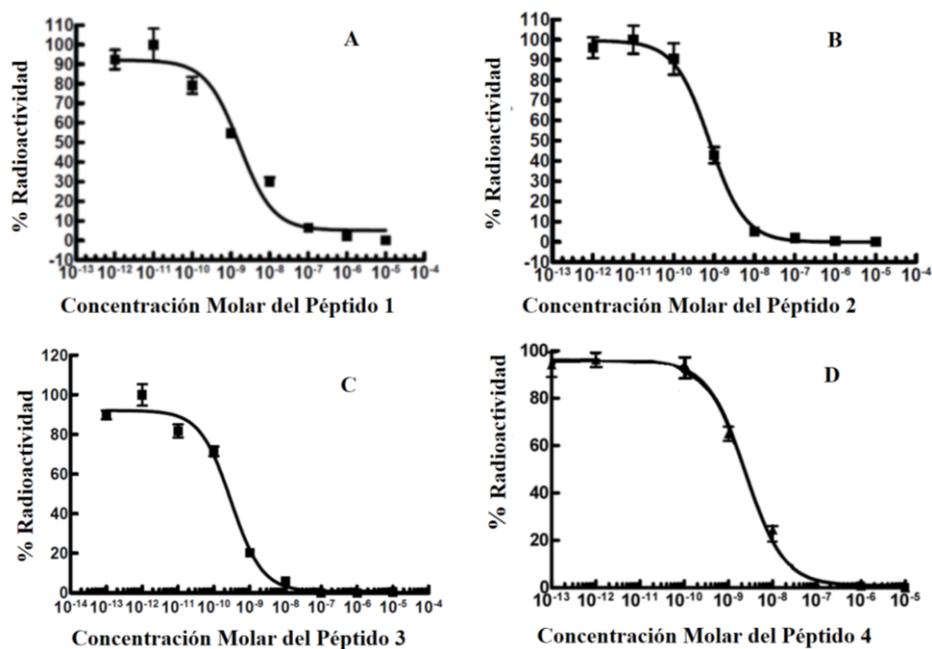


Figura 5.1: Curvas dosis-respuesta: A. N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, B. N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, C. HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, D. N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH

5.2.2. Marcación con ^{99m}Tc , purificación y estabilidad de los ^{99m}Tc -péptidos α -MSH

La condición de marcación a emplear depende del ligando bifuncional unido al péptido. Para los cuatro péptidos estudiados se optimizaron las condiciones de marcación hasta que permitieron una obtención del radioconjugado ^{99m}Tc -péptido con una PRQ ≥ 95 %. Los radiofármacos de diagnóstico no presentan actividad farmacológica dado que se administran en cantidades trazadores en el rango nano y picomolar para obtener de una forma no invasiva la descripción detallada de la morfología y fisiología estudiada ^{99,96,221}. Para los radiofármacos de diagnóstico se especifica que la PRQ sea mayor a 90 % ^{99,96,221}, requisito que se logró cumplir para los cuatro péptidos.

Para los cuatro péptidos marcados con ^{99m}Tc fue posible controlar la identidad y purificar el péptido marcado del no marcado por HPLC. También se controló: pH, apariencia de la disolución, identidad y estabilidad del marcado purificado por HPLC a las 2 y 24 horas. No encontrándose cambio en ninguno de los marcados a estos tiempos.

Para los péptidos 1) **N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀** y 2) **N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃**, se estudiaron las siguientes condiciones:

1. 20 μL del péptido (disolución 1 mg/mL en H_2O) + 0.1 mL SnCl_2 (disolución 1 mg/ mL en H_2O) + 0.5 mL agua + 100 μl $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi). Incubación 15 minutos a temperatura ambiente.
2. 20 μL del péptido (disolución 1 mg/ml en H_2O) + 50 μL buffer fosfato pH 11.5 + 5 μL de disolución 0.5 M de citrato + 20 μL de SnCl_2 (disolución 2 mg/mL en etanol) + 200 μL $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi). Incubación 30 minutos a 50 °C. Ver cromatograma HPLC Figura 5.2

Con la condición 1) para ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ se obtuvo una PRQ = 70.7 %, con tiempo de retención (t_R) de 16.7 min y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en t_R = 3.02 min. En UV se ve el péptido no marcado N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ en t_R = 14.8 min.

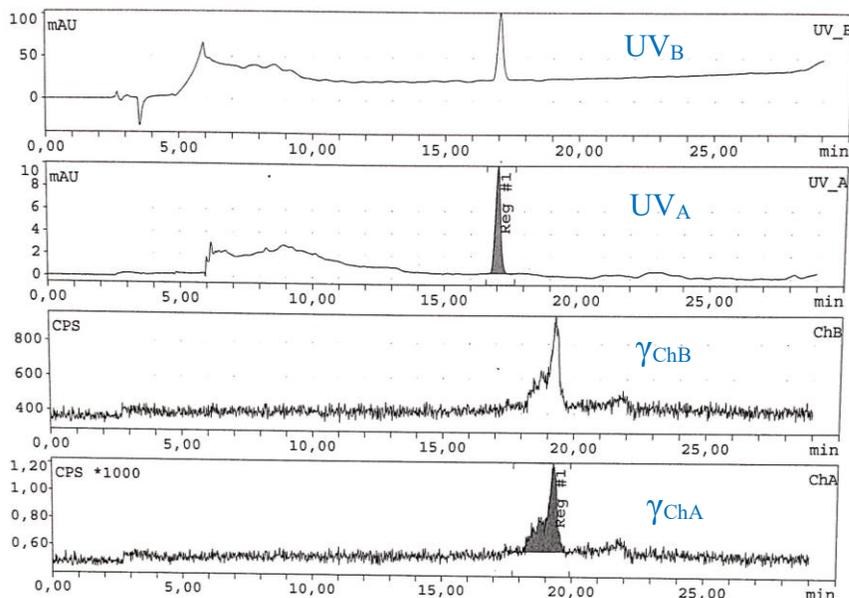


Figura 5.2: Cromatograma HPLC de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$ con condición 2.

Con la condición 2) para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$ se obtuvo una PRQ = 100 %, con tiempo de retención (t_R) de 19.28 min. En UV se ve el péptido no marcado N4_{II-cycMSH4-10} en t_R = 17.0 min. Para el radioconjugado $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$ también se utilizó la segunda condición de marcado, obteniéndose una PRQ = 100 %, con t_R = 14.7 min y en UV t_R = 13.4 min. Ver cromatograma en Figura 5.3

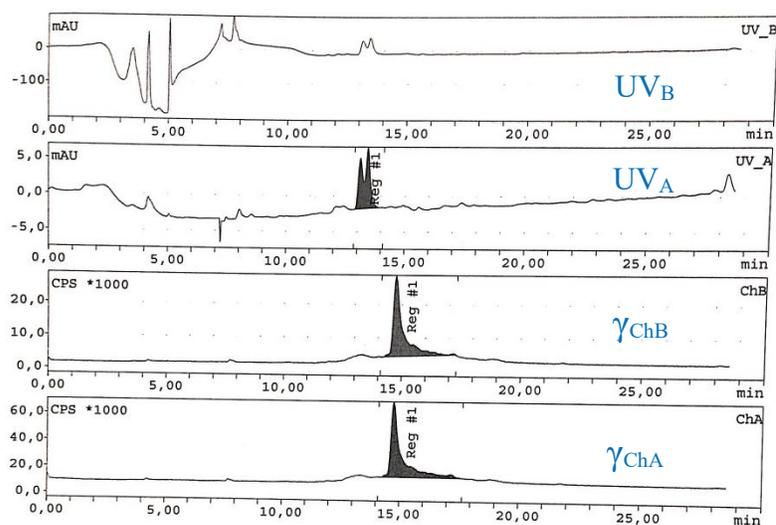


Figura 5.3: Cromatograma HPLC de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$ con condición 2.

Para el péptido 3) **HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃** se estudiaron diferentes condiciones de marcación empleando SnCl₂ como agente reductor y tricina como co-ligando para completar la esfera de coordinación del ^{99m}Tc.

De esta forma para la siguiente condición de reacción (a):

- a) 20 µL del péptido (disolución 1 mg/mL en H₂O) + 150 µL tricina (100 mg/mL en H₂O) + ^{99m}TcO₄⁻ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi) + 30 µL SnCl₂ (disolución fresca de 1 mg/ mL en HCl 0.1 N). Incubación 30 minutos a 50 °C.

Se estudió el efecto en la PRQ del cambio de una variable a la vez. Siendo las variables estudiadas los µL de SnCl₂ (disolución 1 mg/mL en HCl 0.1N), los µL de tricina (solución 100 mg/mL en H₂O), la temperatura y el tiempo de reacción. En la Tabla 5.2 se detallan los diferentes resultados obtenidos en las distintas condiciones de marcación.

SnCl ₂ (1 mg/mL en HCl 0.1N)		Tricina (100 mg/mL en H ₂ O)		Temperatura		tiempo	
µL	PRQ (%)	µL	PRQ (%)	°C	PRQ (%)	min	PRQ (%)
5	100	150	100	25	47	15	<20
15	100	300	99.5	37	98	30	100
30	100	-	-	50	100	60	100

Tabla 5.2: Estudio de diferentes condiciones de marcación para HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ variando una única variable en la condición de marcación (a).

Considerando las diferentes variables estudiadas en la marcación y las PRQ obtenidas para la realización de estudios fisicoquímicos, *in vitro* e *in vivo* se utilizó la condición:

- 20 µL del péptido (disolución 1 mg/mL en H₂O) + 150 µL tricina (100 mg/mL en H₂O) + ^{99m}TcO₄⁻ (0.1 – 0.5 mL; 1.5 – 15.0 mCi) + 15 µL SnCl₂ (disolución fresca de 1 mg/ mL en HCl 0.1 N). Incubación 30 minutos a 50 °C.

Esta condición se utilizó también para marcar el péptido **TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃** con el grupo protector TFA en HYNIC. Al controlarse por HPLC se observó un pico similar al

obtenido en la marcación de HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, verificándose luego al obtener el mismo pico al co-inyectar los marcados obtenidos para HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃. En la Figura 5.4 puede apreciarse los diferentes cromatogramas. ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ se aprecia en la Figura 5.4.1 con PRQ = 100 %, t_R= 19.6 min, el péptido no marcado se observa en t_R = 18.6 min. Como se puede apreciar el pico del marcado no es un único pico, esto se debe a los diferentes isómeros/conformaciones que se pueden generar con el sistema HYNIC-tricina-^{99m}Tc ^{94,101,109}. En la Figura 5.4.2 se aprecia el cromatograma HPLC de la marcación de TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, PRQ = 100 %, t_R = 19.7 min, el péptido no marcado se observa en t_R = 18.7 min. En la Figura 5.4.2 se aprecia el cromatograma HPLC de la co-inyección HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ + TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, PRQ = 100%, t_R = 20.1 min.

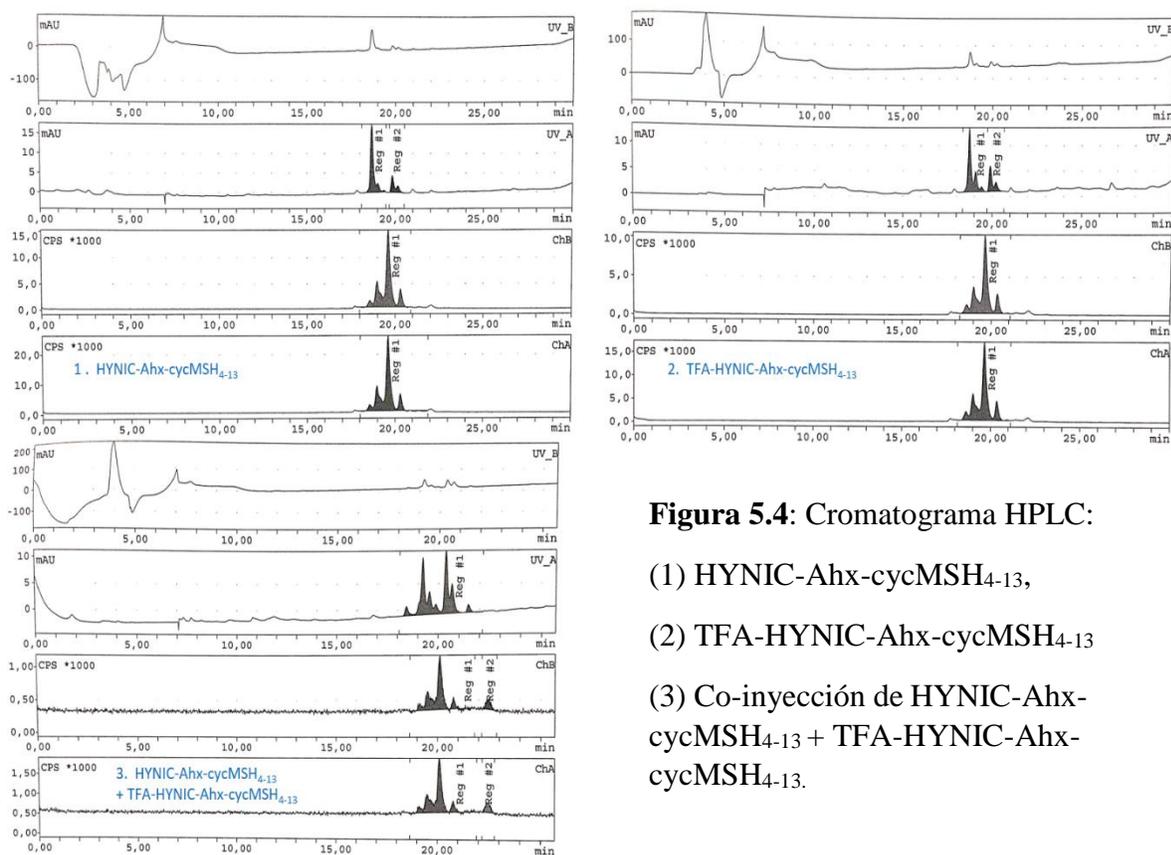


Figura 5.4: Cromatograma HPLC:

- (1) HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃,
- (2) TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃
- (3) Co-inyección de HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ + TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃.

Para el péptido 4) **N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH** se ensayó una condición de marcación basada en la descrita por *Maina et. al.*¹⁰⁵ para este ligando bifuncional. De esta forma, la marcación fue realizada utilizando como agente reductor SnCl₂ en una incubación a 37 °C durante media hora. Como se mencionó anteriormente, el citrato de sodio agregado forma un complejo intercambiador con el radionucleido inicialmente mediante una reacción cinéticamente favorable, sin embargo, luego el radionucleido coordina con los cuatro átomos de nitrógeno del ligando tetraamino dado que esta reacción es más estable termodinámicamente. En estas condiciones de marcado descrita en la sección de metodologías 5.1.2 se logró una pureza radioquímica mayor a 98 % por HPLC y la presencia de la forma coloide (^{99m}TcO₂ · xH₂O), determinada por ITLC fue menor al 2 %. En la Figura 5.5 se aprecia el cromatograma HPLC de la marcación de N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH, con PRQ = 100 %, t_R = 17.6 min y del péptido no marcado con un t_R = 17.0 min.

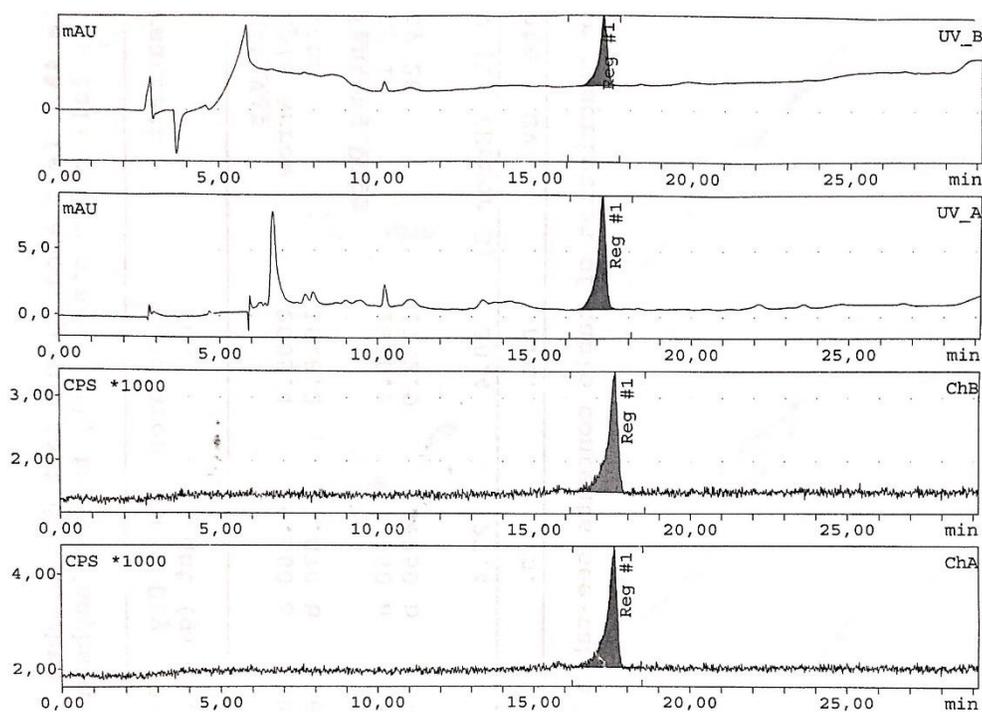


Figura 5.5: Cromatograma HPLC de ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH

5.2.3. Determinación de los coeficientes de partición o Log P

Para los radioconjugados purificados se evaluó el carácter hidrofílico mediante el cálculo del coeficiente de reparto octanol-agua expresado como Log P. Los valores de Log P se presentan en la Tabla 5.3. Como se puede apreciar el radioconjugado más hidrofóbico es $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ y el más hidrofílico es $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$.

	Radioconjugado ^{99m}Tc-péptido	Log P
1	$^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$	- 0.42 ± 0.05
2	$^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH}_{4-13}}$	- 1.17 ± 0.20
3	$^{99m}\text{Tc-(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$	-1.15 ± 0.04
4	$^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$	- 1.75 ± 0.01

Tabla 5.3: Log P para los diferentes radioconjugados obtenidos

5.2.4. Evaluación de unión a proteínas y estabilidad en suero fetal bovino

Se estudió el grado de unión a proteínas en SFB para los cuatro radioconjugados purificados a 1, 2 y 4 horas. Se puede apreciar (Figura 5.6) que el porcentaje de unión (% UP) para los cuatro radioconjugados aumenta con el tiempo. El péptido $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ es el que presenta menor % UP, manteniéndose por debajo de 10 % luego de 4 horas. $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH}_{4-13}}$ y $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ presentan un perfil bastante similar, con % UP próximo a 10 % en la primera hora, aumentando menos de un 5 % en las 2 horas y manteniéndose debajo de 20 % a las 4 horas. El radioconjugado $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ fue el que presentó mayor % UP principalmente a las 4 horas, estando en aproximadamente un 32 %. $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ fue el que presentó mayor incremento de % UP con el tiempo, pasando de un 10 % en la primera hora a aproximadamente un 20 % a las 2 horas y un 32 % a las 4 horas.

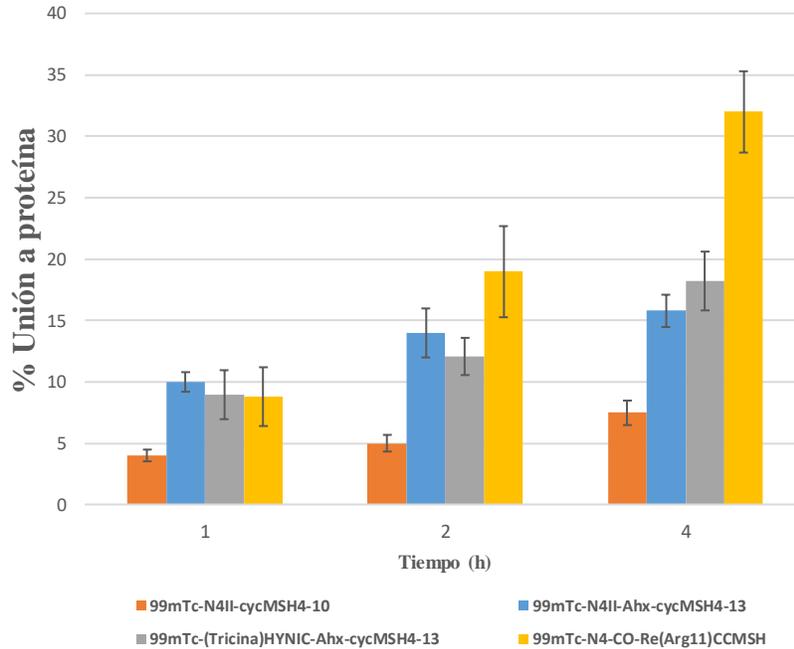


Figura 5.6: Porcentaje de unión a proteínas de los radioconjugados

Se evaluó la estabilidad de los cuatro radioconjugados en SFB a 37° C por 1, 2 y 4 h. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 5.7. El radioconjugado ^{99m}Tc -HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ resultó ser el menos estable en el tiempo estudiado, disminuyendo la PRQ de un 95 % en la primera hora a un 88 % a las 2 horas y a un 82 % a las 4 horas. ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹) CCMSH fue el más estable durante las 4 horas del estudio, disminuyendo la PRQ de un 98 % en la primera hora a 97 % a las 2 horas y un 95 % a las 4 horas. ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ también fue estable durante las 4 horas, disminuyendo la PRQ de un 97 % en la primera hora a 95 % a las 2 horas y un 92 % a las 4 horas. Sin embargo, ^{99m}Tc -N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fue estable en las primeras 2 horas, luego disminuyendo su PRQ. En la primera hora la PRQ de éste era de 98 %, a las 2 horas de incubación en SFB disminuyó levemente a 96 % pero a las 4 horas disminuyó hasta 84 %.

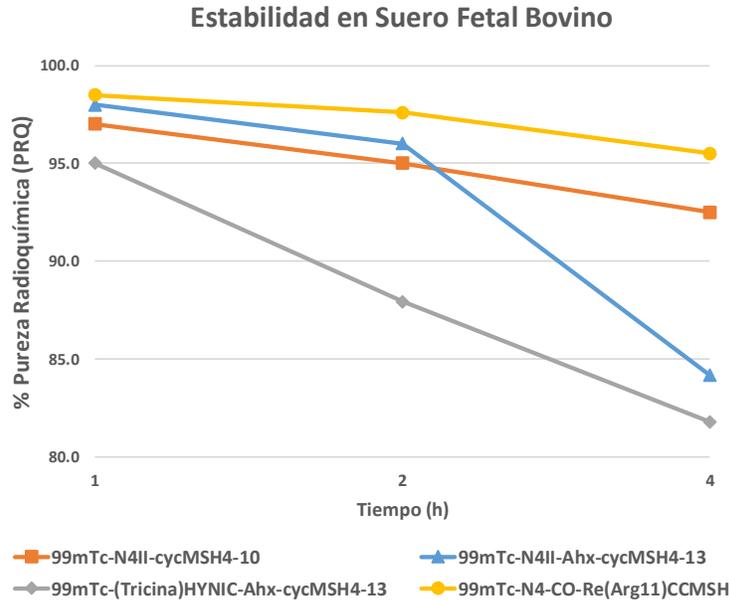


Figura 5.7: Estabilidad en Suero Fetal Bovino de los radioconjugados

5.2.5. Estudio en células de melanoma murino

Se estudió unión a membrana, internalización, externalización y bloqueo por péptido frío para los cuatro radioconjugados en células B16 F1 a diferentes tiempos. Para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ además se realizaron los estudios en células en B16 F10, las cuales son altamente metastásicas.

Para $^{99m}\text{Tc-N4II-cycMSH4-10}$ los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.8 (A, B y C). Como se puede apreciar en Fig. 5.8 (A), $^{99m}\text{Tc-N4II-cycMSH4-10}$ presentó una rápida unión a membrana e internalización. La internalización aumentó hasta los 90 min luego comenzó a descender la unión e internalización. El estudio de externalización Fig. 5.8 (B) reveló que luego de 2 horas de incubación en medio de cultivo, permanecía remanente la radioactividad total internalizada un 27.9 ± 1.1 % y unido a membrana un 4.1 ± 1.3 %. La unión e internalización específica de $^{99m}\text{Tc-N4II-cycMSH4-10}$ fue inhibida en 2 horas hasta un 25 % por NDP y hasta un 55 % por el péptido frío, ver Fig. 5.8 (C).

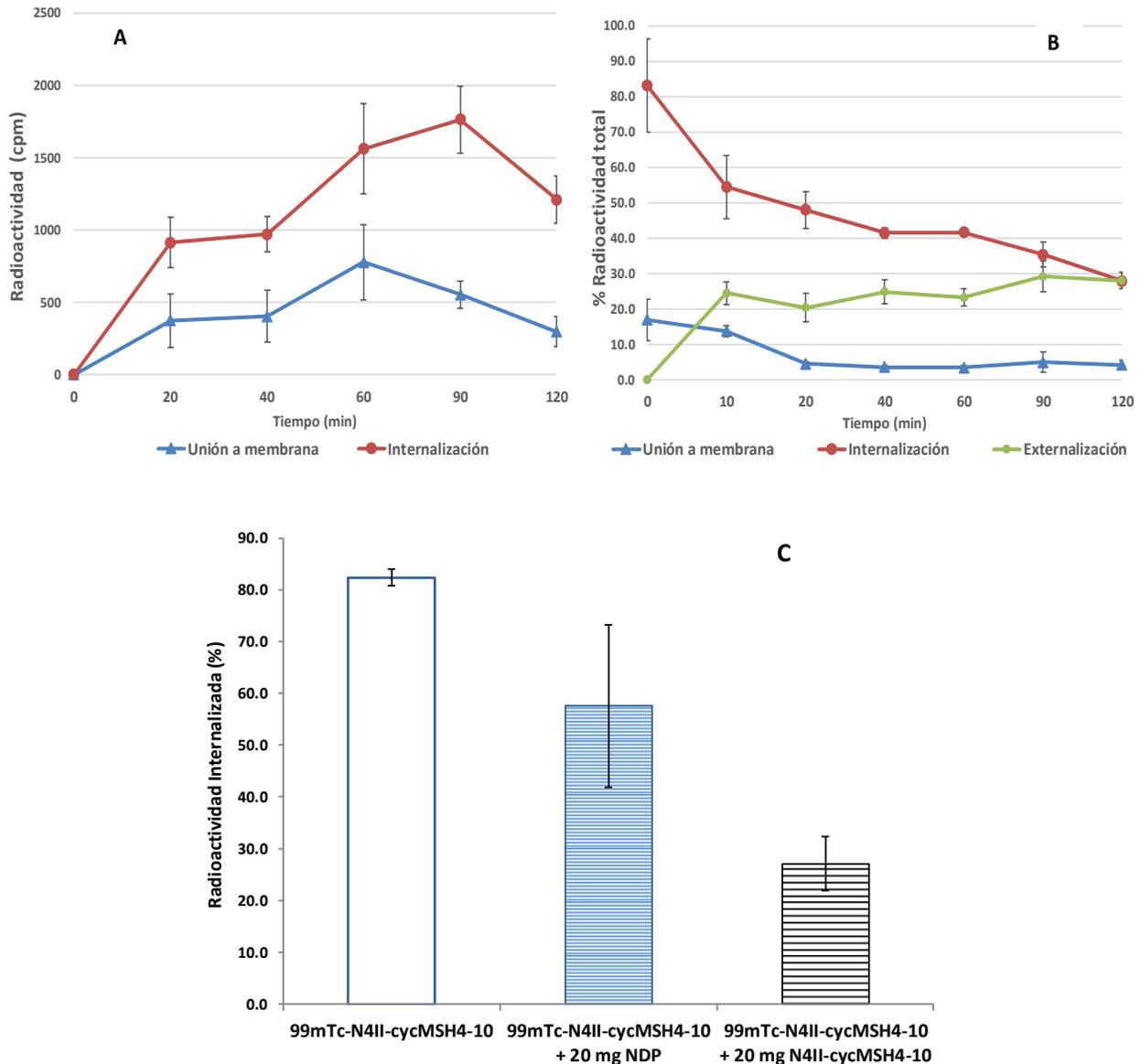


Figura 5.8: Estudios de unión a membrana celular, internalización y bloqueo de $^{99m}\text{Tc-N4II-cycMSH4-10}$ en células B16 F1. En gráfica (A) se muestra la radioactividad unida e internalizada en las células. La gráfica (B) muestra el porcentaje de radioactividad externalizada luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes de radioactividad total a diferentes tiempos corresponden al porcentaje de radioactividad que permanece internalizada, unida o fue externalizada. En la gráfica (C) se muestra el porcentaje de actividad internalizada con y sin bloqueo con el péptido frío (sin marcar) y el análogo NDP.

Para **^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃** los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.9 (A, B y C). Como se puede apreciar en Fig. 5.9 (A), ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ presentó una rápida unión e internalización. La internalización se incrementó considerablemente a lo largo del tiempo del estudio (2 horas). La unión a membrana, sin embargo, se mantuvo constante luego de los 40 min. El estudio de externalización Fig. 5.9 (B) reveló que luego de 2 horas de incubación en medio de cultivo, se externalizó un 34.4 ± 2.9 %, permaneciendo un 43.9 ± 2.5 % aún internalizado a las 2 horas. Del estudio de bloqueo Fig. 5.9 (C) se puede observar que luego de 2 horas la internalización de ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fue bloqueada en un 50 % por NPD y en un 66 % por el péptido frío (N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃).

Con **^{99m}Tc-(Tricina)-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃**, también se observó un aumento de la actividad unida e internalizada durante las 2 horas de incubación, ver Figura 5.10 (A). Luego de la internalización en el estudio de externalización Figura 5.10 (B), un 44.7 ± 1.3 % de la actividad inicialmente internalizada permaneció remanente dentro de las células luego de 2 horas. El % de actividad unida a membrana en el estudio de externalización, permaneció relativamente constante luego de los 20 min, obteniéndose luego de 2 horas un remanente de 9.5 ± 0.2 %. En el estudio de competencia con 20 µg del péptido no marcado HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, Figura 5.10 (C), la unión específica de ^{99m}Tc-(Tricina)-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ a las células de melanoma murino B16 F1 fue inhibido en un 70 % con la adición del péptido frío.

Para **^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹) CCMSH** se realizó el estudio en células de melanoma murino B16F1 (Figura 5.11) y en células de melanoma murino metastásico B16F10 (Figura 5.12). En el estudio con las células B16F1, se observó un aumento en la actividad internalizada durante las 2 horas del estudio de internalización (Figura 5.11A). La actividad unida a membrana aumento inicialmente en los 20 min y luego se mantuvo constante. Sin embargo, con B16F10 el aumentó en la internalización y unión se produjo principalmente hasta los 40 min de incubación, (Figura 5.12A). El estudio de externalización en B16F1 (Fig. 5.11B) reveló que luego de 2 horas de incubación en medio de cultivo, de la actividad total internalizada inicialmente se externalizó al medio de cultivo un 46.0 ± 4.5 %. Para las células B16F10 (Fig. 5.12B) se externalizó un 44.4 ± 7.5 %, con un 12.5 ± 2.4 % unido a membrana y un 75.7 ± 3.6 % internalizado a las 2 horas de incubación en medio de cultivo. En el estudio de competencia con el péptido frío se observó una

disminución en la internalización de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})$ CCMSH del 44 %, en B16F1 Figura 5.11 (C) y del 26 % en las células B16F10 Figura 5.12 (C).

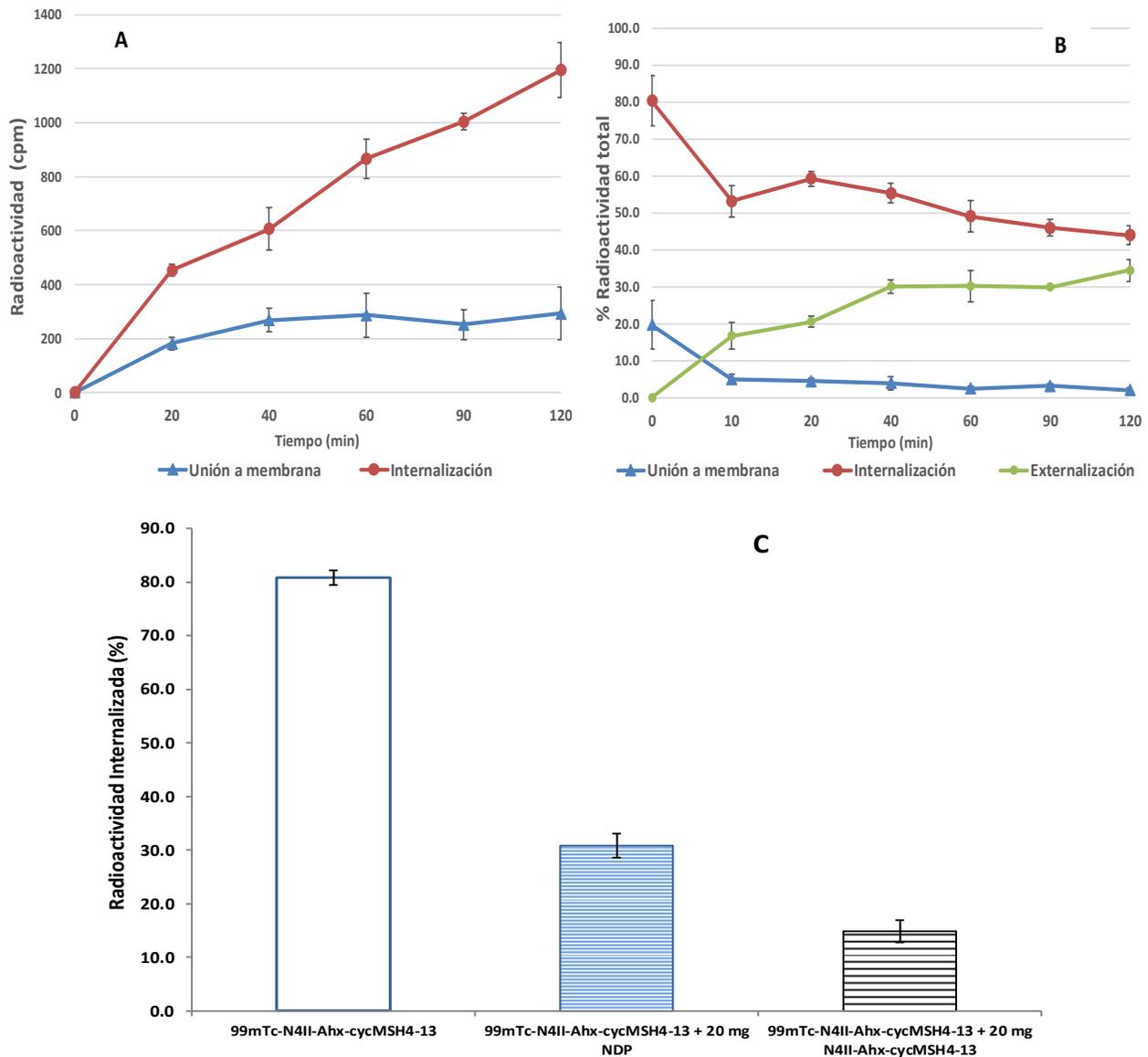


Figura 5.9: Estudios de unión a membrana celular, internalización y bloqueo de $^{99m}\text{Tc-N4II-Ahx-cycMSH4-13}$ en células B16 F1. En gráfica (A) se muestra la radioactividad unida e internalizada en las células. La gráfica (B) muestra el porcentaje de radioactividad externalizada luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes de radioactividad total a diferentes tiempos corresponden al porcentaje de radioactividad que permanece internalizada, unida o fue externalizada. En la gráfica (C) se muestra el porcentaje de actividad internalizada con y sin bloqueo con el péptido frío (sin marcar) y el análogo NDP.

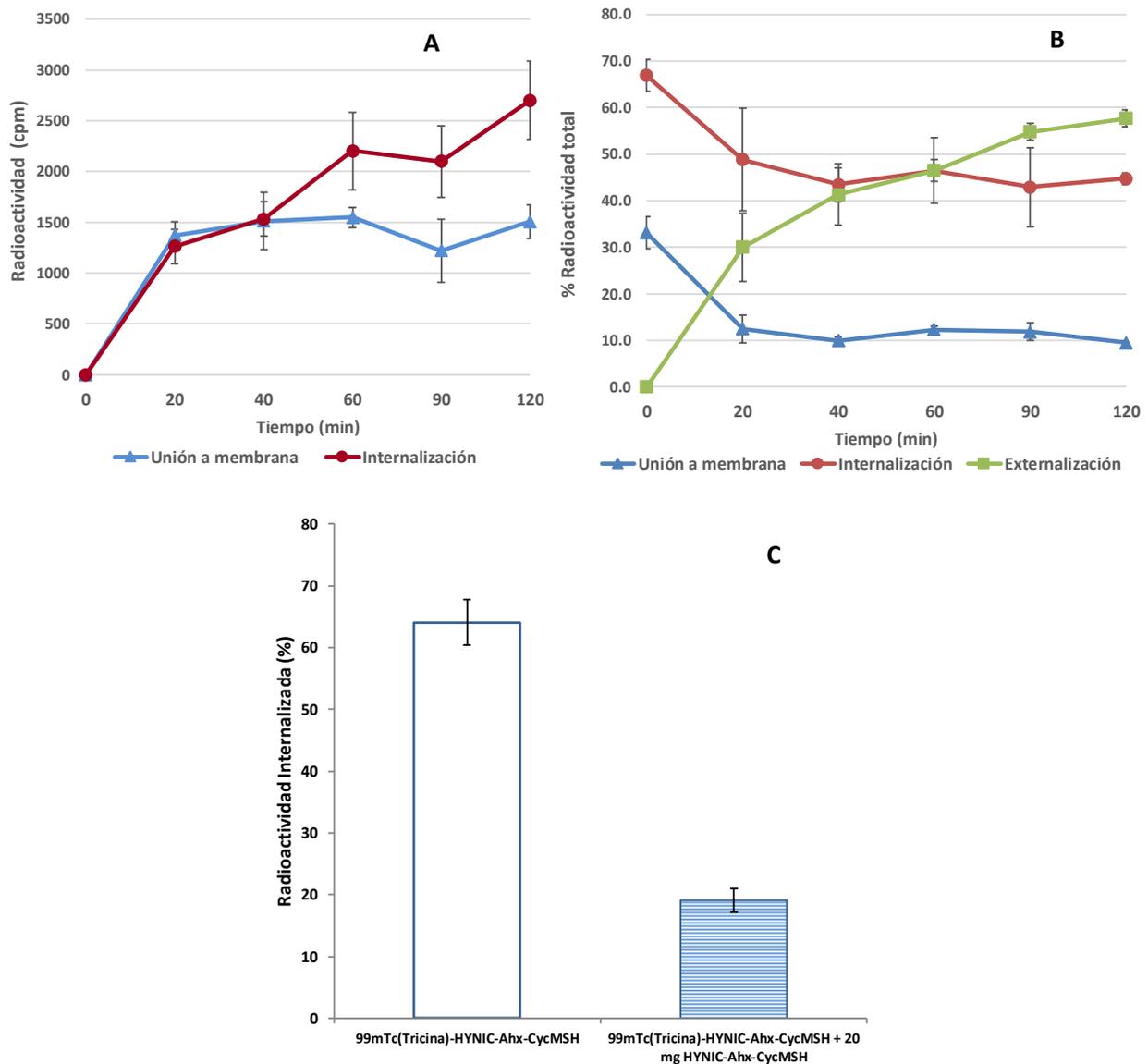


Figura 5.10: Estudios de unión a membrana celular, internalización y bloqueo de ^{99m}Tc -(Tricina)-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ en células B16 F1. En gráfica (A) se muestra la radioactividad unida e internalizada en las células. La gráfica (B) muestra el porcentaje de radioactividad externalizada luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes de radioactividad total a diferentes tiempos corresponden al porcentaje de radioactividad que permanece internalizada, unida o fue externalizada. En la gráfica (C) se muestra el porcentaje de actividad internalizada con y sin bloqueo con el péptido frío (sin marcar).

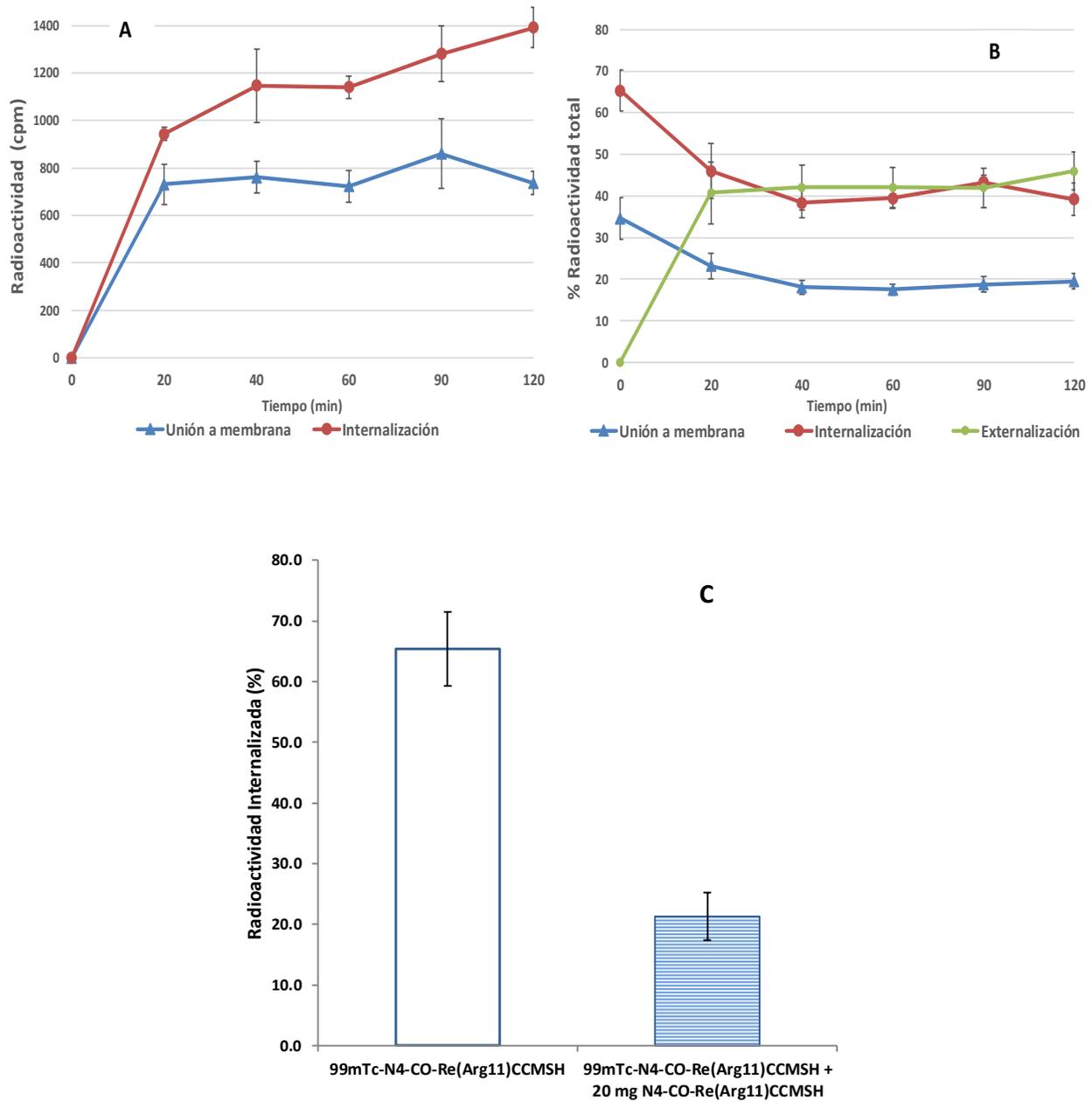


Figura 5.11: Estudios de unión a membrana celular, internalización y bloqueo de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ en células B16 F1. En gráfica (A) se muestra la radioactividad unida e internalizada en las células. La gráfica (B) muestra el porcentaje de radioactividad externalizada luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes de radioactividad total a diferentes tiempos corresponden al porcentaje de radioactividad que permanece internalizada, unida o fue externalizada. En la gráfica (C) se muestra el porcentaje de actividad internalizada con y sin bloqueo con el péptido frío (sin marcar).

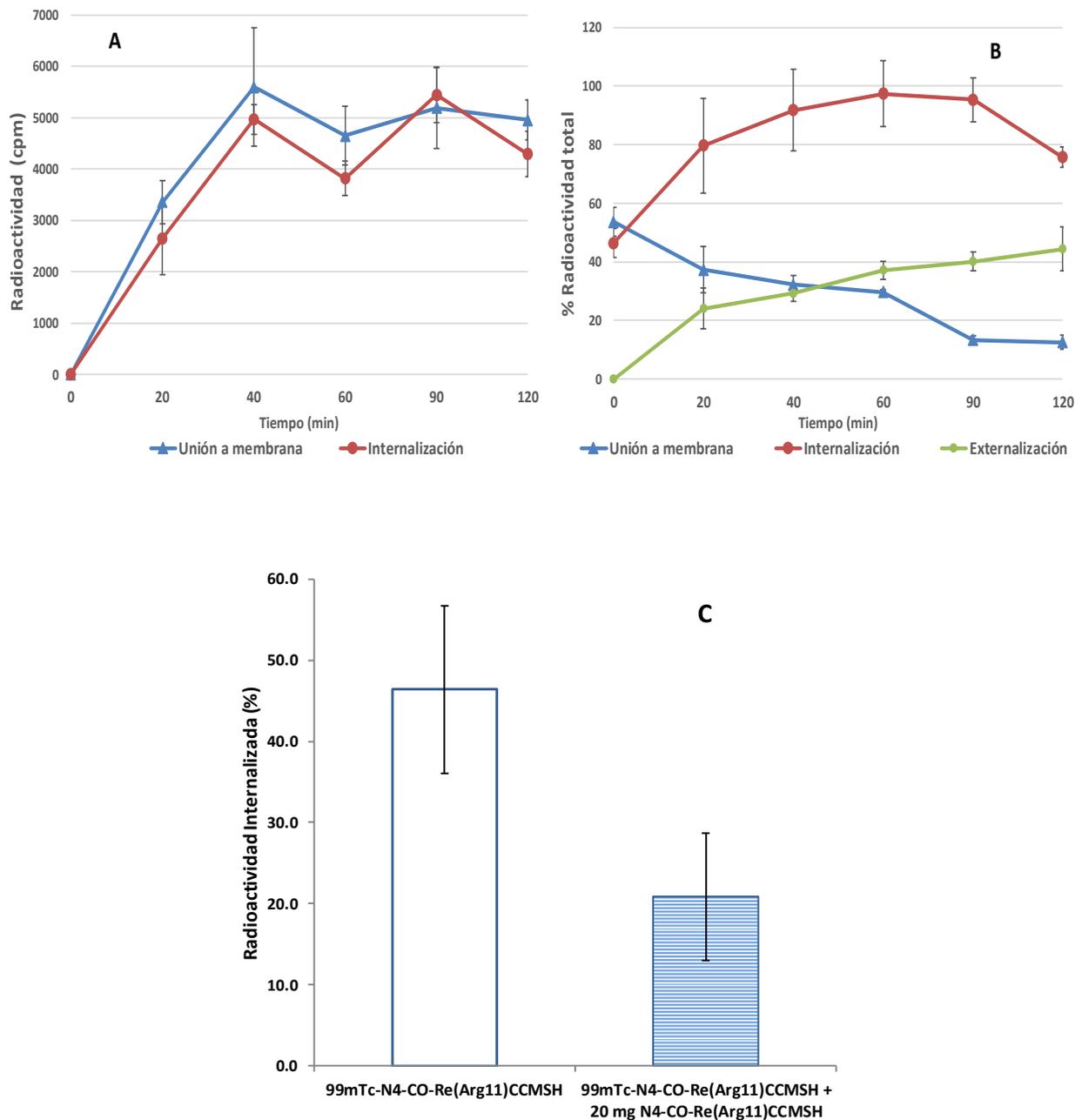


Figura 5.12: Estudios de unión a membrana celular, internalización y bloqueo de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg11)CCMSH}$ en células B16 F10. En gráfica (A) se muestra la radioactividad unida e internalizada en las células. La gráfica (B) muestra el porcentaje de radioactividad externalizada luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes de radioactividad total a diferentes tiempos corresponden al porcentaje de radioactividad que permanece internalizada, unida o fue externalizada. En la gráfica (C) se muestra el porcentaje de actividad internalizada con y sin bloqueo con el péptido frío (sin marcar).

5.2.6. Evaluación *in vivo* de perfiles de biodistribución en modelo murino

A los cuatro radioconjugados ^{99m}Tc -péptido obtenidos se les evaluó la captación tumoral y perfiles de biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma a 1, 2, 4 y 24 horas post inyección (p.i). A continuación, se presentan los resultados obtenidos con cada radioconjugado.

➤ ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀

Los resultados se muestran en la Figura 5.13 y Tabla 5.4. La captación tumoral fue mayor a las 2 horas p.i, siendo de 1.56 ± 1.20 % Act/g. A 1h, 4 h y 24h p.i la captación tumoral fue de 1.02 ± 0.89 % Act/g, 1.45 ± 0.81 % Act/g y 0.57 ± 0.16 % Act/g, respectivamente. No se encontró diferencia significativa en la captación tumoral a 2 h y 4 h p.i ($p > 0.05$). La eliminación fue principalmente por vía renal, eliminándose aproximadamente el 59 % de radioactividad a las 2 h p.i y el 83 % a las 24 h p.i.

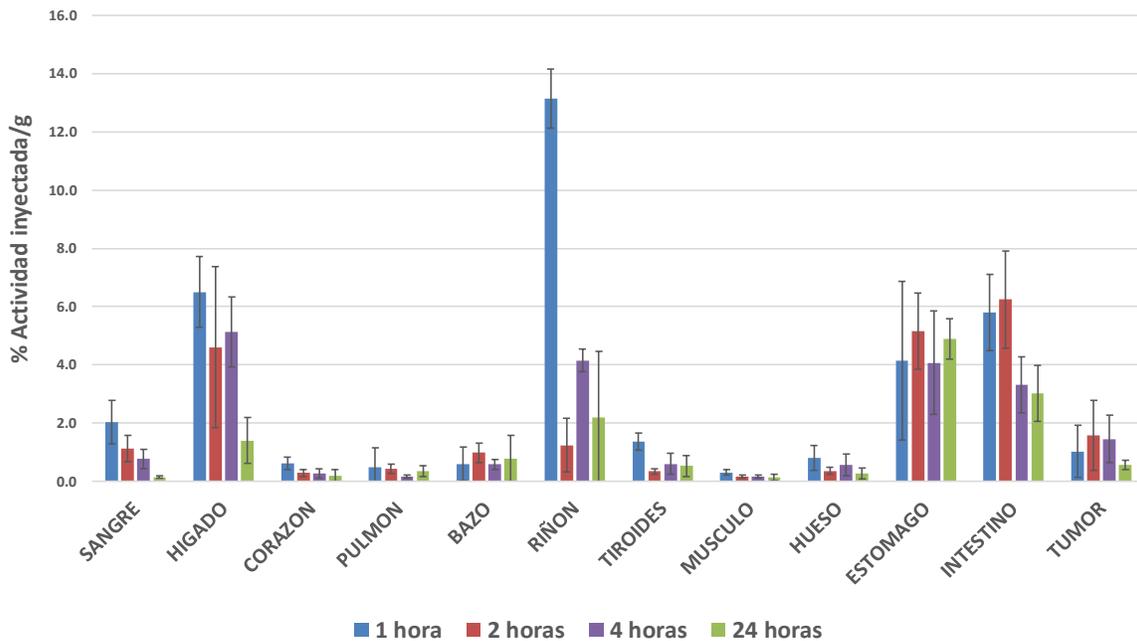


Figura 5.13: Gráfico % Act. iny/g de ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

La captación en riñones fue de 13.14 ± 1.02 % Act/g a 1 h p.i, descendiendo con el paso del tiempo. La captación en hígado fue de 6.50 ± 1.22 % Act/g a 1 h p.i, descendiendo a 4.60 ± 2.77 % Act/g a las 2 h p.i, 5.13 ± 1.20 % Act/g a las 4 h p.i y a 1.39 ± 0.79 % Act/g a las 24 h p.i. La captación en sangre fue de 2.03 ± 0.75 % Act/g a la 1 h p.i, luego descendió aproximadamente un 55 % a las 2 h p.i y continuó disminuyendo gradualmente hasta 0.14 ± 0.05 % Act/g a las 24 h p.i. La captación en estómago se mantuvo relativamente incambiada desde la primera hora p.i (4.13 ± 2.73 % Act/g) hasta las 24 h p.i (4.88 ± 0.69 % Act/g). La captación en intestino fue de 5.79 ± 1.31 % Act/g a 1 h p.i, aumentando a 6.25 ± 1.67 a 2 h p.i, disminuyendo a 3.01 ± 0.96 % Act/g luego de 24 h p.i. La captación en los demás órganos no blancos fue inferior al 1 % Act/g a las 2 h p.i. La relación tumor/músculo fue máxima a las 4 h p.i, siendo de 11.54 ± 1.07 , siendo a las 2 h p.i de 9.98 ± 0.74 . Mientras que a las 4 h p.i. la relación tumor/sangre fue 2.08 ± 0.11 , la relación tumor/hígado fue 0.28 ± 0.01 y la relación tumor/riñones fue 0.36 ± 0.02 . Sin embargo, la relación tumor/riñones fue máxima a 24 h p.i, siendo 3.66 ± 0.60 .

$^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ (n=3)					
% Act./g	1 h	2 h	4 h	24 h	
Sangre	2.03 ± 0.75	1.12 ± 0.46	0.76 ± 0.34	0.14 ± 0.05	
Hígado	6.50 ± 1.22	4.60 ± 2.77	5.13 ± 1.21	1.39 ± 0.79	
Corazón	0.60 ± 0.22	0.28 ± 0.13	0.27 ± 0.17	0.19 ± 0.20	
Pulmón	0.49 ± 0.66	0.43 ± 0.15	0.16 ± 0.05	0.35 ± 0.18	
Bazo	0.59 ± 0.58	0.98 ± 0.34	0.58 ± 0.17	0.78 ± 0.79	
Riñones	13.14 ± 1.02	1.24 ± 0.92	4.15 ± 0.38	2.18 ± 2.29	
Tiroides	1.36 ± 0.30	0.33 ± 0.10	0.60 ± 0.36	0.52 ± 0.35	
Músculo	0.30 ± 0.09	0.15 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.13 ± 0.11	
Hueso	0.80 ± 0.43	0.36 ± 0.13	0.56 ± 0.37	0.26 ± 0.19	
Estómago	4.13 ± 2.73	5.16 ± 1.31	4.07 ± 1.77	4.88 ± 0.69	
Intestino	5.79 ± 1.31	6.25 ± 1.67	3.31 ± 0.97	3.01 ± 0.96	
Tumor	1.02 ± 0.89	1.56 ± 1.20	1.45 ± 0.81	0.57 ± 0.16	
%Act.					
Intestino	12.00 ± 2.59	12.30 ± 3.55	7.26 ± 2.29	5.33 ± 0.91	
Orina	36.26 ± 18.51	59.18 ± 22.95	66.43 ± 4.24	83.02 ± 5.49	
T/NT					
Hígado	0.16 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.46 ± 0.02	
Riñones	0.08 ± 0.01	2.58 ± 0.30	0.36 ± 0.02	3.66 ± 0.60	
Músculo	3.36 ± 0.23	9.98 ± 0.74	11.54 ± 1.07	6.11 ± 0.33	
Sangre	0.44 ± 0.02	1.39 ± 0.10	2.08 ± 0.11	4.48 ± 0.23	

Tabla 5.4: Resultados de biodistribución de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

➤ $^{99m}\text{Tc-N4II-Ahx-cycMSH}_{4-13}$

Como se puede observar en la Figura 5.14 y en la Tabla 5.5, el radioconjugado $^{99m}\text{Tc-N4II-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ presentó una captación tumoral de 0.97 ± 0.69 % Act/g, 2.37 ± 0.54 % Act/g, 2.65 ± 1.14 % Act/g y 2.14 ± 0.001 % Act/g, a 1h, 2h, 4 h y 24h p.i, respectivamente. No hubo diferencia significativa en la captación tumoral a 1h y 2h p.i ($p < 0.05$). A las 2 h p.i se había eliminado aproximadamente un 73 % de la actividad en la orina. La captación en riñones fue de 1.49 ± 0.82 % Act/g, 1.98 ± 1.06 % Act/g, 2.78 ± 0.85 % Act/g y 1.88 ± 0.77 % Act/g a 1 h, 2 h, 4 h y 24 h p.i respectivamente. La captación en hígado fue de 0.47 ± 0.31 % Act/g a 1 h p.i, aumentando levemente a 0.59 ± 0.37 % Act/g y 1.84 ± 0.11 % Act/g a 2 h y 4 h p.i, respectivamente y finalmente disminuyendo a 0.80 ± 0.09 % Act/g a las 24 h p.i. En sangre, la actividad fue de 0.74 ± 0.21 % Act/g, 0.28 ± 0.14 % Act/g, 1.45 ± 0.92 % Act/g y 1.22 ± 0.76 % Act/g a 1 h, 2 h, 4 h y 24 h p.i, respectivamente. La captación en intestino y los demás órganos no blancos fue inferior al 1 % Act/g en los tiempos estudiados.

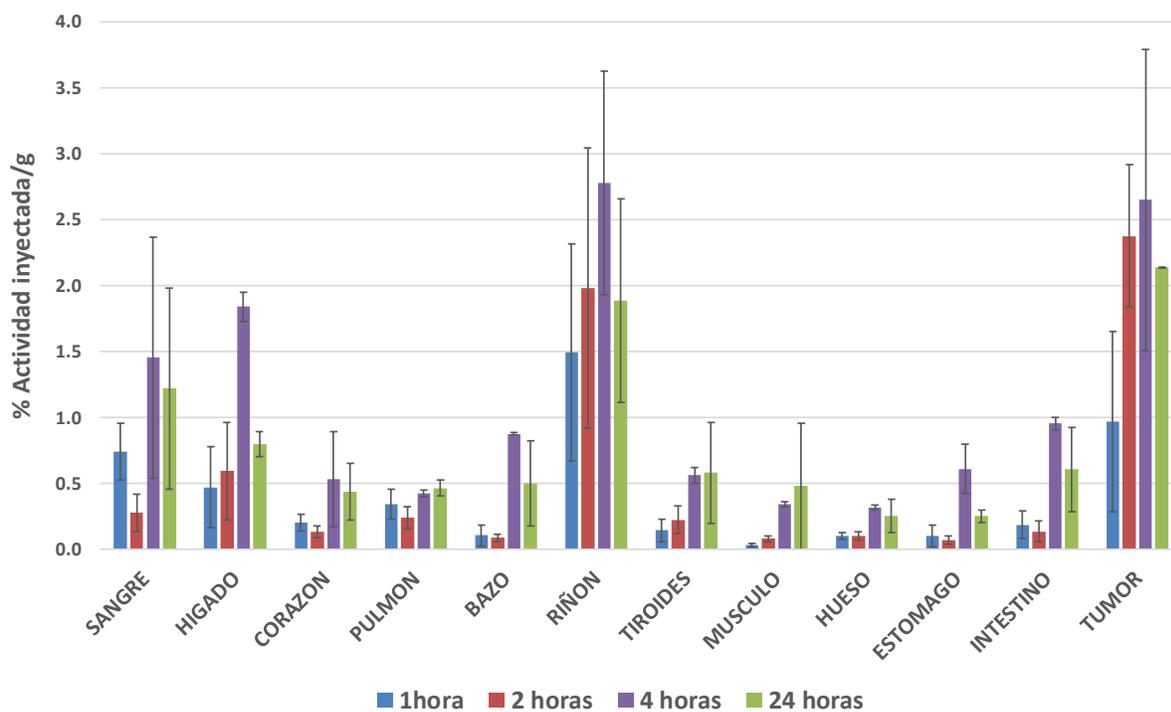


Figura 5.14: Gráfico % Act. iny/g de $^{99m}\text{Tc-N4II-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

La relación tumor/músculo fue de 29.85 ± 1.75 a 1 h p.i, 29.56 ± 0.26 a las 2 h p.i, disminuyendo a 7.67 ± 0.30 a las 4 h y a 8.88 ± 0.89 a las 24 h. A las 2 h p.i fueron máximas las relaciones tumor/hígado 6.19 ± 0.58 , tumor/riñones 1.71 ± 0.15 y tumor/sangre 10.10 ± 0.47 .

$^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ (n= 3)				
% Act./g	1 h	2 h	4 h	24 h
Sangre	0.74 \pm 0.21	0.28 \pm 0.14	1.45 \pm 0.92	1.22 \pm 0.76
Hígado	0.47 \pm 0.31	0.59 \pm 0.37	1.84 \pm 0.11	0.80 \pm 0.09
Corazón	0.20 \pm 0.06	0.13 \pm 0.04	0.53 \pm 0.36	0.44 \pm 0.21
Pulmón	0.34 \pm 0.11	0.24 \pm 0.08	0.43 \pm 0.02	0.46 \pm 0.06
Bazo	0.11 \pm 0.08	0.09 \pm 0.03	0.87 \pm 0.01	0.50 \pm 0.32
Riñones	1.49 \pm 0.82	1.98 \pm 1.06	2.78 \pm 0.85	1.88 \pm 0.77
Tiroides	0.14 \pm 0.09	0.22 \pm 0.10	0.56 \pm 0.06	0.58 \pm 0.38
Músculo	0.03 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02	0.48 \pm 0.48
Hueso	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02	0.25 \pm 0.13
Estómago	0.10 \pm 0.08	0.07 \pm 0.03	0.61 \pm 0.19	0.25 \pm 0.05
Intestino	0.18 \pm 0.10	0.14 \pm 0.08	0.95 \pm 0.05	0.60 \pm 0.32
Tumor	0.97 \pm 0.69	2.37 \pm 0.54	2.65 \pm 1.14	2.14 \pm 0.00
%Act.				
Intestino	0.28 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01	1.96 \pm 0.02	0.71 \pm 0.03
Orina	41.15 \pm 1.20	73.38 \pm 1.83	67.18 \pm 1.92	74.67 \pm 0.68
T/NT				
Hígado	3.53 \pm 0.42	6.19 \pm 0.58	1.42 \pm 0.05	2.70 \pm 0.03
Riñones	0.83 \pm 0.08	1.71 \pm 0.15	0.94 \pm 0.01	1.24 \pm 0.05
Músculo	29.85 \pm 1.75	29.56 \pm 0.26	7.67 \pm 0.30	8.88 \pm 0.89
Sangre	1.21 \pm 0.08	10.10 \pm 0.47	2.58 \pm 0.24	2.18 \pm 0.14

Tabla 5.5: Resultados de biodistribución de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

➤ ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃

Los resultados se presentan en la Figura 5.15 y Tabla 5.6. El radioconjugado exhibió rápida internalización y prolongada retención en el tumor. La captación tumoral fue de 4.99 ± 2.35 % Act/g y 4.92 ± 0.92 % Act/g a 1h y 2h p.i respectivamente. No se observó diferencia significativa en la captación tumoral entre 1h y 2h ($p < 0.05$). A las 4 h p.i. la captación del tumor fue de 2.78 ± 1.48 % Act/g, y disminuyó a 1.74 ± 0.5 % Act/g después de 24 h. La eliminación de ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ del cuerpo fue rápida, con aproximadamente el 52% de la radiactividad inyectada eliminado por la orina a las 2 h después de la inyección. A las 24 h, aproximadamente 87% de la radiactividad se aclaró a través de la orina. La captación renal aumentó de 7.64 ± 2.05 % Act/g en 1 h a 9.94 ± 2.26 % Act/g a 2 h p.i bajando a 7.54 ± 2.34 % Act/g y 3.55 ± 0.96 % Act/g a 4 h y 24 h p.i, respectivamente. La captación hepática fue de 2.73 ± 0.34 % Act/g a 1 h p.i., 2.15 ± 1.01 % Act/g a 2 h p.i., 1.69 ± 1.17 % Act/g a 4 h p.i. y 1.47 ± 1.03 % Act/g luego de 24 h p.i.

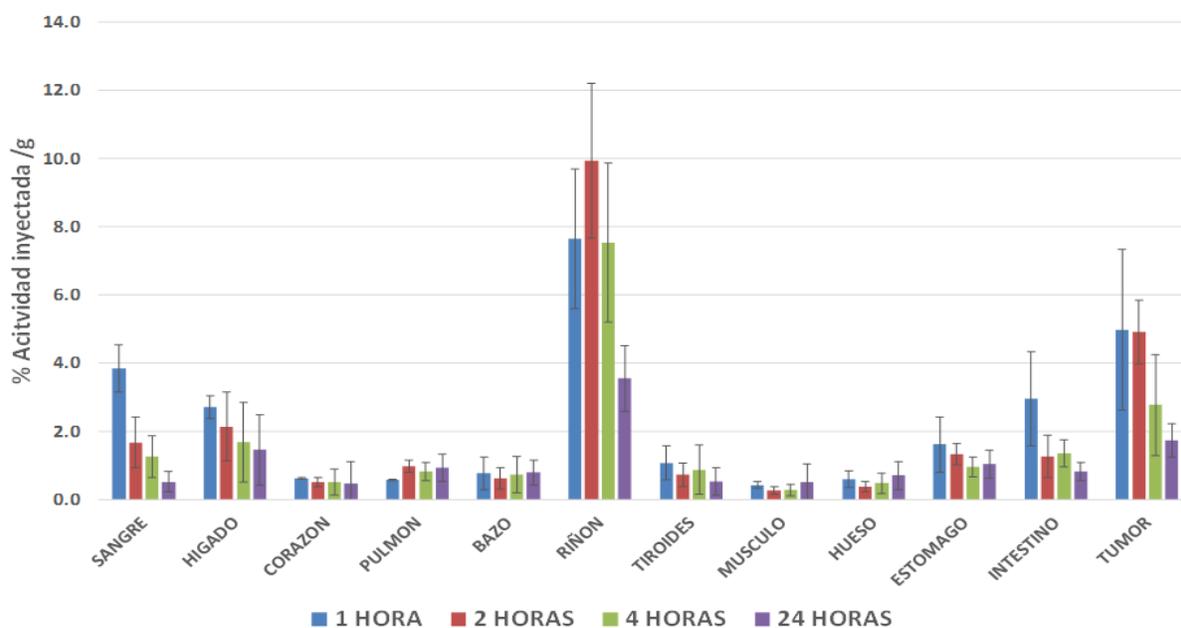


Figura 5.15: Gráfico % Act. iny/g de ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

La actividad en sangre a 1 h p.i fue 3.85 ± 0.69 % Act/g, disminuyendo aproximadamente un 56 % a 2 h p.i a 1.68 ± 0.74 % Act/g. A las 4 h p.i la actividad en sangre fue 1.26 ± 0.62 % Act/g y luego de 24 h p.i disminuyó a 0.53 ± 0.30 % Act/g. La radiactividad en los intestinos se redujo de 2.96 ± 1.37 % Act/g a 1 h p.i. a 1.28 ± 0.62 % Act/g a 2 h p.i. y 0.83 ± 0.26 % Act/g a las 24 h p.i. La captación del estómago a las 2 h p.i y 24 h p.i fue de 1.34 ± 0.31 % Act/g y 1.04 ± 0.41 % Act/g. La absorción en otros órganos no blanco fue típicamente $< 1\%$ Act/g.

La relación tumor/músculo y la relación tumor/sangre de ^{99m}Tc -(Tricina) HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fueron más altas a 2 h p.i, siendo de 20.88 ± 10.29 y 3.57 ± 1.73 respectivamente. Las relaciones tumor/hígado y tumor/riñones a las 2 h p.i fueron 2.66 ± 0.96 y 0.53 ± 0.2 respectivamente.

^{99m}Tc -(Tricina) HYNIC-Ahx-cycMSH ₄₋₁₃ (n=5)				
% Act./g	1 h	2 h	4 h	24 h
Sangre	3.85 ± 0.69	1.68 ± 0.74	1.26 ± 0.62	0.53 ± 0.30
Hígado	2.73 ± 0.34	2.15 ± 1.01	1.69 ± 1.17	1.47 ± 1.03
Corazón	0.63 ± 0.03	0.52 ± 0.13	0.53 ± 0.38	0.48 ± 0.63
Pulmón	0.59 ± 0.02	0.98 ± 0.17	0.84 ± 0.27	0.94 ± 0.40
Bazo	0.78 ± 0.48	0.63 ± 0.32	0.74 ± 0.53	0.80 ± 0.37
Riñones	7.64 ± 2.05	9.94 ± 2.26	7.54 ± 2.34	3.55 ± 0.96
Tiroides	1.08 ± 0.50	0.74 ± 0.34	0.88 ± 0.72	0.54 ± 0.41
Músculo	0.44 ± 0.10	0.28 ± 0.11	0.29 ± 0.17	0.52 ± 0.53
Hueso	0.61 ± 0.24	0.39 ± 0.16	0.49 ± 0.31	0.72 ± 0.41
Estómago	1.62 ± 0.81	1.34 ± 0.31	0.96 ± 0.29	1.04 ± 0.41
Intestino	2.96 ± 1.37	1.28 ± 0.62	1.36 ± 0.40	0.83 ± 0.26
Tumor	4.99 ± 2.35	4.92 ± 0.92	2.78 ± 1.48	1.74 ± 0.50
%Act.				
Intestino	3.93 ± 1.88	2.11 ± 0.91	2.08 ± 0.43	1.05 ± 0.37
Orina	28.28 ± 2.51	51.84 ± 10.65	72.40 ± 5.63	86.75 ± 3.69
T/NT				
Hígado	1.78 ± 0.67	2.66 ± 0.96	2.20 ± 1.66	1.43 ± 0.39
Riñones	0.69 ± 0.33	0.53 ± 0.20	0.40 ± 0.19	0.51 ± 0.19
Músculo	12.20 ± 7.88	20.88 ± 10.29	11.40 ± 6.31	9.46 ± 8.31
Sangre	1.27 ± 0.47	3.57 ± 1.73	2.28 ± 0.94	3.67 ± 1.39

Tabla 5.6: Resultados de biodistribución de ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

- $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})$ CCMSSH

Los resultados de la biodistribución en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma se presentan en la Figura 5.16 y Tabla 5.7. El radioconjugado $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})$ CCMSSH exhibió rápida internalización en el tumor. La captación tumoral a 1h p.i fue de 3.96 ± 1.98 % Act/g, a las 2 h p.i descendió a 2.35 ± 0.71 % Act/g. La actividad en el tumor continuó descendiendo, siendo a las 24 h p.i de 0.84 ± 0.58 % Act/g. La eliminación fue rápida con aproximadamente el 76.45 ± 4.01 % Act. inyectada eliminada por orina a 2 h p.i. Luego de 24 h p.i se eliminó por vía renal el 86.12 ± 3.88 % de la Act. inyectada. La captación en riñones fue de 6.83 ± 3.70 % Act/g a 1 h p.i, disminuyendo hasta 3.03 ± 2.81 a las 24 h p.i. La captación en sangre fue de 1.51 ± 1.38 % Act/g a 1 h p.i, a 2 h p.i fue de 0.79 ± 0.39 % Act/g y a las 24 h p.i fue de 0.66 ± 0.34 % Act/g. La captación en hígado e intestino fue elevada a 2 h p.i, siendo 4.08 ± 2.44 % Act/g y 3.18 ± 1.57 % Act/g, respectivamente. Luego de 24 h p.i la actividad disminuyó a 1.72 ± 0.92 % Act/g en hígado y 1.48 ± 0.39 % Act/g en intestino. La actividad en estómago fue máxima a 1 h p.i siendo 3.20 ± 1.28 % Act/g. Luego disminuyó a 1.48 ± 0.47 % Act/g a 2 h p.i, 0.77 ± 0.34 % Act/g a 3 h p.i, aumento a las 4h p.i a 1.97 ± 1.58 % Act/g, para disminuir hasta 1.61 ± 1.21 % Act/g a las 24 h p.i. La captación en los demás órganos no blancos a las 2 h p.i fue ≤ 1 % Act/g.

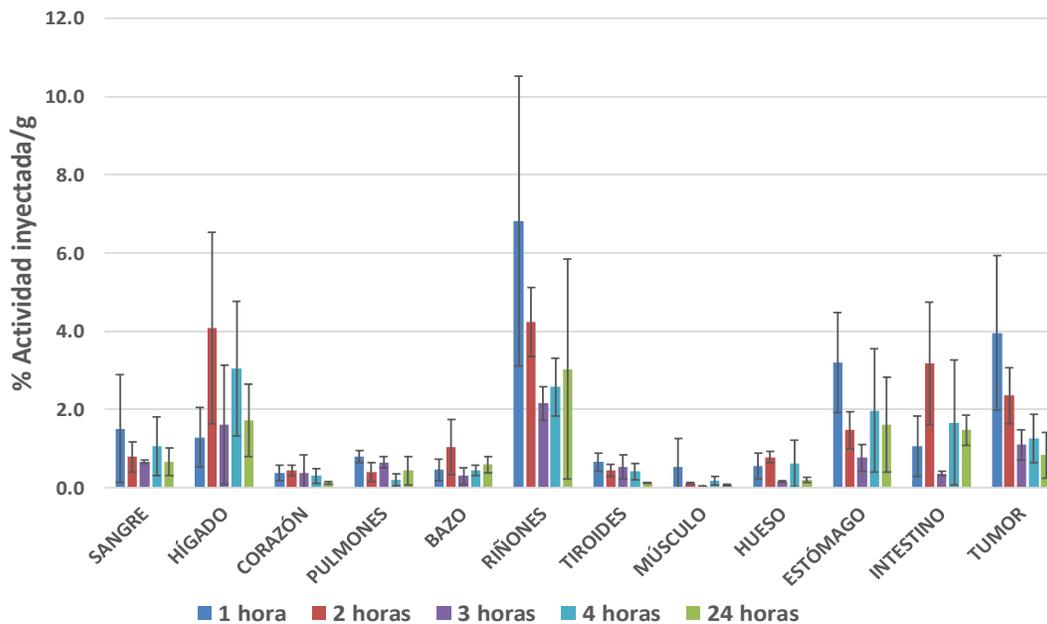


Figura 5.16: Gráfico % Act. iny/g de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})$ CCMSSH en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

La relación tumor/músculo a 1 h p.i fue de 30.4 ± 4.17 , disminuyendo a 20.7 ± 0.88 a 2 h p.i y 10.95 ± 0.84 a 24 h p.i. La relación tumor/sangre a 1 h p.i fue de 3.9 ± 0.21 , aumentando levemente a 4.1 ± 0.38 a 2 h p.i, disminuyendo hasta 1.00 ± 0.08 a 24 h p.i. La relación tumor/hígado fue de 4.6 ± 0.39 a 1 h p.i, 0.8 ± 0.06 a 2 h p.i y 1.14 ± 0.14 a 24 h p.i. La relación tumor/riñones fue de 0.9 ± 0.09 a 1 h, a las 2 h de 0.5 ± 0.01 y finalmente a 0.27 ± 0.03 a las 24 h p.i.

$^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11}) \text{CCMSH (n=3)}$						
% Act./g	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	
Sangre	1.51 ± 1.38	0.79 ± 0.39	0.66 ± 0.05	1.06 ± 0.75	0.66 ± 0.34	
Hígado	1.29 ± 0.76	4.08 ± 2.44	1.61 ± 1.53	3.04 ± 1.72	1.72 ± 0.92	
Corazón	0.38 ± 0.19	0.45 ± 0.14	0.38 ± 0.47	0.30 ± 0.19	0.13 ± 0.02	
Pulmón	0.80 ± 0.15	0.40 ± 0.25	0.65 ± 0.14	0.21 ± 0.16	0.44 ± 0.37	
Bazo	0.46 ± 0.28	1.04 ± 0.71	0.31 ± 0.21	0.44 ± 0.13	0.59 ± 0.20	
Riñones	6.83 ± 3.70	4.23 ± 0.88	2.16 ± 0.42	2.57 ± 0.73	3.03 ± 2.81	
Tiroides	0.66 ± 0.23	0.44 ± 0.15	0.53 ± 0.31	0.41 ± 0.22	0.13 ± 0.02	
Músculo	0.54 ± 0.72	0.12 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.19 ± 0.11	0.07 ± 0.02	
Hueso	0.56 ± 0.33	0.79 ± 0.14	0.16 ± 0.03	0.62 ± 0.59	0.20 ± 0.06	
Estómago	3.20 ± 1.28	1.48 ± 0.47	0.77 ± 0.34	1.97 ± 1.58	1.61 ± 1.21	
Intestino	1.06 ± 0.77	3.18 ± 1.57	0.36 ± 0.05	1.67 ± 1.60	1.48 ± 0.39	
Tumor	3.96 ± 1.98	2.35 ± 0.71	1.10 ± 0.38	1.26 ± 0.62	0.84 ± 0.58	
%Act.						
Intestino	7.30 ± 0.77	3.99 ± 0.05	0.61 ± 0.010	2.83 ± 0.24	2.53 ± 0.08	
Orina	60.82 ± 13.67	76.45 ± 4.01	75.00 ± 4.25	65.50 ± 10.78	86.12 ± 3.88	
T/NT						
Hígado	4.6 ± 0.39	0.8 ± 0.06	1.04 ± 0.08	0.3 ± 0.001	1.14 ± 0.14	
Riñones	0.9 ± 0.09	0.5 ± 0.01	0.54 ± 0.03	0.4 ± 0.01	0.27 ± 0.03	
Músculo	30.4 ± 4.17	20.7 ± 0.88	30.62 ± 2.12	7.4 ± 0.28	10.95 ± 0.84	
Sangre	3.9 ± 0.21	4.1 ± 0.38	1.69 ± 0.07	1.7 ± 0.08	1.00 ± 0.08	

Tabla 5.7: Resultados de biodistribución de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11}) \text{CCMSH}$ en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma

5.2.7. Evaluación *in vivo* en modelo murino: imágenes centellográficas y micro SPECT/CT

Se realizaron estudios de imagenología para los cuatro radioconjugados obtenidos ^{99m}Tc -péptido en ratones hembras C57 BL/6J portadores de melanoma murino. Para los radioconjugados ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, ^{99m}Tc -N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH fue posible la obtención de imágenes centellográficas y SPECT-CT. Sin embargo, por un tema de no disponibilidad en Uruguay del equipamiento necesario, para ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fue posible únicamente realizar imágenes centellográficas.

En la Figura 5.17 se observa la imagen microSPECT-CT 2 h p.i obtenida para ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀. En esta se aprecia que no hubo captación tumoral e importante captación abdominal. Asimismo se aprecia captación tiroidea.

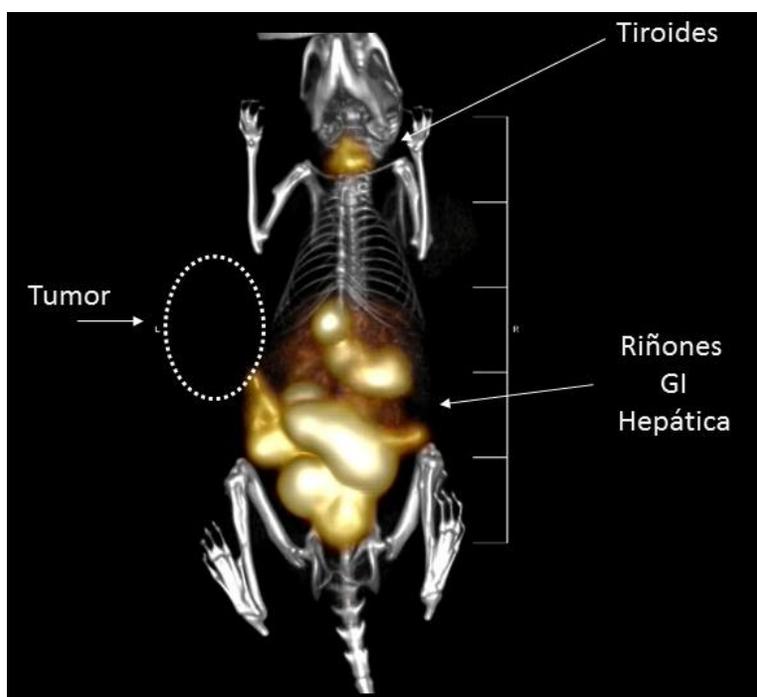


Figura 5.17: Imagen micro SPECT-CT a 2 h post-inyección de ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma inducido por células B16 F1.

En la Figura 5.18 se observa la imagen microSPECT-CT 2 h p.i obtenida para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$. En la imagen 5.18 (A) se puede identificar claramente el tumor en flanco superior izquierdo y también se observa captación a nivel abdominal así como en la tiroides. En la imagen 5.18 (B) se puede observar el tumor en un corte axial. En la imagen 5.18 (C) se puede apreciar el bloqueo de la captación tumoral de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ con el análogo NDP sin marcar en el mismo ratón.

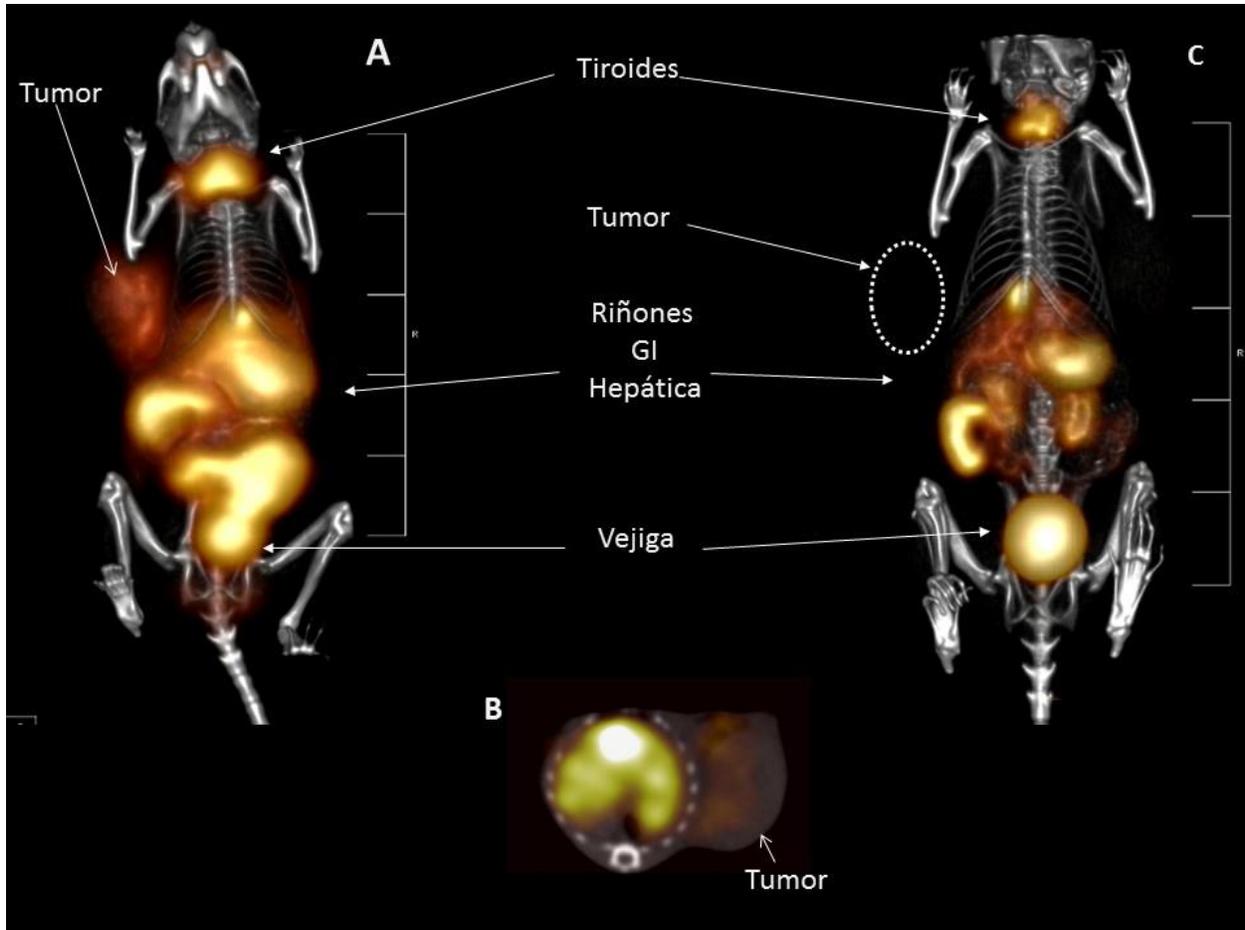


Figura 5.18: Imagen microSPECT-CT a 2 h post-inyección de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma inducido por células B16 F1. A) Imagen longitudinal de cuerpo completo. B) Corte axial. C) Imagen obtenida 2h p.i con $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ y el análogo NDP.

En la Figura 5.19 se observa la imagen centellográfica 2 h p.i obtenida para ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃. En la imagen en (A) se puede identificar captación tumoral del radiotrazador en proyección de flanco inferior derecho. Asimismo se aprecia importante actividad a nivel de abdomen así como en vejiga. En la imagen (B) se dibujó una máscara para destacar la visualización del tumor

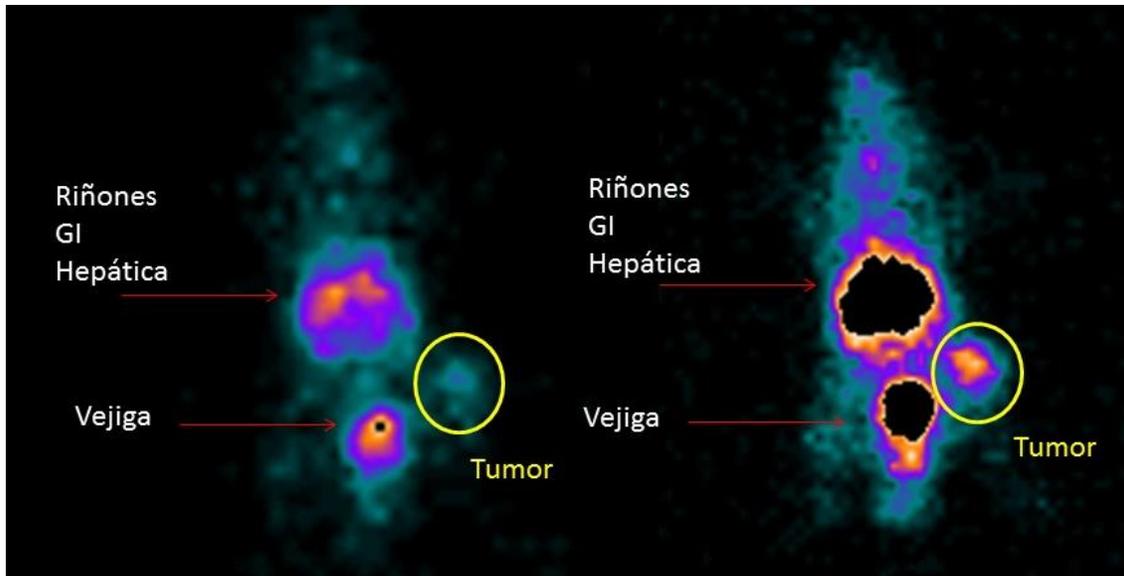


Figura 5.19: A) Imagen centellográfica a 2 h post-inyección de ^{99m}Tc -(Tricina) HYNIC-Ahx cycMSH₄₋₁₃ por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma inducido por células B16 F1. B) Se dibujó una máscara sobre la actividad abdominal y vejiga para apreciar mejor la captación tumoral.

En la Figura 5.20 se observa la imagen centellográfica 2 h p.i obtenida para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$. En la imagen se puede identificar actividad aumentada en la proyección del tumor en flanco inferior derecho, así como actividad a nivel renal y en vejiga. .

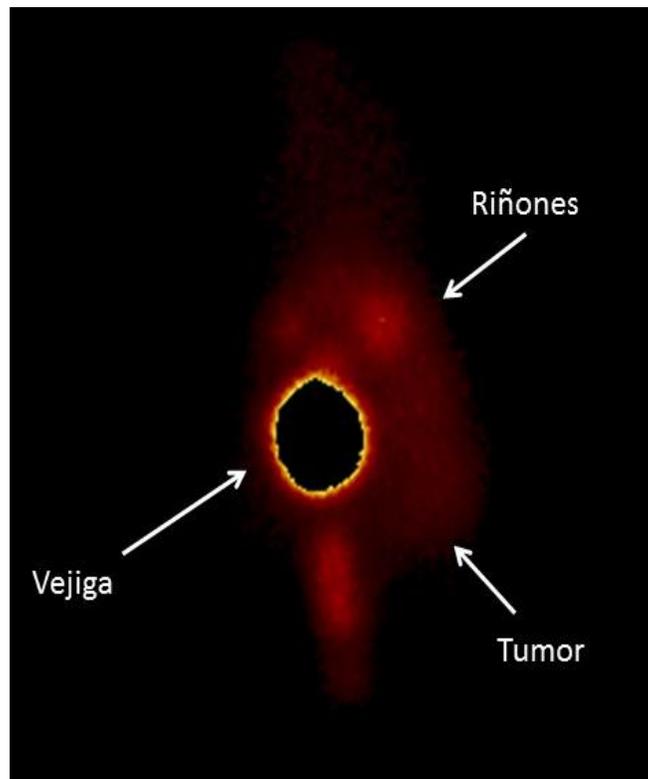


Figura 5.20: Imagen centellográfica a 2 h post-inyección de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma inducido por células B16 F1

En la Figura 5.21 se observa la imagen microSPECT-CT a 2 h p.i obtenida para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$. En la imagen en (A) se puede identificar claramente el tumor en el hombro derecho y captación a nivel abdominal. En la imagen (B) observa un corte axial con clara identificación del tumor. En la imagen (C) se observa la ausencia de actividad en la proyección de tumor luego del bloqueo con el análogo NDP, apreciándose el bloqueo de la captación tumoral.

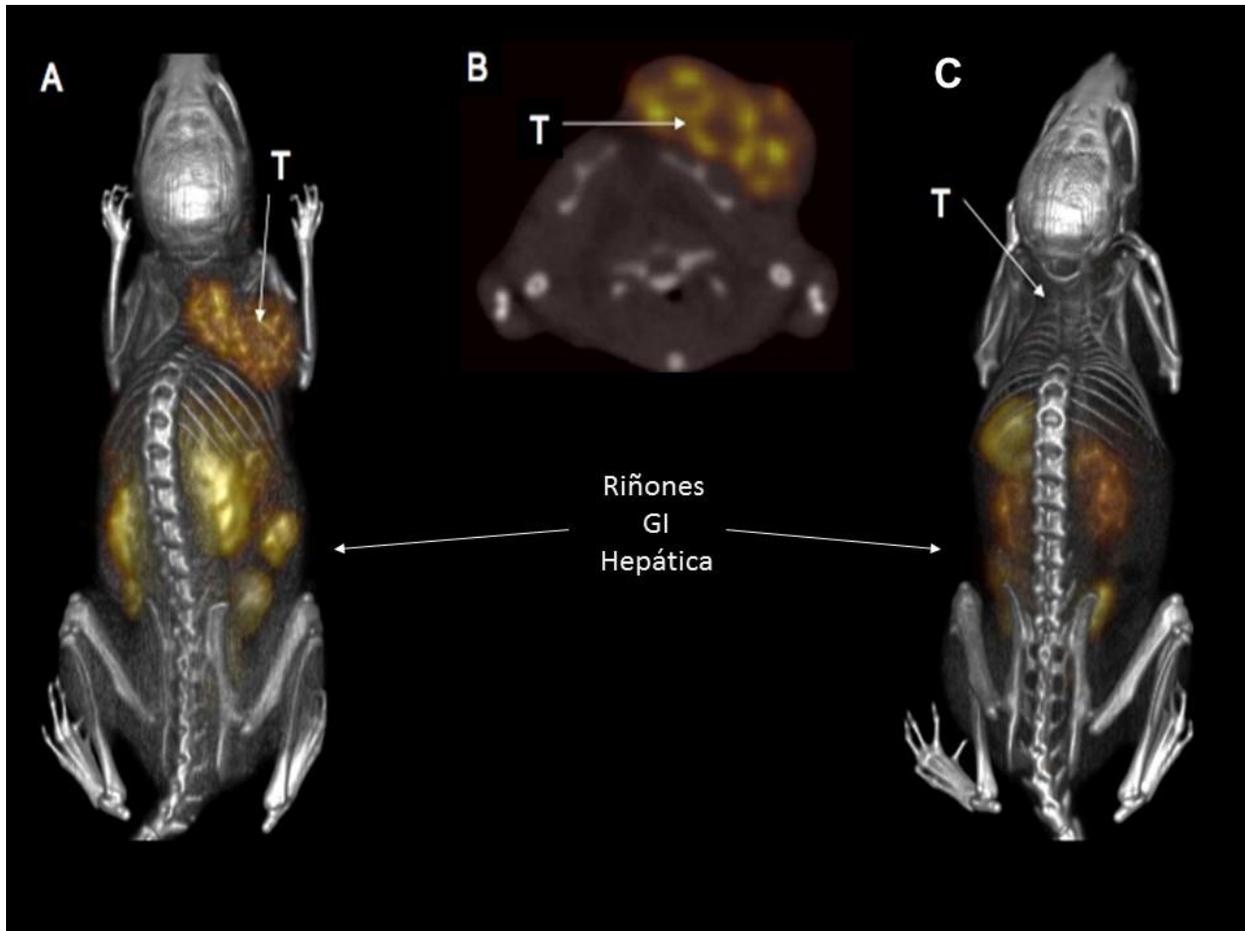


Figura 5.21: A) Imagen micro SPECT-CT a 2 h post-inyección de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma inducido por células B16 F1. T corresponde a Tumor. B) Corte axial donde destaca la captación tumoral. C) Imagen micro SPECT-CT obtenida 2h p.i con $^{99m}\text{Tc-N4-II-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ y el análogo NDP, donde se observa la ausencia de captación tumoral.

5.2.8. Evaluación *in vivo* en modelo murino mediante trazador fluorescente (ICG- α -MSH)

En la Figura 5.22 se puede apreciar la imagen de fluorescencia obtenida con un análogo de α -MSH ciclado por renio derivatizado con el trazador fluorescente verde de indocianina (ICG). En la misma se puede visualizar el tumor y también fluorescencia a nivel abdominal así como en el sitio de inyección (cola), contaminación por fluorescencia presente en la orina en el miembro inferior y en proyección de boca.

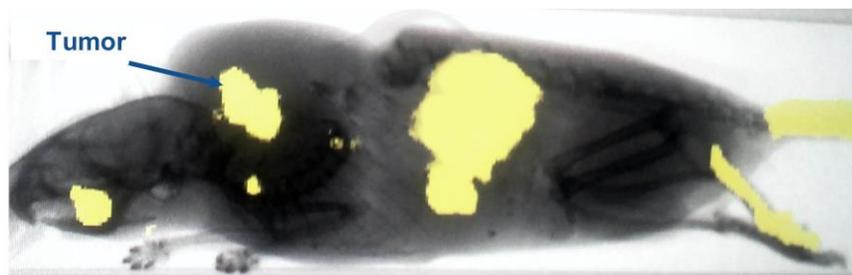


Figura 5.22: Imagen fluorescente obtenida 1 h post-inyección de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH

5.3. Discusión

En este trabajo se estudiaron las propiedades fisicoquímicas, desempeño *in vitro* e *in vivo* de cuatro péptidos cíclicos análogos de α -MSH marcados con ^{99m}Tc como agentes de diagnóstico en melanoma. Los cuatro péptidos estudiados comprenden dos estrategias de ciclación: mediante enlace lactama y átomo metálico. Para la marcación con ^{99m}Tc se emplearon tres ligandos bifuncionales (HYNIC, N4 y N4II).

Para los cuatro péptidos estudiados se determinó la IC_{50} (concentración de péptido necesaria para inhibir 50% de la unión de radioligando) en células B16 F1, mediante ensayo de competencia contra ^{125}I -Tyr²-[Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH (NDP), un péptido análogo de la α -MSH radioiodado con afinidad del orden picomolar. Como se puede apreciar en la Tabla 5.1, el péptido HYNIC-Ahx-cycMS₄₋₁₃ es el que presenta menor valor IC_{50} (mayor afinidad por el receptor) y el péptido N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH es el que presenta un mayor valor. Sin embargo, todos los valores de IC_{50} obtenidos para los péptidos son similares a los descritos para péptidos análogos de α -MSH. Entre estos, péptidos ciclados con un átomo metálico de renio como DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH¹⁷² posee un IC_{50} de 2.1 nM y CHX-A''-Re(Arg¹¹)CCMSH¹⁷⁸ un IC_{50} de 3.8 nM. Mientras que para péptidos ciclados mediante un enlace lactama se encuentran: HYNIC-cycMSH₄₋₁₃¹⁸⁴ con un IC_{50} de 6.48 nM, GGNle-cycMSHhex¹⁶³ con un IC_{50} de 0.6 nM, MAG3-GGNle-CycMSHhex¹⁶³ con un IC_{50} de 1.0 nM para y HYNIC-AocNle-cycMSH_{hex}¹⁶⁴ con un IC_{50} de 0.4 nM.

Para los cuatro péptidos cíclicos análogos de α -MSH derivatizados con ligandos bifuncionales se estudiaron diferentes condiciones de marcación con ^{99m}Tc para obtener radiopéptidos con una pureza radioquímica mayor a 90 %. Fue posible obtener los cuatro radiopéptidos con pureza radioquímica superior a 95 % y purificar el radiopéptido del péptido no marcado por HPLC. La purificación del péptido marcado del no marcado, es un paso limitante para la sensibilidad de la imagen obtenida, dado que si bien el receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R) se encuentra sobreexpresado en las células de melanoma, el número de receptores por célula de melanoma en humanos se encuentra en el rango de 1000 – 6000 y de 5000 – 8000 en células de melanoma murino^{25,31-33}. Esta densidad de receptores es baja en relación a la densidad de otras dianas de agentes de imagenología molecular, como por ejemplo antígenos de anticuerpos

¹⁷¹. A los radiopéptidos obtenidos también se les controló a las 2 y 24 horas: pH, apariencia de la solución, identidad y estabilidad del marcado purificado por HPLC, no encontrándose cambios significativos en estas variables en ninguno de los marcados a estos tiempos.

Para 1) N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, se estudiaron dos condiciones de marcación con ^{99m}Tc. La primera condición de marcación se encuentra descrita, sin embargo, no fue posible lograr resultados reproducibles a dicha publicación ¹⁰⁶, obteniéndose una pureza radioquímica (PRQ) de 70 % y un rendimiento de purificación 10 %. Por lo que se decidió estudiar la condición de marcación número dos, utilizada para otros ligandos bifuncionales tetraaminos ¹⁰⁵. Con la segunda condición se obtuvieron los radioconjugados ^{99m}Tc-N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ y ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ con una PRQ superior al 95 % y un rendimiento de purificación entre 50-60 %. Esto podría explicarse, dado que en la segunda condición se emplea el citrato de sodio el cual forma un intermediario con el ^{99m}Tc mediante una reacción que es cinéticamente más favorable que la de coordinación del ligando tetraamino con el ^{99m}Tc. Sin embargo, esta segunda reacción entre ligando tetraamino-^{99m}Tc es más estable termodinámicamente por lo cual acaba predominando. Para que sea posible esto son necesarias condiciones de pH elevado ²²².

Con HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ se estudiaron diferentes condiciones en las cuales se variaron: los volúmenes de las disoluciones de tricina y de SnCl₂μL, la temperatura y el tiempo de reacción, obteniéndose diferentes purezas radioquímicas. De estas fue seleccionada la condición que permitió obtener el radioconjugado ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ con PRQ = 100 %. El péptido con HYNIC protegido, TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, también fue marcado en estas condiciones obteniéndose PRQ= 100%. Mediante una co-inyección del marcado de HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ con TFA-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ se pudo verificar la desprotección del grupo TFA durante la marcación para obtener la misma especie ^{99m}Tc-(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃. Esto es de importancia porque el grupo TFA, protege el grupo hidracino del HYNIC, el cual es sumamente reactivo y la desprotección del mismo no requiere ningún paso adicional en la marcación, obteniéndose la especie deseada a una elevada pureza radioquímica.

El péptido N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH fue posible marcarlo con ^{99m}Tc en un PRQ = 100 % utilizando la condición de marcado descrita por *Maina et. al.* ¹⁰⁵ para este ligando bifuncional.

De esta forma, fue posible estudiar condiciones de marcación con ^{99m}Tc empleando tres ligandos bifuncionales diferentes: HYNIC, N4 y N4_{II}. Así, se obtuvieron *cores* con ^{99m}Tc en estado

de oxidación +5. Los *cores* corresponden a [^{99m}Tc (HYNIC) (Tricina) $_2$] para HYNIC y $[\text{O}=\text{}^{99m}\text{Tc}=\text{O}](\text{tetraamino})^+$ para N4 y N4_{II}^{95,101,100}.

Para los cuatro péptidos marcados con ^{99m}Tc se realizaron estudios: fisicoquímicos para evaluar la lipofilidad, unión a proteínas y estabilidad en suero fetal bovino; estudios *in vitro* en células de melanoma murino para evaluar la unión, internalización y externalización; y estudios *in vivo* de perfil de biodistribución y obtención de imágenes centellográficas y SPECT-CT.

La determinación de parámetros como el coeficiente de partición (Log P) y la unión a proteínas es de relevancia, dado que estos afectan directamente el perfil de biodistribución. El Log P fue estudiado para los cuatro radiopéptidos. De los resultados obtenidos se puede apreciar que el radioconjugado ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ es el que presenta carácter más hidrofóbico y ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH el de mayor carácter hidrofílico. Los otros dos radioconjugados restantes ^{99m}Tc -N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc -(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ presentan un coeficiente de partición similar. El carácter hidrofílico de los fármacos y radiofármacos es un parámetro *in vitro* muy utilizado para predecir el perfil de biodistribución *in vivo*. De esta forma, la captación tumoral y la eliminación, se ven muy afectados por la hidrofilia del radioconjugado. La hidrofobicidad o lipofilidad alta de un radioconjugado se manifiesta como un aumento en la captación hepática e intestinal¹⁰⁸. Para otros péptidos análogos de α -MSH con anillo lactama, marcados con ^{99m}Tc , se han descrito valores de Log P de $-1,244 \pm 0,05$ para ^{99m}Tc (Tricina)-HYNIC-cycMSH₄₋₁₃¹⁸⁴, $-0,778 \pm 0,06$ para ^{99m}Tc (EDDA)-HYNIC-cycMSH₄₋₁₃¹⁸⁴, $-0,93 \pm 0,01$ para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Pz}^3\text{-}\beta\text{AlaNleCycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁸⁵ y $-1,11 \pm 0,02$ para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Pz}^4\text{-}\beta\text{AlaNleCycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁸⁵. Para el péptido ciclado por renio $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ fue descrito un Log P de $-1,41 \pm 0,02$ ¹⁷⁴. Siendo así, los valores de Log P de los cuatro radioconjugados aquí estudiados del mismo orden que los descritos en la literatura.

La evaluación de % de unión a proteínas plasmáticas (%UP), es importante ya que un elevado % UP resultan en una circulación sanguínea prolongada reduciendo la relación órgano blanco/órgano no blanco y la eliminación de la radioactividad¹⁰⁸. De los cuatro radiopéptidos estudiados, ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ fue el que presentó menor % UP, manteniéndose por debajo de 10 % luego de 4 horas de incubación. ^{99m}Tc -N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc -HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ presentaron un perfil similar, con % UP debajo de 20 % a las 4 horas. El radioconjugado ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH fue el que presentó mayor % UP principalmente

a las 4 horas, estando en aproximadamente un 32 %. Además $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ fue el que presentó mayor incremento de % UP con el tiempo, pasando de un 10 % en la primer hora a aproximadamente un 20 % a las 2 horas y un 32 % a las 4 horas. Dentro de los análogos de α -MSH marcados con ^{99m}Tc valores similares han sido reportados, por ejemplo luego de 4 horas de incubación: aproximadamente un 27 % para $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{-HYNIC-cycMSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴, 10 % para $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-cycMSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴, 10.8 % para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Pz}^3\text{-}\beta\text{AlaNleCycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁸⁵ y 22.6 % para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Pz}^4\text{-}\beta\text{AlaNleCycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁸⁵.

Del estudio de estabilidad en suero fetal bovino a 1, 3 y 4 horas a 37 °C, se pudo observar que de los cuatro radiopéptidos $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ y $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ mantuvieron la PRQ por encima de 90 % luego de las 4 horas del estudio. $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ exhibió una muy buena estabilidad hasta las 2 horas (PRQ = 96 %), luego disminuyó a las 4 horas (PRQ = 82 %). $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ fue el que presentó menor estabilidad, con PRQ = 88 % a las 2 horas y PRQ = 82 % a las 4 horas. La menor estabilidad del péptido HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ se podría explicar porque para el *core* [^{99m}Tc (HYNIC) (Tricina)₂] existe un equilibrio entre los diferentes isómeros de coordinación en relación al *core* [O= ^{99m}Tc =O](tetraamino)⁺ que no presenta isómeros^{94,101,109}.

Los estudios *in vitro* de unión, internalización y retención celular fueron realizados en células de melanoma murino B16 F1 para los cuatro radiopéptidos obtenidos y en células metastásicas de melanoma murino B16 F10 para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$. Los resultados obtenidos de los estudios con las células B16 F1 mostraron una rápida unión a la membrana celular, internalización creciente en el tiempo y retención celular para los siguientes radiopéptidos $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ y $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$. Sin embargo, con $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ la actividad unida a la membrana comenzó a disminuir abruptamente a los 60 min de incubación y la actividad internalizada también disminuyó luego de los 90 min de incubación. En relación a la actividad retenida en las células luego de 2h de incubación, la actividad internalizada remanente de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ disminuyó desde aproximadamente un 83 % a tiempo cero hasta un 28 % luego de incubación en medio de cultivo. Para los otros tres radioconjugados la actividad internalizada remanente a las 2 horas de incubación en medio de cultivo fue aproximadamente un 44 % para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, 45 % para $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ y 39 % para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$. Los receptores

MC1R son internalizados con su ligando luego de la unión de este y la nueva expresión de los MC1R en la membrana celular no es inmediata ^{32,171,223}. Por lo que si el radiopéptido es rápidamente externalizado no se lograría una adecuada captación tumoral para la obtención de una imagen. La internalización del receptor MC1R y la lenta recuperación de éste, destacan la importancia del desarrollo de análogos de α -MSH que tengan no sólo una elevada afinidad por el receptor, sino que también un alto grado de retención celular. En referencia a la unión no específica, se pudo observar con el estudio de bloqueo que para los cuatro radiopéptidos hubo un bloqueo de la actividad unida e internalizada al adicionarse NDP o el péptido sin marcar a la incubación. Demostrándose así, que la unión de los radiopéptidos es específica por MC1R y que la afinidad por el receptor MC1R (IC_{50}) no se pierde luego de la marcación con ^{99m}Tc .

En los estudios en células metastásicas de melanoma murino B16 F10 con ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH también se apreció una rápida unión e internalización del radiopéptido, con una retención celular permanente. Luego de 2 horas de incubación en medio de cultivo en el estudio de externalización, permanecía aún internalizado un 76 % de la actividad. También se demostró que la unión era específica por los receptores MC1R disminuyendo la internalización de la actividad por competencia con el péptido sin marcar. Estos resultados demuestran que el radioconjugado ^{99m}Tc -N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH tendría una potencial captación en tumores metastásicos. Para los demás radiopéptidos no fue posible realizar este estudio por no contarse con más de este modelo celular.

Los estudios *in vivo* fueron realizados en ratones C57 BL/6J portadores de melanoma murino inducido por células B16 F1. Se busca un agente de imagenología para melanoma con una rápida y buena captación tumoral, con eliminación principalmente en orina, con baja captación en órganos no blancos. Es deseable también una baja captación en hígado para poder evaluar metástasis hepáticas sin falsos positivos por interferencia del perfil de biodistribución del agente de imagen. También es deseable que la captación en riñones sea baja, dado que podría aumentar el riesgo de nefrotoxicidad, principalmente en los radiopéptidos trasladados a terapia ^{51,146,161}.

De los estudios de biodistribución *in vivo* se puede apreciar que los cuatro radiopéptidos presentaron captación tumoral, siendo ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ el que presentó menor % Act/g. A las 2 h p.i la captación tumoral fue de 1.56 ± 1.20 % Act/g para ^{99m}Tc -N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, 2.37 ± 0.54 % Act/g para ^{99m}Tc -N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, 4.92 ± 0.92 % Act/g para ^{99m}Tc -HYNIC-Ahx-

cycMSH₄₋₁₃ y 3.96 ± 1.98 % Act/g para ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH. Los cuatro radiopéptidos presentaron una rápida eliminación renal de la actividad inyectada. Siendo a las 2 h p.i, la eliminación del total de la actividad inyectada por orina de 59 %, 73 %, 52% y 76 % para ^{99m}Tc-N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀, ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH, respectivamente. En relación a la lipofilia determinada (Log P), el radioconjugado ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH presentó el carácter más hidrofílico de los cuatro radioconjugados estudiados coincidente con una mayor eliminación en orina. Para ^{99m}Tc-N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀ y ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃, el perfil de eliminación en orina sería concordante con los valores de Log P determinados, sin embargo, para ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ se esperaría según el valor de Log P una mayor eliminación en orina a 2 h pi. Esta menor eliminación en orina de ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ podría relacionarse con una mayor captación en riñones en comparación con los otros tres radiopéptidos (Figura 5.23).

En la Tabla 5.8 se resumen las relaciones tumor/hígado, tumor/riñón, tumor/músculo y tumor/sangre obtenidas para los cuatro radiopéptidos. Si bien ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH exhibieron las mayores captaciones tumorales a las 2 h p.i, ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ presentó las mayores relaciones tumor/hígado, tumor/músculo y tumor/sangre en comparación con los otros tres radiopéptidos estudiados. En cuanto a la relación tumor/riñón, la exhibida por ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fue mayor a ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y ^{99m}Tc-N4-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH pero no a la de ^{99m}Tc-N4_{II}-cycMSH₄₋₁₀. Sin embargo, la relación tumor/riñones de este último a 1 h p.i fue muy baja 0.08 ± 0.01 , con una captación en riñones muy elevada 13.14 ± 1.02 % Act/g. En comparación la captación en riñones de ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ a 1 h p.i fue baja 1.49 ± 0.82 % Act/g, con una relación tumor/riñones de 0.83 ± 0.08 . En este contexto, el radiopéptido ^{99m}Tc-N4_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ sería entre los radiopéptidos estudiados el que presentaría mejor perfil de biodistribución, sin embargo, el radiopéptido ^{99m}Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ fue el que presentó mayor captación tumoral de los estudiados.

	Tumor/Hígado	Tumor/Riñones	Tumor/Músculo	Tumor/Sangre
$^{99m}\text{Tc-N}_{4\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$	0.31	2.58	9.98	1.39
$^{99m}\text{Tc-N}_{4\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$	6.19	1.71	29.56	10.10
$^{99m}\text{Tc(Tricina)-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$	2.66	0.53	20.88	3.57
$^{99m}\text{Tc-N}_4\text{-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$	0.79	0.55	20.67	4.15

Tabla 5.8: Comparación de las relaciones tumor/hígado, tumor/riñón, tumor/músculo y tumor/sangre entre $^{99m}\text{Tc-N}_{4\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$, $^{99m}\text{Tc-N}_{4\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $^{99m}\text{Tc-N}_4\text{-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$.

En la Figura 5.22 se grafican los % de captación tumoral a 2 h p.i para los radiopéptidos obtenidos en este trabajo en comparación con otros péptidos análogos cíclicos publicados: $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶⁴, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶⁴, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶³, $^{99m}\text{Tc(EDDA)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴, $^{99m}\text{Tc(Tricina)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴ y $^{99m}\text{Tc(CO)}_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ ¹⁷⁴. $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ es el radiopéptido de mayor captación tumoral entre los cuatro estudiados en este trabajo, sin embargo, la captación tumoral de este es 4x veces menor aproximadamente que el radiopéptido $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ reportado por Guo y Miao ¹⁶⁴. $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ es un análogo cíclico de α -MSH mediante enlace lactama presenta una captación tumoral de 22.3 ± 1.72 % Act/g a 2 h p.i, convirtiéndolo, hasta la fecha, en el líder entre los péptidos análogos de α -MSH.

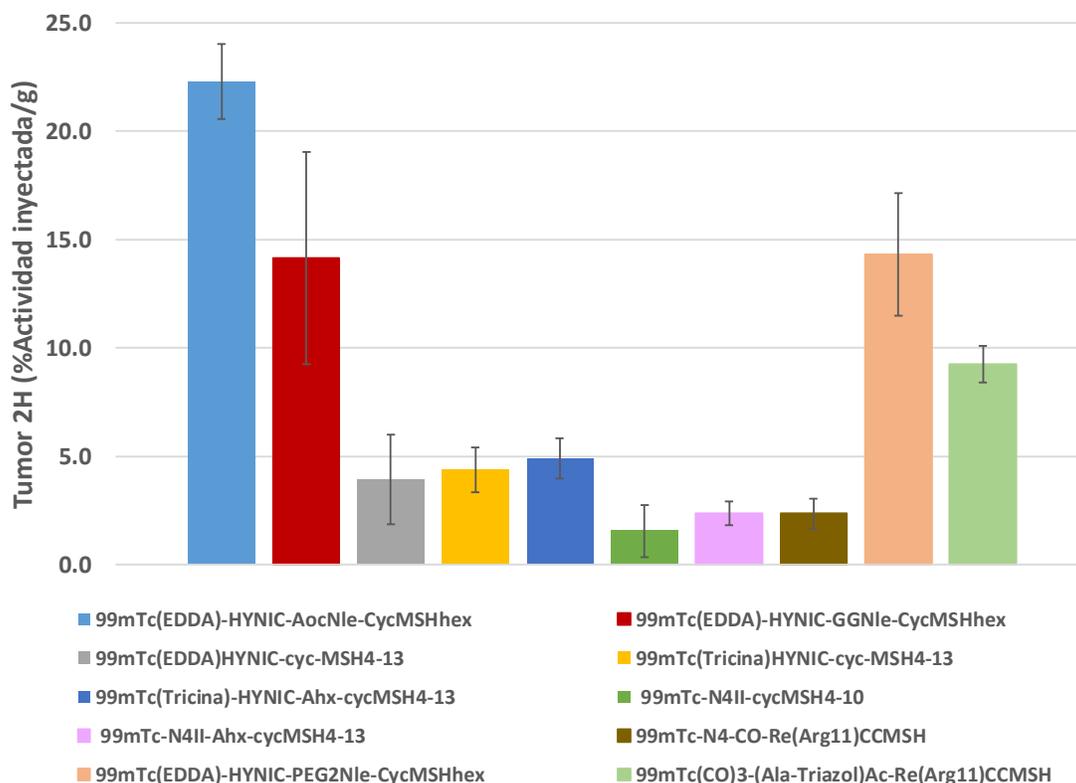


Figura 5.22: Comparación de la captación tumoral entre $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH4-13}$, $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{163}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}^{184}$, $^{99m}\text{Tc(Tricina)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}^{184}$ y $^{99m}\text{Tc(CO)}_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}^{174}$.

Entre los análogos ciclados mediante un átomo metálico $^{99m}\text{Tc}-(\text{Arg}^{11})\text{-CCMSH}$ reportado por *Miao et. al*¹⁷², ciclado por átomo de $^{99m}\text{Tc}=\text{O}$, presenta una captación tumoral de 14.03 ± 2.58 % Act/g a 1 h p.i y 11.16 ± 1.77 % Act/g a 4 h p.i, no encontrándose reportada la captación tumoral a 2 h p.i. El análogo $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$, aquí estudiado, ciclado mediante átomo de $\text{Re}=\text{O}$, presentó una captación tumoral de 3.96 ± 1.98 % Act/g a 1h p.i, descendiendo a 2.35 ± 0.71 % Act/g a 2 h p.i y 1.26 ± 0.62 % Act/g a 4 h p.i. De esta forma el análogo $^{99m}\text{Tc}-(\text{Arg}^{11})\text{-CCMSH}$ continúa siendo el líder dentro de los péptidos análogos de $\alpha\text{-MSH}$ ciclados mediante enlace metálico.

En relación a la captación en riñones, en la Figura 5.23 se pueden comparar los diferentes valores reportados a las 2 h p.i para los análogos. Como se observa, ^{99m}Tc -HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ es el que presenta mayor captación renal. Sin embargo, parte de esta captación se podría disminuir con la co-inyección de L-Lisina, como ha sido reportado ¹⁷¹, disminuye la captación renal hasta un 70 % sin afectar la captación tumoral. Es importante destacar que si bien los análogos $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{163}$, presentan elevada captación tumoral, su captación renal también es elevada. No obstante, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ reportado por *García et. al.* ¹⁸⁴ y los análogos aquí estudiados $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$ y $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, presentan menor captación renal. Por otro lado, $^{99m}\text{Tc}(\text{Arg}^{11})\text{-CCMSH}$ ¹⁷², previamente mencionado, presenta una captación renal de 11.66 ± 1.44 % Act/g a 1 h p.i, siendo superior a la de $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ de 6.83 ± 3.70 % Act/g a 1 h p.i. Esto demuestra que no ha sido desarrollado aún un análogo de α -MSH con las características farmacocinéticas adecuadas para el empleo como agente de diagnóstico de melanoma, siendo todavía un campo de investigación.

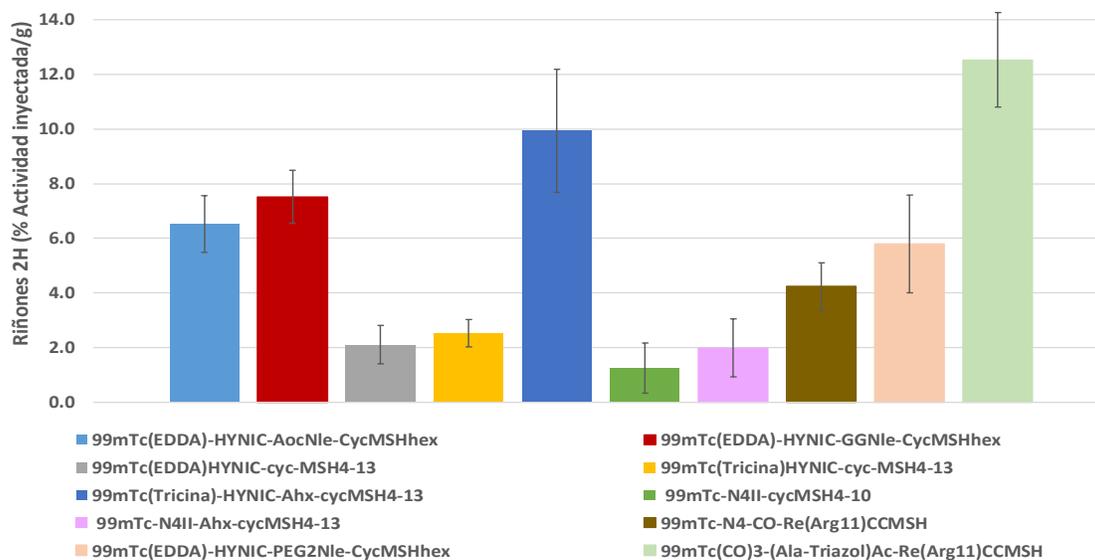


Figura 5.23: Comparación de la captación renal entre $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-cycMSH}_{4-10}$, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{163}$, $^{99m}\text{Tc}(\text{EDDA})\text{HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴, $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ ¹⁸⁴ y $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ ¹⁷⁴.

Con respecto a la captación en hígado, en la Figura 5.24 se pueden apreciar los % reportados para los diferentes análogos. $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ y $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ ¹⁷⁴ presentan la mayor captación hepática. En el caso de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ este resultado es concordante con los resultados de Log P obtenidos, los cuales demostraron mayor hidrofobicidad que los demás análogos aquí estudiados y descritos como se discutió previamente. En el caso de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$, si bien presenta un Log P de -1.41 ± 0.02 ¹⁷⁴, el *core fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ presenta cierta inestabilidad *in vivo* con captación a nivel gastrointestinal y hepática, como ha sido observado también para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶³ y el $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -análogo de bombesina²²⁴. Para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$, aquí estudiado, también se ha observado captación hepática. Concordante con este resultado previamente fue descrita captación hepática *core* $^{99m}\text{TcO}_2^+$ en un N4-antagonista de bombesina ¹⁸⁸. La captación hepática de $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH}_{4-13}}$, aquí estudiada se encuentra entre las menores reportadas hasta el momento.

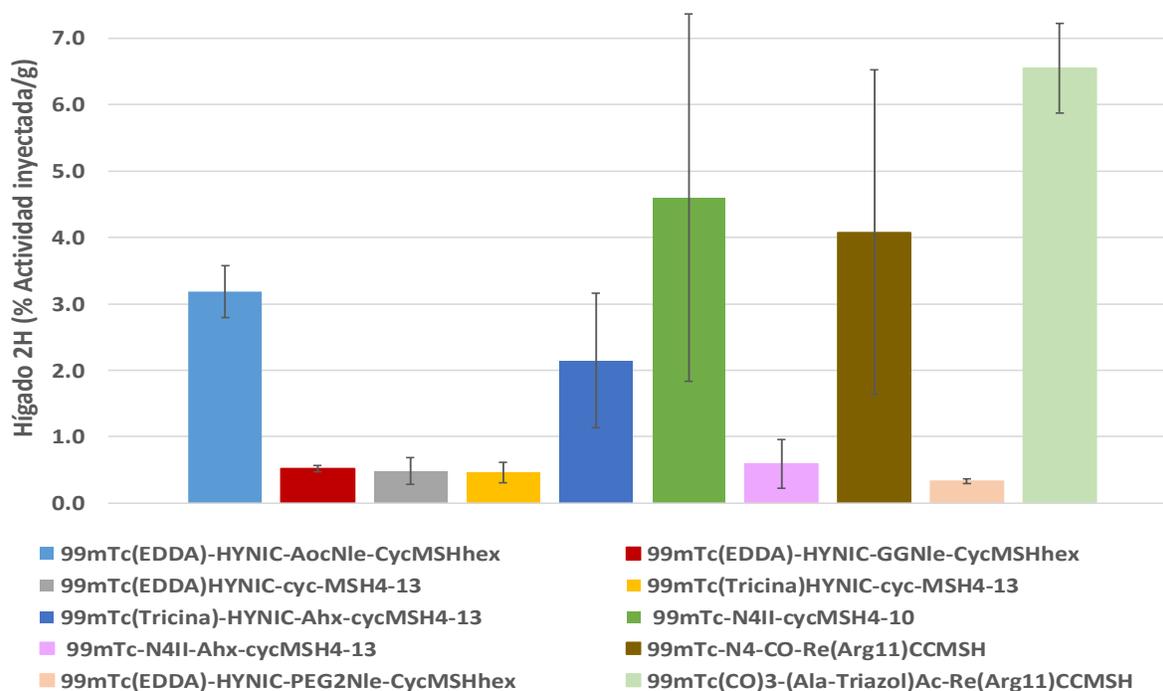


Figura 5.24: Comparación de la captación en hígado entre $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH4-13}$, $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{164}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}^{163}$, $^{99m}\text{Tc(EDDA)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}^{184}$, $^{99m}\text{Tc(Tricina)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}^{184}$ y $^{99m}\text{Tc(CO)}_3\text{-(Ala-Triazol)Ac-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$

174

Las imágenes centellográficas y micro SPECT-CT adquiridas en este trabajo para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH4-13}$, $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$, permitieron la visualización del tumor para los últimos tres radiopéptidos. Los resultados son concordantes con los resultados de biodistribución *in vivo* y de los estudios *in vitro* y fisicoquímicos. Entre los radiopéptidos estudiados, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$ fue el que presentó menor captación tumoral en los estudios de biodistribución y en las imágenes micro SPECT/CT obtenidas no fue posible visualizar el tumor. Esto puede deberse a múltiples factores. Entre ellos que la retención en las células de melanoma no fue suficiente, como se mencionó anteriormente en el estudio en células B16 dado una rápida externalización de la actividad internalizada sumado a una lenta recuperación de los receptores MC1R. Otro factor importante

podría ser que la estructura de este péptido carece de un espaciador como por ejemplo el ácido amino hexanoico (Ahx) empleado en los otros dos péptidos ciclados por enlace lactama ($^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ y $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$). Este espaciador permitiría alejar la esfera de coordinación del ^{99m}Tc de la secuencia conservada [His-Phe-Arg-Trp] necesaria para la unión específica y de alta afinidad por el receptor MC1R^{31,51}. Otros factores que podrían considerarse son el estadio tumoral que podría incluir diferenciación celular y la escasa irrigación sanguínea del tumor (hipoxia tumoral).

Por otro lado, la afinidad por el receptor (IC_{50}) determinada para los cuatro péptidos aquí estudiados fue similar o incluso superior que para otros péptidos análogos de $\alpha\text{-MSH}$ ^{163,164,174,184,172,171,170}. Sin embargo, el perfil de biodistribución y las imágenes obtenidas muestran grandes diferencias en la captación tumoral, acumulación en órganos no blancos y vías de eliminación. Esto confirma, que los ligandos bifuncionales y los coligandos juegan un rol muy importante en la farmacocinética de los radioconjugados.

En relación a las estructuras de los radiopéptidos aquí estudiados, para $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ se estudió el efecto de la introducción del ácido amino hexanoico (-Ahx-) como espaciador en comparación con $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ descrito por *Garcia MF et. al*¹⁸⁴. Con la introducción de este espaciador se buscaba mejorar la captación tumoral al alejar la esfera de coordinación del ^{99m}Tc de la secuencia aminoacídica conservada necesaria para la unión a MC1R. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron una leve mejoría en la captación tumoral a 2 h p.i (Figura 5.22) y una gran diferencia en el perfil de biodistribución *in vivo*, como se aprecia en las Figuras 5.23 y 5.24 la captación renal y hepática se vio severamente aumentada para $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ en relación a $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$.

Para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ se estudió el efecto del ligando bifuncional tetraamino N4_{II} en comparación con HYNIC utilizado en el radiopéptido $^{99m}\text{Tc}(\text{Tricina})\text{HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$. Comparando los resultados obtenidos con ambos radiopéptidos, se puede observar que para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$ se obtuvo un mejor perfil de biodistribución, disminuyéndose la captación hepática y renal a 2 h p.i (Figuras 5.23 y 5.24). Sin embargo, la captación tumoral se vio afectada negativamente, disminuyendo casi un 50 % con $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II}}\text{-Ahx-cycMSH}_{4-13}$.

Con $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ se planteó eliminar el extremo C-terminal Gly-Pro-Val-NH₂, en un intento de mejorar la captación tumoral al eliminar toda posibilidad de impedimento estérico sobre la secuencia de reconocimiento [His-Phe-Arg-Trp]. Dado los resultados obtenidos en el perfil de biodistribución, se empleó el ligando tetraamino N4_{II}. Péptidos análogos de α -MSH cíclicos mediante enlace lactama descritos por *Guo* y *Miao* ^{163,164} presentan una estructura de cycMSH_{hex} sin el extremo C-terminal Gly-Pro-Val-NH₂ similar a la utilizada en $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$. Los análogos descritos por *Guo* y *Miao* $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-PEG}_2\text{Nle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶⁴, $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-AocNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶⁴ y $^{99m}\text{Tc(EDDA)-HYNIC-GGNle-CycMSH}_{\text{hex}}$ ¹⁶³, presentan una elevada captación tumoral como se aprecia en la Figura 5.22. La secuencia del extremo C-terminal ha sido descrita como una secuencia con propiedades de segundo mensajero o farmacóforo ²²⁵, sin embargo, en los radiopéptidos $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH}_{4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-(Tricina)HYNIC-Ahx-cycMSH}_{4-13}$, y los reportados por *Garcia MF et. al* ¹⁸⁴ $^{99m}\text{Tc(Tricina)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$ y $^{99m}\text{Tc(EDDA)HYNIC-cyc-MSH}_{4-13}$, que poseen esta secuencia en el extremo C-terminal, no se observó mejoría en la captación tumoral respecto a cycMSH_{hex} descrito por *Guo* y *Miao* ^{163,164}. En este contexto, en este trabajo se decidió estudiar el efecto de eliminar el extremo C-terminal Gly-Pro-Val-NH₂ en $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$. Lamentablemente, como se discutió anteriormente la captación tumoral disminuyó abruptamente para $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH}_{4-10}}$ en lugar de aumentar.

En relación a $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$, como se mencionó anteriormente en la sección 2 “*Antecedentes y Justificaciones*” se han descrito en la bibliografía diferentes análogos ciclados con átomos metálicos para terapia y diagnóstico, sin embargo, poco se ha estudiado referente a la marcación de análogos Re(Arg¹¹)CCMSH con ^{99m}Tc . De esta forma, en este trabajo se planteó la marcación de Re(Arg¹¹)CCMSH con ^{99m}Tc , empleando el ligando bifuncional tetraamino N4. Con este ligando bifuncional se esperaba obtener un radioconjugado con elevada estabilidad, dado que forma un único isómero de coordinación a diferencia de HYNIC. Los resultados obtenidos en la sección 5.1.4 verificaron una mayor estabilidad. $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ frente a $^{99m}\text{Tc-(Arg}^{11}\text{)-CCMSH}$ presentó menor captación tumoral, siendo a 1 h p.i 3.96 ± 1.98 %Act/g $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ y de 14.03 ± 2.58 %Act/g para $^{99m}\text{Tc-(Arg}^{11}\text{)-CCMSH}$. Sin embargo, la captación renal disminuyó de 11.66 ± 1.44 %Act/g a 1 h p.i para $^{99m}\text{Tc-(Arg}^{11}\text{)-CCMSH}$ a 6.83 ± 3.70 %Act/g a 1 h p.i $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$. Es importante destacar además que el valor descrito de captación renal para $^{99m}\text{Tc-(Arg}^{11}\text{)-CCMSH}$

fue obtenido con una co-inyección *in vivo* de L-lisina. Esta co-inyección de L-lisina disminuye la captación renal, por lo que para $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ se podría disminuir aún más la captación renal empleando esta estrategia. De esta forma, aún se requiere estudio para mejorar la captación tumoral de los péptidos ciclados con átomos metálicos marcados con ^{99m}Tc , refinamiento de las propiedades hidrofílica/hidrofóbicas y de la química de coordinación del ^{99m}Tc con ligandos bifuncionales.

Además, en este trabajo se obtuvo una imagen fluorescente *in vivo* de un análogo de α -MSH ciclado con renio y derivatizado con una sustancia fluorescente el verde de indocianina (ICG). La imagenología fluorescente es una metodología en crecimiento en las ciencias biomédicas y en la clínica médica para la visualización de células y tejidos *in vitro* e *in vivo*. Presenta algunas ventajas como alta sensibilidad, información molecular, económica y fácil de emplear ²²⁶. Dentro de las sustancias fluorescentes, el verde de indocianina es ampliamente utilizado de rutina en la práctica clínica en diversos usos desde hace aproximadamente 60 años ^{226,81,227}. En este trabajo se estudió las propiedades de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH como trazador fluorescente para melanoma. La principal limitante de los trazadores fluorescentes es la capacidad de visualización a través de las sucesivas capas de la piel (sensibilidad). Esta limitante podría ser sobrellevada al derivatizar el trazador fluorescente con un radionucleido emisor gamma, dando así lugar a un trazador híbrido radioactivo y fluorescente. Las imágenes de fluorescencia obtenidas con ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH permitieron observar captación tumoral y debido a su elevada hidrofobicidad, se observó fluorescencia a nivel abdominal que puede corresponder a la presente en hígado y a nivel gastrointestinal. El principal valor de ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH es poder contar con un análogo de la α -MSH fluorescente para melanoma es que permitirá la identificación de forma específica de melanomas durante la evaluación clínica de múltiples lesiones cutáneas (por ejemplo, múltiples lunares en espalda) que permitan identificar de cuales hacer una biopsia. En estos casos la biopsia de todas las lesiones sería un método cruento. Sin embargo, si se cuenta con un trazador específico fluorescente que indique cuales tienen mayor probabilidad de ser melanomas, sería mucho más sencillo seleccionar aquellas que deben ser biopsiadas.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

SÍNTESIS ORGÁNICA:

- Se logró sintetizar adecuadamente el ligando bifuncional tetraamino derivado de cyclam (LB-II), el cual se conjugó con dos péptidos análogos de α -MSH (N₄_{II}-cycMSH₄₋₁₀ y N₄_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃) para evaluar sus performances como agentes de diagnóstico.
- En relación a la síntesis del tetraamino de cadena abierta (LB-I), se han presentado inconvenientes por no contar con el equipamiento necesario para la síntesis. Afortunadamente fue igualmente posible contar con dicho ligando de forma comercial y conjugarlo a un péptido análogo de α -MSH, obteniéndose N₄-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH.
- Fue posible sintetizar correctamente el ligando bifuncional HYNIC protegido con el grupo BOC y TFA. HYNIC-BOC y HYNIC-TFA fueron utilizados posteriormente en la conjugación con el péptido Ahx-cycMSH₄₋₁₃.
- En el marco de una beca de movilidad financiada por ANII (beca MOV-CA-2013-1-10984) fue posible realizar la síntesis de los péptidos N₄_{II}-cycMSH₄₋₁₀ y N₄_{II}-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ en la Universidad de Missouri (EEUU). Los otros dos péptidos aquí estudiados (HYNIC-Ahx-cycMSH₄₋₁₃ y N₄-CO-Re(Arg¹¹)CCMSH) fueron sintetizados por el Prof. Fabio Gallazzi de la Universidad de Missouri.

MARCACIÓN Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE α -MSH CON ^{99m}Tc :

- Se logró optimizar las condiciones de marcación para la obtención de los cuatro radiopéptidos $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC(tricina)-Ahx-cycMSH4-13}$ y $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ con una pureza radioquímica adecuada (>95%).
- Se logró purificar eficientemente los cuatro péptidos marcados de su correspondiente péptido no marcado mediante metodología de HPLC.
- La evaluación fisicoquímica y biológica de los cuatro radiopéptidos, los mostraron estables y con buen perfil para la de detección *in vivo* de células que sobreexpresen MC1R.
- Se realizaron estudios *in vivo* de biodistribución y adquisición de imágenes centellográficas y micro-SPECT-CT en ratones portadores de melanoma para los cuatro radiopéptidos. Observándose concordancia con los resultados fisicoquímicos e *in vitro*. Los resultados indican que $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$, $^{99m}\text{Tc-HYNIC(tricina)-Ahx-cycMSH4-13}$ y $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ presentan buena captación tumoral, buena eliminación renal y metabolismo hepatobiliar. $^{99m}\text{Tc-HYNIC(tricina)-Ahx-cycMSH4-13}$ ha demostrado la mejor captación tumoral, sin embargo, $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-Ahx-cycMSH4-13}}$ presenta el mejor perfil farmacocinético. $^{99m}\text{Tc-N4-CO-Re(Arg}^{11}\text{)CCMSH}$ ha presentado la mayor captación hepática y gastrointestinal. Con $^{99m}\text{Tc-N4}_{\text{II-cycMSH4-10}}$ se observó baja captación tumoral en los estudios de biodistribución y no fue posible visualizar el tumor en las imágenes adquiridas, esto podría deberse a la ausencia del espaciador -Ahx- para alejar la esfera de coordinación del ^{99m}Tc de la secuencia conservada necesaria para el reconocimiento del receptor MC1R. Otra explicación factible, es la poca permeancia en la célula del radiopéptido luego de la internalización, como fue observado en el estudio en células B16 F1.

- Resumiendo, en este trabajo se evaluó el desempeño *in vitro* e *in vivo* de cuatro nuevos péptidos análogos de α -MSH ciclados mediante dos estrategias diferentes (enlace lactama y átomo metálico) marcados con ^{99m}Tc como agentes de diagnóstico específicos para melanoma. También se estudiaron nuevas estrategias de marcación de cuatro péptidos análogos de α -MSH con ^{99m}Tc , utilizando tres ligandos bifuncionales (HYNIC, N4 y N4II), para su aplicación como potencial radiofármaco de diagnóstico específico de melanoma.
- Comparando los resultados aquí obtenidos para los cuatro radiopéptidos con los descritos en bibliografía se puede concluir que los péptidos análogos de α -MSH ciclados mediante enlace lactama y mediante átomo de renio marcados con ^{99m}Tc comparten características fundamentales como potenciales agentes de diagnóstico para melanoma. Sin embargo, se debe continuar el estudio con cambios estructurales que permitan disminuir la captación inespecífica a nivel gastro-intestinal y riñones. También sería interesante la evaluación en un modelo de melanoma humano para valorar captación tumoral y perfil farmacocinético.
- En este trabajo también se evaluó un nuevo agente fluorescente específico para melanoma, ICG-Ahx-AhxRe(Arg¹¹)CCMSH, determinándose que el mismo presenta un potencial valor clínico en la identificación de lesiones que sobreexpresan el receptor de MC1R que estarían ligadas a melanoma. Sería de interés estudiar el desempeño de este nuevo compuesto marcado con ^{99m}Tc como posible agente de detección de ganglios centinelas.

7. ABREVIATURAS

- ACTH: hormona adrenocorticotropina (del inglés *Adrenocorticotropic hormone*)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- BFC: Agente quelante bifuncional (del inglés *bifunctional coupling agents*)
- cAMP: Adenosín monofosfato cíclico (del inglés *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*)
- CCB: Carcinoma de células basales
- CCE: Carcinoma de células escamosas
- CT: tomografía computada (del inglés *computed tomography*)
- DCM: diclorometano
- DMEM: Dulbecco modificación Eagle (medio de cultivo celular).
- FDA: Food and Drug Administration
- GPCR: receptores acoplados a proteínas G (del inglés *G protein-coupled receptors*)
- HPLC: Cromatografía líquida de alta performance
- HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta performance – Espectrometría de masas
- IARC: International Agency for Research on Cancer.
- IC₅₀: concentración inhibitoria media (del inglés *inhibitory concentration 50*)
- IR: Infrarrojo
- MC1R: receptor de melanocortina tipo 1 (del inglés *melanocortin receptor*)
- MITF: factor de transcripción asociado a la microftalmia (del inglés *microphthalmia-associated transcription factor*)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- p.i.: post-inyección
- PET-CT: tomografía de emisión de positrones (del inglés *positron emission tomography - computed tomography*)
- POMC: Proopiomelanocortina (del inglés *pro-opiomelanocortin*)
- PRQ: Pureza radioquímica
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- SEER: Surveillance Epidemiology and End Results Program
- SFB: Suero Fetal Bovino
- SFB:suero fetal bovino
- SPECT-CT: tomografía computada de emisión de fotón único (del inglés *single photon emission-computed tomography*)
- t_{1/2}: período de semidesintegración
- TM: transmembrana
- UV: ultravioleta
- α-MSH: Hormona melanocito estimulante (del inglés *melanocyte stimulating hormone*)

7.1.1. Química Orgánica

- 2-CITrt: 2-clorotritilo
- Acm: acetamidometil
- All: alil
- Alloc: aliloxicarbonil
- Arg: arginina
- Asn: asparagina
- Asp: ácido aspártico
- Boc: t-butiloxicarbonil
- Boc: *ter*-butiloxicarbonilo
- Boc₂O: di-*tert*-butil-dicarbonato
- Bt: 1-benzotriazolilo
- Bum: *ter*-butiloximetilo
- Bz: benzoilo
- Bzl: bencilo
- Cbz: benciloxicarbonilo
- Cys: cisteína
- DCC: dicitclohexilcarbodiimida
- DCM: diclorometano
- DIC: diisopropilcarbodiimida
- DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina
- DMF: *N,N*-dimetilformamida
- DMSO: Dimetil sulfoxido
- EDT: 1,2-etanoditiol
- EtOH: etanol
- Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
- Gln: glicina
- Glu: ácido glutámico
- HATU: hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio
- HBTU: hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio
- His: histidina
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- HYNIC: 6-hidrazinonicotinil (del inglés *hydrazinonicotinic acid*)
- Lys: lisina
- MAG₃: mercaptoacetil-glicilglicilglicina
- MeOH: metanol
- Mmt: 4-metoxitritilo
- Mtt: 4-metiltritilo
- N-Dde: *N*-delta- [1- (4,4-dimetil-2,6-dioxycyclohex-1-ilidina) etil
- NMM: *N*-metilmorfolina
- NMP: *N*-metil-2-pirrolidona

- O-2-PhiPr: 2-fenilisopropil éster
- O-Dmab: 4- {N- [1- (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden) -3-metilbutil] amino} bencilo
- OPfp: éster de pentafluorofenol
- OtBu: éster terc-butílico
- Pfp: pentafluorofenol
- Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
- PyBOP: hexafluorofosfato de (3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)tripirrolidino fosfonio
- Pz: pyrazolyl-diamine
- RMN: resonancia magnética nuclear
- Ser: serina
- SPSS: síntesis en fase sólida
- S-tBu: S-tert-butiltiol
- Suc: succinil
- tBu: tert-butilo
- TFA: ácido trifluoroacético
- THF: tetrahidrofurano
- Thr: treonina
- TIS: tioanisol
- Trp: triptófano
- Trt: tritilo
- Tyr: tirosina

8. AGRADECIMIENTOS

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

A mi familia, a Andrés y amigas, por acompañarme en todos los momentos y ser mi soporte.

A mis directores de tesis, 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 Centro de Investigaciones Nucleares, 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 profesores y amigos de la Universidad de Missouri, muy especialmente a los Dres. Thomas Quinn, Fabio Gallazzi y Xiuli Zhang por su tiempo, interés y enseñanza.

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

A Natalia Oddone 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 (Becas MOV-CA-2013-1-10984, POS_NAC_2013_1_11945 y POS_NAC_2011_1_3493).*
- *Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA-Química, Uruguay*
- *Comisión Honoraria de la Lucha Contra el Cáncer*

Muchas Gracias a todos por su aporte

Vania

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) NCI. National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer#related-diseases> (accessed Mar 19, 2016).
- (2) Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*, 2nd Ed.; Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: New York, 2014.
- (3) Pierce, B. A. *Genética / Genetics: Un Enfoque Conceptual / A Conceptual Approach*, 3a. ed.; Editorial Médica Panamericana, D.L.: Buenos Aires, Madrid., 2009.
- (4) Organización Mundial de la Salud. Datos Y Cifras Sobre El Cancer 1. <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/> (accessed Mar 20, 2016).
- (5) American Cancer Society. The Burden | The Cancer Atlas <http://canceratlas.cancer.org/the-burden/> (accessed Mar 21, 2016).
- (6) Organization, W. H. Cancer country profiles 2014: Uruguay http://www.who.int/cancer/country-profiles/bra_en.pdf?ua=1 <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/> (accessed Mar 21, 2016).
- (7) PAHO. Cancer Mortality in the Americas, 2012 http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10391:2015-mortality-from-cancer-in-countries-of-the-americas-2012&catid=7237:info&Itemid=41167&lang=en (accessed Mar 21, 2016).
- (8) IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Uruguay http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (accessed Mar 27, 2016).
- (9) Rassner, G.; Rassner. *Manual Y Atlas de Dermatología*; S.A. ELSEVIER ESPAÑA, 1999.
- (10) Magaña García, M.; Magañana Lozano, M. *Dermatología*; Médica Panamericana, 2003.
- (11) Valle, L. *Dermatología General. Enfoque Práctico (Medicina - Dermatología)*, 2da. ed.; DUNKEN: Buenos Aires, 2012.
- (12) Eckert, R. L.; Rorke, E. A. Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. *Environmental Health Perspectives*. 1989, pp 109–116.
- (13) Martín-Gorgojo, A.; Pastushenko, I. Strategies for the Early Diagnosis of Melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, 105 (6), 621–622.
- (14) Rizos, H.; Becquer, T. M.; Holland, E. A. Cell Cycle Regulation in the Melanocyte. In *Textbook of Melanoma: Pathology, Diagnosis and Management*; Thompson, J. F., Morton, D. L., Kroon, B. B. R., Eds.; Taylor & Francis: New York, 2003.
- (15) Schaffer, J. V.; Bolognia, J. L. The Melanocortin-1 Receptor: Red Hair and beyond. *Arch Dermatol* **2001**, 137 (11), 1477–1485.
- (16) Lavanderos, J. F.; Antonio Pérez, J. P.; Jeria, S. N.; Concha, D. C. TRABAJO DE ACTUALIZACIÓN Actualizaciones En Melanoma Maligno Cutáneo. *Cuad. Cir* **2010**, 24, 47–56.
- (17) Raposo, G.; Marks, M. S. Melanosomes--Dark Organelles Enlighten Endosomal Membrane Transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8 (10), 786–797.
- (18) Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin Melanocytes: Biology and Development. *Postępy Dermatologii i Alergol. XXX Postępy Derm Alergol* **2013**, 1 (1), 30–41.
- (19) Surget, S.; Khoury, M. P.; Bourdon, J.-C. Uncovering the Role of p53 Splice Variants in Human Malignancy: A Clinical Perspective. *Onco. Targets. Ther.* **2013**, 7, 57–68.

- (20) The p53 Tumor Suppressor Protein. *Natl. Cent. Biotechnol. Inf. (US). Genes Dis. [Internet]. Bethesda Natl. Cent. Biotechnol. Inf.* **1998**.
- (21) Sirigu, P.; Piras, F.; Minerba, L.; Murtas, D.; Maxia, C.; Colombari, R.; Corbu, A.; Perra, M. T.; Ugalde, J. Prognostic Prediction of the Immunohistochemical Expression of p16 and p53 in Cutaneous Melanoma: A Comparison of Two Populations from Different Geographical Regions. *Eur. J. Histochem.* **2006**, *50* (3), 191–198.
- (22) Straume, O.; Sviland, L.; Akslen, L. A. Loss of Nuclear p16 Protein Expression Correlates with Increased Tumor Cell Proliferation (Ki-67) and Poor Prognosis in Patients with Vertical Growth Phase Melanoma Loss of Nuclear p16 Protein Expression Correlates with Increased Tumor Cell Proliferatio. **2000**, 1845–1853.
- (23) Harting, D. Malignant Melanoma. *Radiat. Ther.* **2014**, *23* (1), 51–76.
- (24) Terakita, A. Protein Family Review The Opsins. *Genome Biol.* **2005**, 1–9.
- (25) Tatro, J. B.; Entwistle, M. L.; Lester, B. R.; Reichlin, S. Melanotropin Receptors of Murine Melanoma Characterized in Cultured Cells and Demonstrated in Experimental Tumors in Situ. *Cancer Res.* **1990**, *50* (4), 1237–1242.
- (26) Cone, R. D.; Lu, D.; Koppula, S.; Vage, D. I.; Klungland, H.; Boston, B.; Chen, W.; Orth, D. N.; Pouton, C.; Kesterson, R. A. The Melanocortin Receptors: Agonists, Antagonists, and the Hormonal Control of Pigmentation. *Recent Prog Horm Res* **1996**, *51*, 287–318.
- (27) Yang, Y. Structure, Function and Regulation of the Melanocortin Receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *660* (1), 125–130.
- (28) Abdel-Malek, Z. a. Melanocortin Receptors: Their Functions and Regulation by Physiological Agonists and Antagonists. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 434–441.
- (29) Scott, M. C.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Kadekaro, A. L.; Kobayashi, N.; Groden, J.; Kavanagh, R.; Takakuwa, T.; Virador, V.; Hearing, V. J.; et al. Human Melanocortin 1 Receptor Variants, Receptor Function and Melanocyte Response to UV Radiation. *J. Cell Sci.* **2002**, *115* (Pt 11), 2349–2355.
- (30) Abdel-Malek, Z.; Swope, V. B.; Suzuki, I.; Akcali, C.; Harriger, M. D.; Boyce, S. T.; Urabe, K.; Hearing, V. J. Mitogenic and Melanogenic Stimulation of Normal Human Melanocytes by Melanotropic Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (5), 1789–1793.
- (31) Miao, Y.; Whitener, D.; Feng, W.; Owen, N. K.; Chen, J.; Quinn, T. P. Evaluation of the Human Melanoma Targeting Properties of Radiolabeled Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide Analogues. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (6), 1177–1184.
- (32) Siegrist, W.; Solca, F.; Stutz, S.; Giuffrè, L.; Carrel, S.; Girard, J.; Eberle, a N. Characterization of Receptors for Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone on Human Melanoma Cells. *Cancer Res.* **1989**, *49* (22), 6352–6358.
- (33) Tatro, J. B.; Atkins, M.; Mier, J. W.; Hardarson, S.; Wolfe, H.; Smith, T.; Entwistle, M. L.; Reichlin, S. Melanotropin Receptors Demonstrated in Situ in Human Melanoma. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85* (6), 1825–1832.
- (34) Chhajlani, V.; Wikberg, J. E. Molecular Cloning and Expression of the Human Melanocyte Stimulating Hormone Receptor cDNA. *FEBS Lett.* **1992**, *309* (3), 417–420.
- (35) Mountjoy, K. G.; Robbins, L. S.; Mortrud, M. T.; Cone, R. D. The Cloning of a Family of Genes That Encode the Melanocortin Receptors. *Science* **1992**, *257* (5074), 1248–1251.
- (36) Prusis, P.; Frandberg, P. A.; Muceniece, R.; Kalvinsh, I.; Wikberg, J. E. S. A Three-Dimensional Model for the Interaction of MSH with the Melanocortin-1 Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *210* (1), 205–210.

- (37) Prusis, P.; Schiöth, H. B.; Muceniece, R.; Herzyk, P.; Afshar, M.; Hubbard, R. E.; Wikberg, J. E. S. 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.* **1997**, *15* (5), 307–317.
- (38) García-Borrón, J. C.; Sánchez-Laorden, B. L.; Jiménez-Cervantes, C. Melanocortin-1 Receptor Structure and Functional Regulation. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18* (6), 393–410.
- (39) Ibarrola-Villava, M.; Peña-Chilet, M.; Llorca-Cardenosa, M. J.; Oltra, S.; Cadenas, C.-M.; Bravo, J.; Ribas, G. Modeling MC1R Rare Variants: A Structural Evaluation of Variants Detected in a Mediterranean Case-Control Study. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (4), 1146–1149.
- (40) Hodi, F. S.; O'Day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363* (8), 711–723.
- (41) Haskell-Luevano, C.; Sawyer, T. K.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Bikker, J. A.; Humblet, C.; Gantz, I.; Hruby, V. J. Three-Dimensional Molecular Models of the hMC1R Melanocortin Receptor: Complexes with Melanotropin Peptide Agonists. *Drug Des. Discov.* **1996**, *14* (3), 197–211.
- (42) Chhajlani, V.; Xu, X.; Blauw, J.; Sudarshi, S. Identification of Ligand Binding Residues in Extracellular Loops of the Melanocortin 1 Receptor.
- (43) Wallin, E.; von Heijne, G. Properties of N-Terminal Tails in G-Protein Coupled Receptors: A Statistical Study. *Protein Eng.* **1995**, *8* (7), 693–698.
- (44) Sánchez-Más, J.; Sánchez-Laorden, B. L.; Guillo, L. A.; Jiménez-Cervantes, C.; García-Borrón, J. C. The Melanocortin-1 Receptor Carboxyl Terminal Pentapeptide Is Essential for MC1R Function and Expression on the Cell Surface. *Peptides* **2005**, *26* (10), 1848–1857.
- (45) Chhajlani, V.; Wikberg, J. E. Molecular Cloning and Expression of the Human Melanocyte Stimulating Hormone Receptor cDNA (FEBS 11553). *FEBS Lett.* **1996**, *390* (2), 238.
- (46) Frändberg, P. A.; Doufexis, M.; Kapas, S.; Chhajlani, V. 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.* **2001**, *281* (4), 851–857.
- (47) Yang, Y. K.; Dickinson, C.; Haskell-Luevano, C.; Gantz, I. Molecular Basis for the Interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷]melanocyte Stimulating Hormone with the Human Melanocortin-1 Receptor (melanocyte α -MSH Receptor). *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (37), 23000–23010.
- (48) Voisey, J.; Carroll, L.; van Daal, A. Melanocortins and Their Receptors and Antagonists. *Curr. Drug Targets* **2003**, *4* (7), 586–597.
- (49) Silva, A. A.; Carmo, J. M.; Wang, Z.; Hall, J. E. The Brain Melanocortin System, Sympathetic Control, and Obesity Hypertension. *Physiology (Bethesda)*. **2014**, *29* (3), 196–202.
- (50) Slominski, A.; Wortsman, J.; Luger, T.; Paus, R.; Solomon, S. Corticotropin Releasing Hormone and Proopiomelanocortin Involvement in the Cutaneous Response to Stress. *Physiol. Rev.* **2000**, *80* (3), 979–1020.
- (51) Raposinho, P. D.; Correia, J. D. G.; Oliveira, M. C.; Santos, I. Melanocortin-1 Receptor-Targeting with Radiolabeled Cyclic α -Melanocyte-Stimulating Hormone Analogs for Melanoma Imaging. *Biopolymers* **2010**, *94* (6), 820–829.
- (52) American Cancer Society. Cáncer de piel: células basales y células escamosas <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002321-pdf.pdf> (accessed Mar 21, 2016).
- (53) Simoes, M. C. F.; Sousa, J. J. S.; Pais, A. A. C. C. Skin Cancer and New Treatment Perspectives: A Review. *Cancer Lett.* **2015**, *357* (1), 8–42.

- (54) Ali, Z.; Yousaf, N.; Larkin, J. Melanoma Epidemiology, Biology and Prognosis. *Eur. J. Cancer, Suppl.* **2013**, *11* (2), 81–91.
- (55) Karakousis, G. C.; Czerniecki, B. J. Diagnosis of Melanoma. *PET Clin.* **2011**, *6* (1), 1–8.
- (56) Chummun, S.; McLean, N. R. The Management of Malignant Skin Cancers. *Surg.* **2014**, *32* (9), 485–490.
- (57) Cho, Y. R.; Chiang, M. P. Epidemiology, Staging (New System), and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Clin. Plast. Surg.* **2010**, *37* (1), 47–53.
- (58) WHO | Skin cancers <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> (accessed Mar 27, 2016).
- (59) Armstrong, B. Epidemiology of Cutaneous Melanoma and Current Trends. In *Textbook of Melanoma: Pathology, Diagnosis and Management*; Thompson, J. F., Morton, D. L., Kroon, B. B. R., Eds.; Taylor & Francis: New York, 2003.
- (60) Cancer Australia. Melanoma of the skin statistics | Cancer Australia <http://canceraustralia.gov.au/affected-cancer/cancer-types/melanoma-skin/melanoma-skin-statistics> (accessed Mar 28, 2016).
- (61) Melanoma Institute Australia. Melanoma facts and statistics <http://www.melanoma.org.au/understanding-melanoma/melanoma-facts-and-statistics/> (accessed Mar 28, 2016).
- (62) National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Melanoma of the Skin <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (accessed Mar 27, 2016).
- (63) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016 <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf> (accessed Mar 28, 2016).
- (64) Bleyer A, O’Leary M, Barr R, R. L. (eds). SEER Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15-29 Years of Age. *Cancer Epidemiol. older Adolesc. young adults 15 to 29 years age, Incl. SEER Incid. Surviv. 1975-2000* **2006**, 53–73.
- (65) Masloski, J. E.; Piat, G. L.; Maria, A.; Sanchez, L.; Cesar, J.; Rosa, D. Melanoma. *Rev. Posgrado la Via Catedra Med.* **2008**, No. 4, 9–16.
- (66) American Cancer Society. Cancer de piel tipo melanoma <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002312-pdf.pdf> (accessed Mar 28, 2016).
- (67) U.S. Department of Health and Human Services. Ultraviolet-Radiation-Related Exposures. *Rep. Carcinog. Twelfth Ed.* **2011**, No. 2000, 429–434.
- (68) General and Plastic Surgery Devices: Reclassification of Ultraviolet Lamps for Tanning, Henceforth To Be Known as Sunlamp Products and Ultraviolet Lamps Intended for Use in Sunlamp Products. **2014**, 20993–2.
- (69) Fisher, D. E.; James, W. D. Indoor Tanning — Science, Behavior, and Policy. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363* (71), 901–903.
- (70) Kefford, R. F.; Mann, G. J.; Newton Bishop, J. Genetic Predisposition to Melanoma. In *Textbook of Melanoma: Pathology, Diagnosis and Management*; Thompson, J. F., Morton, D. L., Kroon, B. B. R., Ed.; Taylor & Francis: New York, 2003.
- (71) Flaherty, K. T.; Puzanov, I.; Kim, K. B.; Ribas, A.; McArthur, G. A.; Sosman, J. A.; O, P. J.; Lee, R. J.; Grippo, J. F.; Nolop, K.; et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *n engl j med* **2010**, *363* (26).
- (72) Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417* (6892), 949–954.
- (73) Kerry Crotty, Stanley McCarthy, M. C. M. J. The Histological Diagnosis and Classification of Melanoma. In *Textbook of Melanoma: Pathology, Diagnosis and Management*; Thompson, J. F., Morton, D. L., Kroon,

- B. B. R., Eds.; Taylor & Francis: New York, 2003.
- (74) Skin Cancer Foundation. Warning Sings: The ABCDEs of Melanoma <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma#panel1-1> (accessed Jan 8, 2016).
 - (75) Edge S.B., Byrd D.R., Compton C.C., Fritz A.G., Greene F.L., T. A. AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual (7th Edition). *Am. Jt. Commitee Cancer* **2010**, 38 (2), 2011.
 - (76) Balch, C. M.; Soong, S.; Atkins, M. B.; Buzaid, A. C.; Cascinelli, N.; Coit, D. G.; Fleming, I. D.; Gershenwald, J. E.; Houghton, A.; Kirkwood, J. M.; et al. An Evidence-Based Staging System for Cutaneous Melanoma. *CA. Cancer J. Clin.* **2004**, 54 (3), 131–149; quiz 182–184.
 - (77) Jost, L. M. ESMO Minimum Clinical Recommendations for Diagnosis, Treatment and Follow-up of Cutaneous Malignant Melanoma. *Ann. Oncol.* **2003**, 14 (7), 1012–1013.
 - (78) Mariani, G.; Gipponi, M.; Moresco, L.; Villa, G.; Bartolomei, M.; Mazzarol, G.; Bagnara, M. C.; Romanini, A.; Cafiero, F.; Paganelli, G.; et al. Radioguided Sentinel Lymph Node Biopsy in Malignant Cutaneous Melanoma. *J Nucl Med* **2002**, 43, 811–827.
 - (79) Rager, E. L.; Bridgeford, E. P.; Ollila, D. W. Cutaneous Melanoma: Update on Prevention, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Am. Fam. Physician* **2005**, 72 (2), 269–276.
 - (80) Alonso, O.; Martinez, M.; Delgado, L.; De Leon, A.; De Boni, D.; Lago, G.; Garces, M.; Fontes, F.; Espasandin, J.; Priario, J. Staging of Regional Lymph Nodes in Melanoma Patients by Means of 99mTc-MIBI Scintigraphy. *J. Nucl. Med.* **2003**, 44 (10), 1561–1565.
 - (81) Niebling, M. G.; Pleijhuis, R. G.; Bastiaannet, E.; Brouwers, A. H.; Van Dam, G. M.; Hoekstra, H. J. A Systematic Review and Meta-Analyses of Sentinel Lymph Node Identification in Breast Cancer and Melanoma, a Plea for Tracer Mapping. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2016**, 42 (4), 466–473.
 - (82) Richard, M. A.; Grob, J. J.; Avril, M. F.; Delaunay, M.; Gouvernet, J.; Wolkenstein, P.; Souteyrand, P.; Dreno, B.; Bonerandi, J. J.; Dalac, S.; et al. Delays in Diagnosis and Melanoma Prognosis (II): The Role of Doctors. *Int. J. Cancer* **2000**, 89 (3), 280–285.
 - (83) Savoye, I.; Jegou, D.; Kvaskoff, M.; Rommens, K.; Boutron-Ruault, M. C.; Coppieters, Y.; Francart, J. Is Melanoma Survival Influenced by Month of Diagnosis? *Cancer Epidemiol.* **2015**, 39 (5), 727–733.
 - (84) Weinstein, D.; Leininger, J.; Hamby, C.; Safai, B. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2014**, 7 (6), 13–24.
 - (85) Boleaga Durán, B. Imagenología Molecular. *An. Radiol. México* **2004**, 2, 63–64.
 - (86) Fass, L. Imaging and Cancer: A Review. *Mol. Oncol.* **2008**, 2, 115–152.
 - (87) Saga, T.; Koizumi, M.; Furukawa, T.; Yoshikawa, K.; Fujibayashi, Y. Molecular Imaging of Cancer-Evaluating Characters of Individual Cancer by PET/SPECT Imaging. *Cancer Sci.* **2009**, 100 (3), 375–381.
 - (88) Ro, T. L.; Ametamey, S. M. PET Chemistry: An Introduction. In *Basic Sciences of Nuclear Medicine*; 2011; pp 65–101.
 - (89) Gomes, C. M.; Abrunhosa, A. J.; Ramos, P.; Pauwels, E. K. J. Molecular Imaging with SPECT as a Tool for Drug Development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63 (7), 547–554.
 - (90) Wadsak, W.; Mitterhauser, M. Basics and Principles of Radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur. J. Radiol.* **2010**, 73 (3), 461–469.
 - (91) Jang, B. S. MicroSPECT and microPET Imaging of Small Animals for Drug Development. *Toxicol. Res.* **2013**, 29 (1), 1–6.
 - (92) Siemens. Inveon http://weill.cornell.edu/cbic/facilities/br_09_inveon.pdf (accessed Aug 3, 2016).
 - (93) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Adv. Drug Deliv.*

- Rev.* **2010**, *62* (11), 1031–1051.
- (94) Liu, S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (12), 1347–1370.
- (95) Liu, S.; Edwards, D. S. ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2235–2268.
- (96) Saleh, T. B. Radiopharmacy: Basics. In *Basic Sciences of Nuclear Medicine*; 2011; pp 25–39.
- (97) Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-Specific Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33* (7), 445–461.
- (98) Mazzi, U.; Schibli, R.; Pietzsch, H.-J.; Künstler, J.-U.; Spies, H. Technetium in Medicine. In *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 7–58.
- (99) Zolle, U. *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*; Zolle, I., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- (100) Rey, A. Aplicación de nuevos cores de Tc al diseño de Radiofármacos <http://www.alasbimn.net/comites/rf/material/radiofarmacia.pdf> (accessed Jul 3, 2016).
- (101) Liu, S.; Edwards, D. S.; Harris, A. R.; Heminway, S. J.; Barrett, J. A. Technetium Complexes of a Hydrazinonicotinamide-Conjugated Cyclic Peptide and 2-Hydrazinopyridine: Synthesis and Characterization. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (6), 1326–1335.
- (102) Decristoforo, C.; Maina, T.; Nock, B.; Gabriel, M.; Cordopatis, P.; Moncayo, R. ^{99m}Tc-Demotate 1: First Data in Tumour Patients - Results of a Pilot/phase I Study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (9), 1211–1219.
- (103) Nock, B.; Nikolopoulou, A.; Chiotellis, E.; Loudos, G.; Maintas, D.; Reubi, J. C.; Maina, T. [^{99m}Tc]Demobesin 1, a Novel Potent Bombesin Analogue for GRP Receptor-Targeted Tumour Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (2), 247–258.
- (104) Nikolopoulou, A.; Maina, T.; Sotiriou, P.; Cordopatis, P.; Nock, B. A. Tetraamine-Modified Octreotide and Octreotate: Labeling with ^{99m}Tc and Preclinical Comparison in AR4-2J Cells and AR4-2J Tumor-Bearing Mice. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12* (2), 124–131.
- (105) Maina, T.; Nock, B.; Nikolopoulou, A.; Sotiriou, P.; Loudos, G.; Maintas, D.; Cordopatis, P.; Chiotellis, E. [^{99m}Tc]Demotate, a New ^{99m}Tc-Based [Tyr³]octreotate Analogue for the Detection of Somatostatin Receptor-Positive Tumours: Synthesis and Preclinical Results. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29* (6), 742–753.
- (106) Tsao, N.; Chanda, M.; Yu, D. F.; Kurihara, H.; Zhang, Y. H.; Mendez, R.; David, J. Y. ^{99m}Tc-N⁴amG: Synthesis Biodistribution and Imaging in Breast Tumor-Bearing Rodents. *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *72*, 105–113.
- (107) Abrams, M. J.; Juweid, M.; tenKate, C. I.; Schwartz, D. A.; Hauser, M. M.; Gaul, F. E.; Fucello, A. J.; Rubin, R. H.; Strauss, H. W.; Fischman, A. J. Technetium-^{99m}-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *J. Nucl. Med.* **1990**, *31* (12), 2022–2028.
- (108) Decristoforo, C.; Mather, S. J. ^{99m}Tc-Technetium-Labelled Peptide-HYNIC Conjugates: Effects of Lipophilicity and Stability on Biodistribution. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26* (4), 389–396.
- (109) Meszaros, L. K.; Dose, A.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. Hydrazinonicotinic Acid (HYNIC) – Coordination Chemistry and Applications in Radiopharmaceutical Chemistry. *Inorganica Chim. Acta* **2010**, *363* (6), 1059–1069.
- (110) Rennen, H. J. J. ; Boerman, O. C.; Koenders, E. B.; Oyen, W. J. .; Corstens, F. H. . Labeling Proteins with

- Tc-99m via Hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the Conjugation Reaction. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27* (6), 599–604.
- (111) Greenland, W. E. P.; Howland, K.; Hardy, J.; Fogelman, I.; Blower, P. J. Solid-Phase Synthesis of Peptide Radiopharmaceuticals Using Fmoc-N-Epsilon-(hynic-Boc)-Lysine, a Technetium-Binding Amino Acid: Application to Tc-99m-Labeled Salmon Calcitonin. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (9), 1751–1757.
- (112) Bashir-Uddin Surfraz, M.; King, R.; Mather, S. J.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. Trifluoroacetyl as a Protecting Group for HYNIC: Stability in the Presence of Electrophiles and Application in the Synthesis of 99mTc-Radiolabelled Peptides. *Tetrahedron* **2010**, *66* (11), 2037–2043.
- (113) Bruus-Jensen, K.; Poethko, T.; Schottelius, M.; Hauser, A.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. Chemoselective Hydrazone Formation between HYNIC-Functionalized Peptides and 18F-Fluorinated Aldehydes. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33* (2), 173–183.
- (114) Gandomkar, T. M.; Najafi, R.; Shafiei, M.; Ebrahimi, S. E. S. Confirmation of Hydrazone Formation in HYNIC-Peptide Conjugate Preparation, and Its Hydrolysis during Labeling with. *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, *65*, 805–808.
- (115) Edwards, D. S.; Liu, S.; Harris, A. R.; Poirier, M. J.; Ewels, B. A. 99mTc-Labeling of Hydrazones of a Hydrazinonicotinamide Conjugated Cyclic Peptide. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (5), 803–807.
- (116) Surfraz, M. B.-U.; Biagini, S. C. G.; Blower, P. J. A Technetium Intermediate Specifically Promotes Deprotection of Trifluoroacetyl HYNIC during Radiolabelling under Mild Conditions. *Dalton Trans.* **2008**, *24* (22), 2920–2922.
- (117) Sarojini, V. Peptides: From Emil Fischer to Psa. *Chem. New Zeal.* **2013**, 79–86.
- (118) Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J.; Roberts, C.; Katsoyannis, P.; Gordon, S. The Synthesis of an Octapeptide Amide with the Hormonal Activity of Oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (18), 4879–4880.
- (119) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149.
- (120) Merrifield, R. B. The Synthesis of Biologically Active Peptides and Proteins. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1969**, *210* (7), 1247.
- (121) Sheppard, R. Introduction - a Retrospective Viewpoint. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press USA, 2000; pp 1–8.
- (122) Wieland, T.; Bodanszky, M. A New Technology: Solid Phase Peptide Synthesis. In *The World of Peptides*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991; pp 103–112.
- (123) Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; Do Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, *20* (1), 53–69.
- (124) Chan, W. C.; White, P. D. Basic Principles. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W., White, P., Eds.; Oxford University Press USA, 2000; pp 9–40.
- (125) Kamiński, Z. J. Orthogonal Protecting Groups for N(α)-Amino and C-Terminal Carboxyl Functions in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2000**, *55* (2), 123–139.
- (126) Bodanszky, M. Activation and Coupling. In *Principles of Peptide Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 9–61.
- (127) Apex 396 Automated Multiple Peptide Synthesizer <http://www.aapptec.com/apex-i-130.html> (accessed May 24, 2016).
- (128) Bodanszky, M. Side Reactions in Peptide Synthesis. In *Principles of Peptide Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 169–214.
- (129) Chan, W. C.; White, P. D. Basic Procedures. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press USA, 2000; pp 41–76.

- (130) Alberico, F.; Annis, I.; Royo, M.; Barany, G. Preparation and Handling of Peptides Containing Methionine and Cysteine. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press USA, 2000; pp 77–114.
- (131) Bodanszky, M. Reversible Blocking of Amino and Carboxyl Groups. In *Principles of Peptide Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 63–125.
- (132) Miguel, Y. de; Rohr, T.; Sherrington, D. C. Structure, Morphology, Physical Formats and Characterization of Polymer Supports. In *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2005; pp 1–52.
- (133) Gil, C.; Knepper, K.; Bräse, S. Organic Synthesis on Polymeric Supports. In *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2005; pp 137–199.
- (134) Merk. Novabiochem® Guide to selection of building blocks (EMD)
http://www.emdmillipore.com/US/en/product/Stunning-new-specifications-for-Fmoc-amino-acids,MM_NF-C153467#documentation (accessed May 29, 2016).
- (135) Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *Journal of Peptide Science*. January 2016, pp 4–27.
- (136) Wolff, T.; Tai, E.; Miller, T. Screening for Skin Cancer: An Update of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150* (3), 194–198.
- (137) Evans, M. S.; Madhunapantula, S. V.; Robertson, G. P.; Drabick, J. J. Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2013**, *779*, 223–255.
- (138) MacKie, R. M.; Hauschild, A.; Eggermont, A. M. M. Epidemiology of Invasive Cutaneous Melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20 Suppl 6* (suppl_6), vi1–vi7.
- (139) Duff, C. G.; Melsom, D.; Rigby, H. S.; Kenealy, J. M.; Townsend, P. L. A 6 Year Prospective Analysis of the Diagnosis of Malignant Melanoma in a Pigmented-Lesion Clinic: Even the Experts Miss Malignant Melanomas, but Not Often. *Br. J. Plast. Surg.* **2001**, *54* (4), 317–321.
- (140) Richard, M. A.; Grob, J. J.; Avril, M. F.; Delaunay, M.; Gouvernet, J.; Wolkenstein, P.; Souteyrand, P.; Dreno, B.; Bonerandi, J. J.; Dalac, S.; et al. Delays in Diagnosis and Melanoma Prognosis (I): The Role of Patients. *Int. J. Cancer* **2000**, *89* (3), 271–279.
- (141) Skvara, H.; Teban, L.; Fiebiger, M.; Binder, M.; Kittler, H. Limitations of Dermoscopy in the Recognition of Melanoma. *Arch. Dermatol.* **2005**, *141* (2), 155–160.
- (142) Melanoma, C. © Scottish Intercollegiate Guidelines Network, March 2004. **2004**, No. January, 5–6.
- (143) Kang, Y.; Choi, J. A.; Chung, J. H.; Hong, S. H.; Kang, H. S. Accuracy of Preoperative MRI with Microscopy Coil in Evaluation of Primary Tumor Thickness of Malignant Melanoma of the Skin with Histopathologic Correlation. *Korean J. Radiol.* **2013**, *14* (2), 287–293.
- (144) Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Strauss, L. G.; Burger, C. Quantitative PET Studies in Pretreated Melanoma Patients: A Comparison of 6-[¹⁸F]fluoro-L-Dopa with ¹⁸F-FDG and (¹⁵O)-Water Using Compartment and Noncompartment Analysis. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (2), 248–256.
- (145) Hofmann, U.; Szedlak, M.; Rittgen, W.; Jung, E. G.; Schadendorf, D. Primary Staging and Follow-up in Melanoma Patients--Monocenter Evaluation of Methods, Costs and Patient Survival. *Br. J. Cancer* **2002**, *87* (2), 151–157.
- (146) Quinn, T.; Zhang, X.; Miao, Y. Targeted Melanoma Imaging and Therapy with Radiolabeled Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide Analogues. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* **2010**, *145* (2), 245–258.
- (147) Som, P.; Atkins, H. L.; Bandoypadhyay, D.; Fowler, J. S.; Macgregor, R. R.; Matsui, K.; Oster, Z. H.; Sacker, D. F.; Shiue, C. Y.; Turner, H.; et al. A Fluorinated Glucose Analog, 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (

- F-18): Nontoxic Tracer for Rapid Tumor Detection of Acute or Chronic. *J. Nucl. Med.* **1980**, *21*, 670–675.
- (148) Lamki, L. M.; Zukiwski, A. A.; Shanken, L. J.; Legha, S. S.; Benjamin, R. S.; Plager, C. E.; Salk, D. F.; Schroff, R. W.; Murray, J. L. Radioimaging of Melanoma using ^{99m}Tc-Labeled Fab Fragment Reactive with a High Molecular Weight Melanoma Antigen. *Cancer Res.* **1990**, *50* (3 SUPPL.), 904–908.
- (149) Eary, J. F.; Schroff, R. W.; Abrams, P. G.; Fritzberg, A. R.; Morgan, A. C.; Kasina, S.; Reno, J. M.; Srinivasan, A.; Woodhouse, C. S.; Wilbur, D. S. Successful Imaging of Malignant Melanoma with Technetium-99m-Labeled Monoclonal Antibodies. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30* (1), 25–32.
- (150) Matzku, S.; Kirchgessner, H.; Schmid, U.; Temponi, M.; Ferrone, S. Melanoma Targeting with a Cocktail of Monoclonal Antibodies to Distinct Determinants of the Human HMW-MAA. *J. Nucl. Med.* **1989**, *30* (3), 390–397.
- (151) Maffioli, L.; Mascheroni, L.; Mongioj, V.; Gasparini, M.; Baldini, M. T.; Seregini, E.; Castellani, M. R.; Cascinelli, N.; Buraggi, G. L. Scintigraphic Detection of Melanoma Metastases with a Radiolabeled Benzamide ([iodine-123]-(S)-IBZM). *J. Nucl. Med.* **1994**, *35* (11), 1741–1747.
- (152) Feng, H.; Xia, X.; Li, C.; Song, Y.; Qin, C.; Liu, Q.; Zhang, Y.; Lan, X. Imaging Malignant Melanoma with ¹⁸F-5-FPN. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43* (1), 113–122.
- (153) Jurisson, S.; Berning, D.; Jia, W.; Ma, D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (3), 1137–1156.
- (154) Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (11), 1735–1738.
- (155) Bangard, M.; Béhé, M.; Guhlke, S.; Bender, H.; Otte, R.; Biersack, H. J.; Maecke, H. R. Detection of Somatostatin Receptor-Positive Tumours Using the New ^{99m}Tc-Tricine-HYNIC- D -Phe 1 -Tyr 3 -Octreotide: First Results in Patients and Comparison with ¹¹¹In-DTPA- D -Phe 1 -Octreotide. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2000**, *27* (6), 628–637.
- (156) Decristoforo, C.; Mather, S. J. Technetium-99m Somatostatin Analogues: Effect of Labelling Methods and Peptide Sequence. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **1999**, *26* (8), 869–876.
- (157) Smith, C. J.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. Radiolabeled Peptide Conjugates for Targeting of the Bombesin Receptor Superfamily Subtypes. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32* (7), 733–740.
- (158) De Jong, M.; Valkema, R.; Jamar, F.; Kvols, L. K.; Kwekkeboom, D. J.; Breeman, W. A. P.; Bakker, W. H.; Smith, C.; Pauwels, S.; Krenning, E. P. Somatostatin Receptor-Targeted Radionuclide Therapy of Tumors: Preclinical and Clinical Findings. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32* (2), 133–140.
- (159) Kwekkeboom, D. J.; Kam, B. L.; Van Essen, M.; Teunissen, J. J. M.; Van Eijck, C. H. J.; Valkema, R.; De Jong, M.; De Herder, W. W.; Krenning, E. P. Somatostatin Receptor-Based Imaging and Therapy of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17* (1), R53–R73.
- (160) Breeman, W. A.; De Jong, M.; Kwekkeboom, D. J.; Valkema, R.; Bakker, W. H.; Kooij, P. P.; Visser, T. J.; Krenning, E. P. Somatostatin Receptor-Mediated Imaging and Therapy: Basic Science, Current Knowledge, Limitations and Future Perspectives. *European Journal of Nuclear Medicine*. September 2001, pp 1421–1429.
- (161) Miao, Y.; Quinn, T. P. Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide-Targeted Melanoma Imaging. *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 4514–4524.
- (162) Bruus-Jensen, K.; Poethko, T.; Schottelius, M.; Hauser, A.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. Chemoselective Hydrazone Formation between HYNIC-Functionalized Peptides and (¹⁸F)-Fluorinated Aldehydes. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33* (2), 173–183.
- (163) Guo, H.; Gallazzi, F.; Miao, Y. Design and Evaluation of New ^{99m}Tc-Labeled Lactam Bridge-Cyclized Alpha-MSH Peptides for Melanoma Imaging. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (4), 1400–1408.

- (164) Guo, H.; Miao, Y. Introduction of an 8-Aminooctanoic Acid Linker Enhances Uptake of ^{99m}Tc-Labeled Lactam Bridge-Cyclized α -MSH Peptide in Melanoma. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (12), 2057–2063.
- (165) Sawyer, T. K.; Sanfilippo, P. J.; Hruby, V. J.; Engel, M. H.; Heward, C. B.; Burnett, J. B.; Hadley, M. E. 4-Norleucine, 7-D-Phenylalanine- α -Melanocyte-Stimulating Hormone: A Highly Potent α -Melanotropin with Ultralong Biological Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77* (10), 5754–5758.
- (166) Cody, W.; Mahoney, M.; Knittel, J. Cyclic Melanotropins. 9. 7-D-Phenylalanine Analogues of the Active-Site Sequence. *J. Med. ...* **1985**, *28* (38), 583–588.
- (167) Al-Obeidi, F.; Castrucci, a M.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J. Potent and Prolonged Acting Cyclic Lactam Analogues of α -Melanotropin: Design Based on Molecular Dynamics. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (12), 2555–2561.
- (168) Giblin, M. F.; Wang, N.; Hoffman, T. J.; Jurisson, S. S.; Quinn, T. P. Design and Characterization of α -Melanotropin Peptide Analogs Cyclized through Rhenium and Technetium Metal Coordination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (22), 12814–12818.
- (169) Chen, J.; Cheng, Z.; Owen, N. K.; Hoffman, T. J.; Miao, Y.; Jurisson, S. S.; Quinn, T. P. Evaluation of an ¹¹¹In-DOTA-Rhenium Cyclized α -MSH Analog: A Novel Cyclic-Peptide Analog with Improved Tumor-Targeting Properties. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (12), 1847–1855.
- (170) Guo, H.; Yang, J.; Gallazzi, F.; Miao, Y. Reduction of the Ring Size of Radiolabeled Lactam Bridge-Cyclized α -MSH Peptide, Resulting in Enhanced Melanoma Uptake. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51* (3), 418–426.
- (171) Chen, J. Q.; Cheng, Z.; Hoffman, T. J.; Jurisson, S. S.; Quinn, T. P. Melanoma-Targeting Properties of ^{99m}technetium-Labeled Cyclic α -Melanocyte-Stimulating Hormone Peptide Analogues. *Cancer Res.* **2000**, *60* (20), 5649–5658.
- (172) Miao, Y.; Benwell, K.; Quinn, T. P. ^{99m}Tc- and ¹¹¹In-Labeled α -Melanocyte-Stimulating Hormone Peptides as Imaging Probes for Primary and Pulmonary Metastatic Melanoma Detection. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (1), 73–80.
- (173) Chen, J.; Cheng, Z.; Miao, Y.; Jurisson, S. S.; Quinn, T. P. α -Melanocyte-Stimulating Hormone Peptide Analogs Labeled with Technetium-99m and Indium-111 for Malignant Melanoma Targeting. *Cancer* **2002**, *94* (S4), 1196–1201.
- (174) Zhang, X.; Teixeira, V.; Porcal, W.; Cabral, P.; Gambini, J. P.; Fernandez, M.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P. [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ and [^{99m}TcO₂]⁺ Radiolabeled Cyclic Melanotropin Peptides for Melanoma SPECT Imaging. *Curr Radiopharm* **2014**, *7* (1), 63–74.
- (175) Cheng, Z.; Chen, J.; Miao, Y.; Owen, N. K.; Quinn, T. P.; Jurisson, S. S. Modification of the Structure of a Metallopeptide: Synthesis and Biological Evaluation of ¹¹¹In-Labeled DOTA-Conjugated Rhenium-Cyclized α -MSH Analogues. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (14), 3048–3056.
- (176) Miao, Y.; Gallazzi, F.; Guo, H.; Quinn, T. P. ¹¹¹In-Labeled Lactam Bridge-Cyclized α -Melanocyte Stimulating Hormone Peptide Analogues for Melanoma Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (2), 539–547.
- (177) Guo, H.; Miao, Y. Cu-64-Labeled Lactam Bridge-Cyclized α -MSH Peptides for PET Imaging of Melanoma. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (8), 2322–2330.
- (178) Wei, L.; Zhang, X.; Gallazzi, F.; Miao, Y.; Jin, X.; Brechbiel, M. W.; Xu, H.; Clifford, T.; Welch, M. J.; Lewis, J. S.; et al. Melanoma Imaging Using (¹¹¹In)-, (⁸⁶Y)- and (⁶⁸Ga)-Labeled CHX-A''-Re(Arg11)CCMSH. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36* (4), 345–354.
- (179) Wei, L.; Butcher, C.; Miao, Y.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Lewis, J. S. Synthesis and Biologic Evaluation of ⁶⁴Cu-Labeled Rhenium-Cyclized α -MSH Peptide Analog Using a Cross-Bridged Cyclam Chelator. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (1), 64–72.
- (180) McQuade, P.; Miao, Y.; Yoo, J.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Lewis, J. S. Imaging of Melanoma Using ⁶⁴Cu- and ⁸⁶Y-DOTA- ReCCMSH(Arg11), a Cyclized Peptide Analogue of α -MSH. *J. Med. Chem.*

- 2005, 48 (8), 2985–2992.
- (181) Wei, L.; Miao, Y.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Vavere, A. L.; Lewis, J. S. Gallium-68-Labeled DOTA-Rhenium-Cyclized α -Melanocyte-Stimulating Hormone Analog for Imaging of Malignant Melanoma. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 34 (8), 945–953.
- (182) Cantorias, M. V.; Figueroa, S. D.; Quinn, T. P.; Lever, J. R.; Hoffman, T. J.; Watkinson, L. D.; Carmack, T. L.; Cutler, C. S. Development of High-Specific-Activity ^{68}Ga -Labeled DOTA-Rhenium-Cyclized α -MSH Peptide Analog to Target MC1 Receptors Overexpressed by Melanoma Tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36 (5), 505–513.
- (183) Raposinho, P. D.; Xavier, C.; Correia, J. D. G.; Falcão, S.; Gomes, P.; Santos, I. Melanoma Targeting with Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Analogs Labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$: Effect of Cyclization on Tumor-Seeking Properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13 (3), 449–459.
- (184) Garcia, M. F.; Zhang, X.; Gallazzi, F.; Fernandez, M.; Moreno, M.; Gambini, J. P.; Porcal, W.; Cabral, P.; Quinn, T. P. Evaluation of Tricine and EDDA as Co-Ligands for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled HYNIC-MSH Analogs for Melanoma Imaging. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2014**, 15 (1), 122–130.
- (185) Morais, M.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G.; Oliveira, M. C.; Jiménez, M. A.; Santos, I.; Raposinho, P. D. Influence of the Bifunctional Chelator on the Pharmacokinetic Properties of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Labeled Cyclic α -Melanocyte Stimulating Hormone Analog. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (5), 1961–1973.
- (186) Shamshirian, D.; Erfani, M.; Beiki, D.; Fallahi, B.; Shafiei, M. Development of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Lactam Bridge-Cyclized Alpha-MSH Derivative Peptide as a Possible Single Photon Imaging Agent for Melanoma Tumors. *Ann. Nucl. Med.* **2015**.
- (187) Valldosera, M.; Monsò, M.; Xavier, C.; Raposinho, P.; Correia, J. D. G.; Santos, I.; Gomes, P. Comparative Study of Chemical Approaches to the Solid-Phase Synthesis of a Tumor-Seeking α -MSH Analogue. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, 14 (3), 273–281.
- (188) Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Forrer, F.; Cescato, R.; Reubi, J. C.; Akyel, K. G.; Maecke, H. R. Tetraamine-Derived Bifunctional Chelators for Technetium-99m Labelling: Synthesis, Bioconjugation and Evaluation as Targeted SPECT Imaging Probes for GRP-Receptor-Positive Tumours. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, 16 (7), 2115–2124.
- (189) Nock, B.; Nikolopoulou, A.; Chiotellis, E.; Loudos, G.; Maintas, D.; Reubi, J. C.; Maina, T. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Demobesin 1, a Novel Potent Bombesin Analogue for GRP Receptor-Targeted Tumour Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, 30 (2), 247–258.
- (190) Frenzel, T.; Solodenko, W.; Kirschning, A. Solid-Phase Bound Catalysts: Properties and Applications. In *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2005; pp 201–240.
- (191) Erdélyi, M. Solid-Phase Methods for the Microwave-Assisted Synthesis of Heterocycles. *Top Heterocycl Chem* **2006**, 1 (February), 79–128.
- (192) *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*; Buchmeiser, M. R., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2003.
- (193) Večeřa, M.; Gasparič, J. Carbonyl Compounds. In *Detection and Identification of Organic Compounds*; Springer US: Boston, MA, 1971; pp 208–246.
- (194) Garcia, M. F. Síntesis de ligandos heterocíclicos como agentes bifuncionales para la marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de péptidos para imagen molecular de la expresión del receptor de alfa-MSH <http://riqim.fq.edu.uy/items/show/557>. (accessed May 30, 2016).
- (195) Bodanszky, M.; Bodanszky, A. Introduction of Amine Protecting Groups. In *The Practice of Peptide Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1994; pp 9–27.
- (196) Agami, C.; Couty, F. The Reactivity of the N-Boc Protecting Group: An Underrated Feature. *Tetrahedron*

2002, 58 (14), 2701–2724.

- (197) Maeorg, U. I.; Troc, H. H.; Troc, H.; Boc, B. H.; -n, N.; -n, N. H.; Boc, Z. Synthesis, Application and Scope of a New Protected Hydrazine Reagent. *Pergamon Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 681–684.
- (198) Raju, M.; Mäeorg, S.; Tšubrik, O.; Mäeorg, U. Efficient Solventless Technique for Boc-Protection of Hydrazines and Amines. *Arkivoc* **2009**, 2009 (6), 291.
- (199) Abramovitch, R. A.; Abramovitch, D. A.; Iyanar, K.; Tamareselvy, K. Application of Microwave Energy to Organic Synthesis: Improved Technology. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (39), 5251–5254.
- (200) Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. Microwave Assisted Organic Synthesis—a Review. *Tetrahedron* **2001**, 57 (45), 9225–9283.
- (201) Leadbeater, N. E. *Microwave-Assisted Synthesis: General Concepts*; Springer Berlin Heidelberg, 2014; pp 1–44.
- (202) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (1), 301–312.
- (203) Warner, J. C.; Cannon, A. S.; Dye, K. M. Green Chemistry. *Environ. Impact Assess. Rev.* **2004**, 24 (7-8), 775–799.
- (204) Gawande, M. B.; Bonifácio, V. D. B.; Luque, R.; Branco, P. S.; Varma, R. S. Benign by Design: Catalyst-Free in-Water, on-Water Green Chemical Methodologies in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (12), 5522–5551.
- (205) Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K.; Curzons, A.; Constable, C. C.; Cunningham, V. L.; Gani, R.; Jiménez-Gonzalez, C.; Kate, A.; Crafts, P. A.; et al. What Is a Green Solvent? A Comprehensive Framework for the Environmental Assessment of Solvents. *Green Chem.* **2007**, 9 (9), 927.
- (206) Vilaivan, T. A Rate Enhancement of Tert-Butoxycarbonylation of Aromatic Amines with Boc₂O in Alcoholic Solvents. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (38), 6739–6742.
- (207) Chankeshwara, S. V.; Chakraborti, A. K. Catalyst-Free Chemoselective N-Tert-Butyloxycarbonylation of Amines in Water. *Org. Lett.* **2006**, 8 (15), 3259–3262.
- (208) Dalko, P. I.; Moisan, L. Enantioselective Organocatalysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, 40 (20), 3726–3748.
- (209) Pellissier, H. Asymmetric Organocatalysis. *Tetrahedron* **2007**, 63 (38), 9267–9331.
- (210) Gaunt, M. J.; Johansson, C. C. C.; McNally, A.; Vo, N. T. Enantioselective Organocatalysis. *Drug Discov. Today* **2007**, 12 (1-2), 8–27.
- (211) Tsakos, M.; Kokotos, C. G. Primary and Secondary Amine-(thio)ureas and Squaramides and Their Applications in Asymmetric Organocatalysis. *Tetrahedron* **2013**, 69 (48), 10199–10222.
- (212) Etter, M. C. Encoding and Decoding Hydrogen-Bond Patterns of Organic Compounds. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23 (4), 120–126.
- (213) Curran, D. P.; Kuo, L. H. Acceleration of a Dipolar Claisen Rearrangement by Hydrogen Bonding to a Soluble Diaryl Urea. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (37), 6647–6650.
- (214) Jahani, F.; Tajbakhsh, M.; Golchoubian, H.; Khaksar, S. Guanidine Hydrochloride as an Organocatalyst for N-Boc Protection of Amino Groups. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (12), 1260–1264.
- (215) Singh, A. K.; Rai, A.; Yadav, L. D. S. LiBr Catalyzed Solvent-Free Ring Expansion of Epoxides to 1,4-Oxathian-2-Ones with α -Mercaptocarboxylic Acids. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (28), 3614–3617.
- (216) Mojtahedi, M. M.; Akbarzadeh, E.; Sharifi, R.; Abaee, M. S. Lithium Bromide as a Flexible, Mild, and Recyclable Reagent for Solvent-Free Cannizzaro, Tishchenko, and Meerwein-Ponndorf-Verley Reactions. *Org. Lett.* **2007**, 9 (15), 2791–2793.

- (217) Yoo, D.; Oh, J. S.; Lee, D.-W.; Kim, Y. G. Efficient Synthesis of a Configurationally Stable L-Serinal Derivative. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (7), 2979–2982.
- (218) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254.
- (219) American Type Culture Collection (ATCC). B16-F1 (ATCC® CRL-6323™) <http://www.atcc.org/products/all/CRL-6323.aspx> (accessed Jun 10, 2016).
- (220) American Type Culture Collection (ATCC). B16-F10 (ATCC® CRL-6475™) <http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx> (accessed Jun 10, 2016).
- (221) Steiner, R. E. *Diagnostic Nuclear Medicine*; Baert, A. L., Sartor, K., Schiepers, C., Eds.; Medical Radiology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1976; Vol. 2.
- (222) Volkert, W. A.; Troutner, D. E.; Holmes, R. A. Labeling of Amine Ligands with ^{99m}Tc in Aqueous Solutions by Ligand Exchange. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1982**, *33* (10), 891–896.
- (223) Wong, W.; Minchin, R. F. Binding and Internalization of the Melanocyte Stimulating Hormone Receptor Ligand [Nle⁴, D-Phe⁷] Alpha-MSH in B16 Melanoma Cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28* (11), 1223–1232.
- (224) Schweinsberg, C.; Maes, V.; Brans, L.; Bläuenstein, P.; Tourwé, D. A.; Schubiger, P. A.; Schibli, R.; Garayoa, E. G. Novel Glycated [^{99m}Tc(CO)₃]-Labeled Bombesin Analogues for Improved Targeting of Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Positive Tumors. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2432–2439.
- (225) Eberle, A.; Kriwaczek, V. M.; Schwyzer, R. Hormone–Receptor Interactions: Melanotropic Activities of the Covalent Serum Albumin Complexes with Alpha-Melanotropin, Alpha-Melanotropin Fragments, and Enkephalin. *FEBS Lett.* **1977**, *80* (2), 246–250.
- (226) Alander, J. T.; Kaartinen, I.; Laakso, A.; Pättilä, T.; Spillmann, T.; Tuchin, V. V.; Venermo, M.; Välisuo, P. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *Int. J. Biomed. Imaging* **2012**, *2012*.
- (227) FDA. Indocyanine green <https://www.drugs.com/pro/indocyanine-green.html> (accessed Jun 20, 2016).