

**RADIOFARMACOS TERAPEUTICOS BASADOS EN ^{177}Lu
DE PEPTIDOS ANALOGOS DE COLECISTOKININA/
GASTRINA DE USO POTENCIAL EN TERAPIA
RADIONUCLEIDICA DE RECEPTORES PEPTIDICOS**

**CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA
Y APLICACIONES NUCLEARES**

Alumno: Ana Clarisa López Bularte
Director: Dr. José Luis Crudo
Co-director: Mg. Noemí Nevaes
Agosto del 2014



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

A mis padres.

Índice

Resumen	3
Capítulo 1	
1.1 Objetivo	4
1.2 Introducción	4
1.3 Aspectos teóricos generales	
1.3.1 Radionucleídos y Radiofármacos.....	4
1.3.2 Generalidades de los BFCA.....	6
1.3.3 Radiofármacos basados en péptidos.....	7
1.3.4 Ventajas y limitaciones de los péptidos radiomarcados.....	8
1.4 La familia de péptidos Colecistoquinina/ Gastrina y sus receptores	
1.4.1 Características de los péptidos Colecistoquinina/ Gastrina.....	10
1.4.2 Características de los receptores de Colecistoquinina (CCKR).....	11
1.4.3 Propiedades de unión y ligandos de la familia CCK/Gastrina.....	12
1.4.4 Expresión de los receptores CCK1R y CCK2R en tumores humanos.	13
Capítulo 2	
2.1 Radiofármacos basados en análogos de CCK/Gastrina	
2.1.1 Estado actual del desarrollo de radiofármacos para diagnóstico y terapia de análogos de CCK/Gastrina.....	14
2.1.2 Ensayos de unión e internalización realizados con radiofármacos basados en análogos de CCK/ Gastrina.....	18
Capítulo 3	
3.1 Materiales y Métodos	
3.1.1 Obtención de Lutecio-177 de elevada actividad específica.....	21
3.1.2 Marcación de DOTA-cyclo-(Met)MG1 y DOTA-cyclo-(Nle)MG2 con ¹⁷⁷ LuCl ₃	21
3.1.3 Determinación de la Pureza Radioquímica (PR).....	22
3.1.4 Ensayo de internalización	22
3.2 Resultados	
3.2.1 Obtención de Lutecio-177 de elevada actividad específica.....	23
3.2.2 Control de Pureza Radioquímica.....	23
3.2.3 Ensayo de internalización	23



Capítulo 4

4.1	Discusión	24
4.2	Conclusiones	27
4.3	Agradecimientos	27
4.4	Anexos:	
4.4.1	Gráficos, figuras y tablas.....	29
4.5	Referencias Bibliográficas	40



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Resumen

La radiomarcación de péptidos ha surgido como una herramienta de gran interés para el diagnóstico y tratamiento de tumores. Los radiopéptidos análogos de Colecistoquinina/Gastrina están siendo evaluados por su posible aplicación a la Terapia Radionucleídica de Receptores Peptídicos (PRRT) para el tratamiento de tumores que sobreexpresen el receptor CCK2R.

Se evaluaron comparativamente, por primera vez a nivel internacional, 2 análogos cíclicos de Minigastrina, que se diferencian en la sustitución del aminoácido metionina por norleucina, el DOTA-cyclo-(Met)MG1 y DOTA-cyclo-(Nle)MG2, ambos radiomarcados con Lutecio-177 de producción local. Las purzas radioquímicas fueron 93,8% para ^{177}Lu -DOTA-cyclo-MG1 y 99,1% para ^{177}Lu -DOTA-MG2. El ensayo de internalización realizado en la línea celular A431(CCK2R+) evidenció la internalización de ambos análogos, 17,3% (^{177}Lu -DOTA-cyclo-MG1) y 19,3% (^{177}Lu -DOTA-MG2).

La implementación de este ensayo constituye un aporte considerable en el desarrollo de radiofármacos de CCK/Gastrina basados en ^{177}Lu para PRRT.

Finalmente, el análisis dosimétrico y la evaluación de la eficacia terapéutica en un modelo animal apropiado determinarán la aplicación potencial de estos radiopeptidos a la PRRT.



Capítulo 1

1.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados de internalización comparativos entre dos análogos cíclicos de minigastrina (cyclo-MG1 y cyclo-MG2) radiomarcados con ^{177}Lu realizados en la División Radiofarmacia Básica y Aplicada y mostrar desde los inicios hasta la actualidad el desarrollo de radiofármacos terapéuticos basados en ^{177}Lu de análogos peptídicos pertenecientes a la familia de Colecistoquinina/Gastrina (CCK/Gastrina) y su posible aplicación a la Terapia Radionucleídica de Receptores Peptídicos (PRRT).

1.2 Introducción

Hace ya muchos años se ha encontrado que algunos tipos de cánceres en humanos sobreexpresan ciertos receptores peptídicos de membrana que pueden ser elegibles como posibles blancos moleculares. Las biomoléculas que reconocen específicamente y con alta afinidad a estos receptores son péptidos regulatorios (1) que suelen cumplir funciones fisiológicas normales en las células.

La radiomarcación de péptidos ha emergido en las últimas dos décadas como una valiosa herramienta biológica en el campo de la Medicina Nuclear para el diagnóstico por imágenes y terapia de tumores humanos (2, 3).

1.3 Aspectos teóricos generales

1.3.1 Radionucleídos y Radiofármacos

Los radionucleídos (RN) o radioisótopos son elementos con un núcleo inestable. Se caracterizan por tener un exceso de energía disponible que puede ser impartida a una partícula, ya sea creada dentro del núcleo o a través de la conversión interna.

Durante este proceso, se dice que el radionucleído se desintegra radiactivamente, lo que resulta en la emisión de rayos gamma (γ) y/o partículas subatómicas, tales como las partículas alfa (α) o beta (β) (4).

En Medicina Nuclear, los radioisótopos pueden ser usados con dos propósitos diferentes: para diagnóstico y para terapia. En el primer grupo se pueden incluir los radionucleídos emisores gamma y de positrones (β^+), mientras que para terapia son investigados los emisores de partículas beta negativas (β^-) y alfas.

Los fotones γ son utilizados para diagnóstico por imagen en cámara gamma, SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), D-SPECT y los híbridos SPECT-CT (SPECT y Tomografía Computada) y SPECT-RMN (SPECT y Resonancia Magnética



Nuclear). El Tecnecio-99m y el Indio-111 son dos ejemplos de radionucleidos emisores gamma para uso diagnóstico.

Los radionucleidos que decaen emitiendo positrones, cuya aniquilación con electrones (e^-) del medio genera dos fotones gamma de 511 Kev en direcciones opuestas, son capaces de proveer una imagen de muy alta calidad en equipos PET (Positron Emission Tomography) o los híbridos PET/CT. En estos equipos, la imagen se debe a los fotones producto de la aniquilación. Ejemplos de esta clase de RN son el Fluor-18 comúnmente unido a una molécula de glucosa ($^{18}\text{F-DG}$) y el Galio-68, un radiometal trivalente.

Las partículas β^- son electrones emitidos desde el núcleo con un alcance entre 0,05 y 12 mm en tejido blando, dependiendo de la energía (rango de energía de 50-2300 keV) (Figura 1). Son capaces de generar daño a la célula por ruptura de simple cadena de la doble hebra de ADN (SSB) (Figura 2). Se han evidenciado otros factores adicionales que tienen un efecto sinérgico sobre la muerte celular como la generación de radicales libres del tipo peróxidos, a causa del efecto de las radiaciones ionizantes en presencia de O_2 y medio acuoso, produciendo un “daño indirecto” sobre el ADN y que además bloquean los efectos reversibles o reparables de la lesión. Otro de los factores es el efecto “*cross-fire*”, donde el radionucleido emisor es capaz de irradiar a las células vecinas de la célula que lo contiene. Debido a estas características, el mecanismo de acción de estas partículas es dependiente de la concentración de oxígeno en las células, las cuales en condiciones de hipoxia llegan a ser hasta 3 veces más radioresistentes, pero en contraste, son capaces de generar el daño deseado en zonas tumorales donde no es accesible el radiofármaco (5). El campo de aplicación de los emisores β^- abarca una gran variedad de radiofármacos para terapia, como PRRT (Peptide Receptor radionuclide Therapy) o RIT (Radioimmunoterapia). El Iodo-131, el Ytrio-90, un emisor beta puro, y el Lutecio-177 son ejemplos de estos RN terapéuticos.

Las partículas α tiene la masa y carga del núcleo de Helio, 2 protones y 2 neutrones, un rango de energía entre 5-9 MeV y un alcance entre 5-10 diámetros celulares (Figura 3). Son capaces de generar un daño irreparable en las células por ruptura de ambas cadenas del ADN (DSB) (Figura 2). Existe un efecto adicional llamado “*bystander*”, el cual está siendo estudiado en la actualidad y que contribuiría a los fines terapéuticos de los radionucleidos emisores de estas partículas. Surge a través de las observaciones experimentales, donde las células vecinas no irradiadas también sufrían una respuesta biológica induciendo apoptosis en ellas (5). Este efecto también es observado para los emisores β^- .

El potencial terapéutico de un RN está determinado principalmente por: la fracción de energía emitida como partícula cargada que puede generar un daño a las células, el rango de alcance de las partículas en función de la distribución subcelular del RN y la vida media biológica de éste en función de las propiedades farmacocinéticas en los tejidos.

Según la Farmacopea Argentina, un radiofármaco es todo producto farmacéutico que, una vez terminado y listo para ser empleado, contiene uno o más nucleidos radiactivos (radioisótopos) incluidos con un propósito médico (6).

Usualmente no tienen efecto farmacológico ya que son utilizados en cantidades trazas. De acuerdo con el criterio de diseño, los radiofármacos pueden ser divididos en tres generaciones. En la primera de ellas, simplemente se radiomarcaban compuestos químicos que pudieran ser dirigidos a un órgano determinado sin un receptor específico, o se administraban radiopartículas que fueran captadas explotando procesos fisiológicos normales en el cuerpo. Por ejemplo, la fagocitosis fue la base para preparar coloides



como el $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$ y el bloqueo capilar para desarrollar ^{99m}Tc -macroagregados de albúmina, dando origen a la gammagrafía hepática y pulmonar respectivamente. Dado que el ^{99m}Tc se obtiene del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ en cantidades de nanogramos, estos agentes no fueron caracterizados por métodos químicos analíticos convencionales debido a las bajas concentraciones (escala micromolar).

La segunda generación de radiofármacos emergió en la década de los 80's como resultado del desarrollo de compuestos que tenían un radiometal unido con ligantes y con una geometría bien definida, como los complejos $\text{Tc(V)}\text{-oxo}$. Su biodistribución se establecía por sus características fisicoquímicas como tales como carga total, peso molecular, forma y lipofilia. De este trabajo surgió el concepto de agentes quelantes bifuncionales (BFCA por sus siglas en inglés), que son ligantes que no sólo complejan al radiometal, sino que también pueden unirse por otro extremo de la molécula a receptores biológicos, por ejemplo los derivados del ácido iminodiacético (7, 8). El concepto fue expandido en los años 90 para incluir el acoplamiento de radiometales con fragmentos bioactivos usando BFCA y se iniciaron así los estudios en el diseño de radiofármacos de tercera generación.

Los radiofármacos de tercera generación se utilizan en medicina nuclear para obtener imágenes o para terapia de algunas enfermedades basándose en blancos moleculares específicos, y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados tales como receptores y enzimas. El agente bifuncional se encuentra ubicado entre el radionucleído y la molécula blanco, este coordina firmemente al ión metálico y está covalentemente unido con la molécula específica del receptor de forma directa o con una molécula de unión. El fragmento bioactivo sirve como un transportador que lleva al radionúclido al sitio receptor en las células o moléculas blanco (9). Las moléculas bioactivas específicas de los receptores pueden ser fracciones de anticuerpos, péptidos, péptido miméticos, análogos de ADN, oligonucleótidos antisentido (antisense) y ligantes no peptídicos. Los agentes de este tipo representan un cambio sustancial en los paradigmas del desarrollo farmacéutico por el empleo de las capacidades propias del organismo como vectores de radionucleídos, en lugar de considerar al organismo como un simple tubo de ensayo donde interactúan moléculas extrañas.

1.3.2 Generalidades de los BFCA

Un BFCA es una molécula capaz de unirse covalentemente a una biomolécula y complejarse a un metal al mismo tiempo. Las condiciones generales que deben cumplir son las siguientes: rápida y eficiente marcación con elevada actividad específica, alta estabilidad de la unión RN-BFCA-biomolécula bajo condiciones fisiológicas, preservación de la actividad biológica después de la conjugación y la marcación, adecuada biodistribución preferentemente con excreción renal (BFCA hidrofílicos) y baja unión a proteínas del suero humano (rápida depuración sanguínea).

La unión del complejo BFCA-metal es crítica y su inestabilidad está asociada a la toxicidad en terapia y mala calidad de imagen en diagnóstico. Los criterios de la química de coordinación son fundamentales para el diseño de un BFCA. También se debe considerar la velocidad de formación del complejo (K_{A-B}) y la velocidad de disociación (K_c). Debido a las diversas propiedades en la química de coordinación, no existe un solo BFCA apropiado para todos los radionucleídos (10).



Existen diversos ensayos para evaluar la complejación a un BFCA: a) constante de estabilidad termodinámica, b) los ensayos de transquelación, c) la constante de disociación catalizada por ácido y d) estudios de estabilidad en suero. Ninguno de estos ensayos predice la estabilidad *in vivo* real del complejo. Para ello es necesario realizar una evaluación *in vivo* en un modelo animal apropiado (10).

Históricamente uno de los primeros reportes de un BFCA conjugado a un anticuerpo fue el desferroxamine, un producto natural quelante del Fe(III), y fue utilizado para marcar con ^{111}In (III) (11). Sin embargo, el desarrollo de los BFCAs fue a partir de las derivaciones de agentes quelantes inorgánicos con ligandos poliaminocarboxílicos. Mientras que los derivados del EDTA (ácido etilenediamino tetra-ácetico) fueron inicialmente usados para marcar con ^{111}In e ^{90}Y , la inestabilidad de los complejos forzó a desarrollar los derivados del DTPA (ácido dietilenetriamino penta-ácetico), con un número de coordinación más apropiado (Figura 4) (12, 13). Sin embargo ninguno de los derivados logró formar complejos lo suficientemente estables con ^{90}Y ; fue entonces que se probó como agente quelante el macrociclo DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazacilcododecano- N,N,N',N'',N''' –tetra-ácetico) (Figura 5).

En los inicios había que sintetizar el agente quelante, esterificarlo y luego marcarlo por alguno de los dos métodos indirectos convencionales (marcación post-conjugación y método del quelante premarcado).

Actualmente se comercializan distintos agentes quelantes libres, como BFCAs o unidos a biomoléculas de bajo peso molecular, como péptidos regulatorios. La introducción en el mercado de biomoléculas que contienen el BFCA ofrece ventajas importantes a la hora de evaluar el radiofármaco final, principalmente debido a las diferencias del comportamiento *in vivo* de los conjugados enantioméricos (10).

1.3.3 Radiofármacos basados en péptidos

Radiofármacos (RF) para uso diagnóstico:

Estos RF son usados con el propósito de obtener imágenes en equipos SPECT o cámara gamma, si son marcados con radionucleidos emisores gamma como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{111}In , o en equipos de PET, si fueron marcados con radionucleidos emisores de positrones como ^{18}F , ^{68}Ga o ^{64}Cu .

Los primeros desarrollos para uso diagnóstico fueron basados en péptidos análogos de somatostatina. En los albores, el péptido sintético octreotide fue modificado (sustitución de Phe por Tyr en la posición 3) e iodinado: ^{123}I -Tyr³-octreotide (2, 14, 15). Sin embargo este radiofármaco tenía varias desventajas: a) el ^{123}I , producto de ciclotron, no se encuentra fácilmente disponible para todo el mundo con la alta calidad requerida; b) los pasos de marcación y purificación consumen mucho tiempo y hace que su aplicación en rutina sea inapropiado; c) debido al corto período de semidesintegración del radionucleido es difícil obtener imágenes centellográficas a las 24 hs. post administración; d) posee un tiempo de residencia efectivo relativamente bajo lo cual limita la dosis acumulada en tejido tumoral; e) la acumulación potencial de radioactividad en los tumores es difícil de interpretar a causa de el extenso clearance hepático seguido de la rápida excreción biliar en el tracto intestinal (16).

Debido a las limitaciones de este radiofármaco para su uso clínico, fue desarrollado el [^{111}In -DTPA^o]-octreotide, que consiste en octreotide conjugado con DTPA y posteriormente marcado con el radiometal (17).



El primer radiopeptido perteneciente a esta clase de radiofármacos aprobado para uso diagnóstico en humanos fue el OctreoScan™, compuesto por el mismo péptido octreotide marcado con Indio-111. Actualmente, es considerado Gold Standard para el diagnóstico de varios tipos de tumores neuroendocrinos, aunque se han reportado mejores imágenes para ⁶⁸Ga-DOTA-TOC y ⁶⁸Ga-DOTA-TATE, no solo atribuible a la mayor resolución espacial del PET (18).

Radiofármacos de uso terapéutico:

La Terapia Radionucleídica de Receptores Peptídicos (PRRT) es una técnica para tratamiento de tumores. Se basa en la marcación de péptidos con un radionucleído terapéutico a través de un agente quelante bifuncional. El hecho de que la dosis entregada por el radiofármaco es mayor en el tejido tumoral que en el sano se fundamenta en la sobreexpresión de receptores de membrana específicos en las células tumorales y en la alta especificidad de los péptidos por ellos (Figura 6).

Los RF de este grupo que son usados actualmente en varios países europeos (Holanda, Suiza, Italia, Austria, España, Polonia, etc.) son el ⁹⁰Y -DOTA-Tyr-Octreotide (DOTA-TOC), ⁹⁰Y -DOTA-Tyr-Octreotate (DOTA-TATE), y el ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, todos para tratamiento de tumores neuroendocrinos. En Estados Unidos, uno de ellos (¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE) está siendo evaluado para el tratamiento de meduloblastomas en niños (M. Zalutsky, comunicación oral, 3ra. Reunión del Convenio Coordinado de Investigación titulado “Development and preclinical evaluations of ¹⁷⁷Lu and ⁹⁰Y labeled monoclonal antibodies and peptides for radionuclide therapy”, Řez by Prague, República Checa, 7-11 de Abril de 2014). Actualmente se está llevando a cabo el ensayo clínico para obtener la autorización de comercialización en la Unión Europea (Marketing Authorization) del ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE por una empresa privada (AAA). La situación en América Latina es heterogénea; Brasil y Colombia ya han obtenido el registro sanitario del ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, mientras que en México el registro se encuentra en proceso de evaluación. En Chile y Uruguay este RF es usado como tratamiento paliativo. Con respecto al ⁹⁰Y -DOTA-TOC, se encuentra registrado en Brasil, y se usa paliativamente en Argentina y Chile.

En el Capítulo 2 se describen los ensayos más relevantes con análogos de CCK/Gastrina de posible aplicación en terapia y diagnóstico de tumores.

1.3.4 Ventajas y limitaciones de los péptidos radiomarcados

Los péptidos reguladores son biomoléculas de pequeño tamaño cuyas propiedades especiales los hacen particularmente apropiados para la radiomarcación (19).

Esto es atribuible a las favorables características farmacocinéticas y su alta especificidad por receptores celulares que son sobreexpresados en células tumorales (1, 19, 20, 21). La acción de estos péptidos es mediada por su unión a receptores transmembrana, los cuales en su mayoría pertenecen a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCPs). Estos receptores se caracterizan por ser una cadena polipeptídica simple con 7 dominios transmembrana, un dominio extracelular con el sitio de unión expuesto y un dominio intracelular unido a las proteínas G que activan vías de transducción de señales e internalización (22). Este tipo de receptores es muy atractivo como blanco molecular ya que el complejo receptor-ligando es internalizado permitiendo un mayor tiempo de retención de la radiactividad en el tejido tumoral (23).



Algunas de las ventajas de la radiomarcación de péptidos frente a otras biomoléculas como anticuerpos o sus fragmentos se describen a continuación (24):

- A- Los receptores peptídicos generalmente tienen mayor densidad de expresión en células tumorales que en las normales, resultando en una alta relación tumor/fondo y permitiendo una adecuada visualización de los tumores.
- B- Debido a su pequeño tamaño, los péptidos exhiben un rápido perfil farmacocinético, permitiendo que éste penetre en el tumor eficientemente pero no así la barrera hematoencefálica. Esta distribución diferencial representa una gran ventaja cuando se busca llegar sólo a tumores en la periferia, ya que el cerebro suele expresar la mayoría de los receptores blanco.
- C- Exhiben una rápida depuración sanguínea y eliminación de los tejidos no blancos.
- D- Usualmente carecen de propiedades inmunogénicas.
- E- Al ser los péptidos compuestos que se encuentran normalmente en los seres vivos, no suelen tener efectos citotóxicos tan marcados como los quimioterápicos. En general, los efectos adversos se basan en su actividad fisiológica intrínseca. Incluso algunos péptidos exhiben actividad antitumoral (Ej. SST).
- F- Gracias a la tecnología actual disponible, son fáciles de sintetizar y modificar, incluso con aminoácidos (aa) no naturales, aumentando la estabilidad de los análogos sintéticos frente a las peptidasas. Además durante la etapa de síntesis se pueden unir los agentes quelantes adecuados para la rápida y efectiva marcación con radionucleídos. Por otra parte, los sintetizadores peptídicos automatizados permiten la síntesis de librerías de péptidos en tiempos cortos.
- G- Los péptidos son apropiados para la formulación de kits liofilizados.
- H- Existe una gran diversidad de blancos potenciales biológicamente importantes, lo cual abre un gran espectro de investigación para la posible aplicación de esta técnica (PRRT) en nuevos tipos tumorales

A pesar de las evidentes ventajas del uso de péptidos reguladores para radiomarcarse existen algunos desafíos a sortear:

- A- Como la mayoría de los receptores tiene gran afinidad por sus ligandos y son activos en concentraciones nanomolares de los mismos, los radiofármacos basados en péptidos deben alcanzar una alta actividad específica (A. E.), tanto para la marcación como para el radionucleído (24).
- B- Los péptidos lineales sin modificar poseen una corta vida media en sangre que imposibilitaría la adecuada captación por el tumor, pero esto puede mejorarse notablemente realizando algunas modificaciones, como reemplazando los L-aminoácidos por D-aa, incorporando aminoácidos no naturales, usando un enlace pseudo-peptídico o sustituyendo residuos en las cadenas laterales de los aa que lo conforman (20). Un ejemplo exitoso es el caso de la somatostatina (SST) nativa cuyo vida media en plasma es de 2 a 3 minutos mientras que su análogo sintético octreotide exhibe una vida media en plasma de 1,5-2 horas.
- C- Otro factor importante a tener en cuenta es la elevada captación y retención renal, que en el caso de la PRRT es de particular interés por la posible nefrotoxicidad del radiofármaco (25, 26, 27). Para disminuir la dosis en riñón se han diseñado y llevado a cabo diversos protocolos clínicos que incluyen la coadministración o administración previa de mezclas de aa como la Lisina y la



Arginina (28). Nuestro grupo evaluó la actividad en riñones en animales normales del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-Substancia P (^{177}Lu -DOTA-SP) con y sin administración previa del aminoácido arginina. Se observó estadísticamente que la inyección previa de arginina en ratones normales disminuye la captación renal de ^{177}Lu -DOTA-SP a 30 y 120 minutos p.i. (Figura 7) (29). El posterior análisis dosimétrico y la extrapolación a hombre y mujer estandar mostraron una reducción de la Máxima Actividad Tolerable (MAT) que puede ser administrada sin producir radiotoxicidad en riñones (órgano crítico). El efecto fue más pronunciado en el modelo de hombre adulto (MAT con Arg: 234 MBq/kg; MAT sin Arg: 170 MBq/kg) donde se observó un incremento del 38 % de la MAT, mientras que en el de mujer el porcentaje fue del 10% (MAT con Arg: 338 MBq/kg; MAT sin Arg: 306 MBq/kg) (30). También, se ha demostrado de la droga amifostina (31), y bajas dosis de gelatina succinilada y gelofusine (también basada en gelatina) pueden inhibir la captación renal de los análogos de SST radiomarcados (32, 33). Este mismo año se publicó un trabajo con un enfoque diferente, se evaluó la coadministración de un inhibidor enzimático de endopeptidasas, el phosphoramidon (PA). El trabajo realizado en conjunto por el Dr. Nock (Atenas) y el grupo del Erasmus (Rotterdam, Holanda) mostró un incremento del 5% al 70% en los niveles en sangre del compuesto ^{111}In -DOTA-MG11 a 5 minutos p.i., provocando un aumento del 2 al 15%ID/g (4 h. p.i.) en animales tumorados (34).

1.4 La familia de péptidos Colecistoquinina/ Gastrina y sus receptores

1.4.1 Características de los péptidos Colecistoquinina/ Gastrina

La Colecistoquinina (CCK) fue descrita por primera vez en el año 1928 como un péptido-hormona localizado en el tracto gastrointestinal de porcinos (35). En 1968 fue secuenciada evidenciado su estructura de 33 aminoácidos (CCK-33) y su gran homología con otro péptido caracterizado 4 años antes, la Gastrina (36, 37). Sin embargo, CCK-33 no es el único representante de esta familia, a lo largo de los años se encontraron una gran variedad de formas biológicamente activas como CCK-58, CCK-39, CCK-8, CCK4 (18) (Figura 8).

En humanos los CCK y la Gastrina son productos génicos distintos codificados en los cromosomas 3p22-p21.3 y 17p21 respectivamente (38, 39, 40, 41). Los péptidos CCK son sintetizados y secretados en las células I del intestino superior, mientras que la Gastrina es sintetizado en las células G del ántrun gástrico, ambos a partir de precursores de mayor tamaño (42). Por otra parte, la familia de péptidos CCK/Gastrina no sólo ejerce sus funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal, sino que juega un rol importante en el sistema nervioso central (por ello se lo clasifica también como neuropéptido). En cerebro, el más abundante es el CCK-8 (43, 44).

Algunos péptidos de esta familia poseen modificaciones post-transcripcionales, como la amidación del extremo C-terminal y la sulfatación en la Tyr⁷ en los CCK o en la Tyr⁶ en Gastrina, no obstante existen formas biológicamente activas no sulfatadas (45, 46, 47, 48).



A pesar de que el grado relativo de homología es bajo (< al 50 %), los péptidos comparten la secuencia pentapeptídica del extremo carboxiterminal (Figura 8), siendo éstos cruciales para ejercer su actividad biológica (49, 50). A causa de su similitud, CCK y Gastrina comparten algunos efectos farmacológicos y fisiológicos. En su forma madura ejercen su función biológica interactuando con la membrana de receptores específicos acoplados a la proteína G, los receptores de colecistoquinina tipo 1 y 2 (CCK1R y CCK2R) (50).

1.4.2 Características de los receptores de Colecistoquinina (CCKR)

Se han identificado tres tipos de receptores de CCK: el CCK1R (también llamado CCK-A), el CCK2R (CCK-B) y el CCK2i4svR. Estos difieren en su afinidad de unión por CCK y Gastrina, su distribución en tejidos y su estructura molecular.

Los análogos de CCK sulfatados (_SCCK) se unen al receptor CCK1R con entre 500 a 1000 veces mayor afinidad que los no sulfatados (_{NS}CCK). El CCK2R no discrimina entre análogos de CCK sulfatados y no sulfatados, por lo tanto Gastrina y CCK se unen con una afinidad similar (43). Este último también se lo suele llamar receptor de Gastrina.

Con respecto a la distribución en tejido humano, el CCK1R fue originalmente encontrado en las células pancreáticas acinares (46), y se localiza mayormente en la periferia. El CCK2R fue descubierto en cerebro (51), aunque también se expresa en estómago, páncreas y la vesícula biliar; su variante, el CCK2i4svR, producto del splicing alternativo, fue descubierto en células de cáncer colorectal (52). En el tracto gastrointestinal, cuando el CCK2R es activado por Gastrina, estimula la secreción ácida (53).

Los receptores de CCK (CCKR) fueron farmacológicamente clasificados por su afinidad a los péptidos endógenos CCK y Gastrina. Como se mencionó anteriormente, ambos péptidos se diferencian por tener el residuo Tyr en la posición 6 para el caso de Gastrina, y 7 para CCK; estos residuos son sitios potenciales de sulfatación (54, 55).

CCK1R y CCK2R exhiben un bajo grado de homología (< al 50 %), pero ambos poseen 7 segmentos hidrofóbicos correspondientes a dominios transmembrana con el extremo amino-terminal extracelular y carboxilo-terminal intracelular (Figura 9). Estas estructuras son características de la familia de receptores acoplados a una proteína G (GPCRs) (24, 44). Este tipo de receptores (GPCRs) son muy atractivos como blancos moleculares para el diseño de medicamentos, de hecho estos representan aproximadamente el 40% de todos los medicamentos modernos (53, 56). La acción de estos receptores es ejercida a través de la unión de un ligando que produce un cambio conformacional del GPCR, lo que le permite actuar a este como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina y activar a una proteína G asociada (47). Sin embargo, la característica principal que los hace tan interesantes para la PRRT es su capacidad de internalizar el complejo ligando-receptor, permitiendo un mayor tiempo de retención del radionucleído en las células, correspondido con un incremento del daño celular asociado las partículas β^- (Figura 6) (23).

Otra característica de los CCKR es que contienen 3 o 4 sitios potenciales de glicosilación en el extremo amino-terminal, lo cual es consistente con un alto grado heterogeneidad de glicosilaciones (48, 49). Los análisis en SDS-PAGE sugieren que el



grado de glicosilaciones difiere de acuerdo con el tipo celular en el que el receptor es expresado. El rol de estos residuos de carbohidratos no fue dilucidado aun (42).

En humanos, el gen que codifica CCK1R esta localizado en el cromosoma 4p15.1-p15.2, mientras que el CCK2R se encuentra codificado en el cromosoma 11p15.4 (50, 57). Ambos genes están organizados en 5 exones (Figura 10) y se observa una variante del exon 1 para el CCK2R (58). De acuerdo con algunos autores, en algunas células, como las cancerigenas, el exon 1 puede ser usado alternativamente originando un transcripto de CCK-2, truncado en el extremo N-terminal (58).

El receptor CCK2i4svR es el producto de una maduración del RNAm alternativa, diferenciándose de su hermano el CCK2R por la retención del intrón 4, resultando en una inserción de 69 aminoácidos en el tercer loop del dominio intracelular (52). Fue descubierto en cáncer de colon y se encontró que este receptor estimula el crecimiento a través de un mecanismo independiente de Gastrina.

1.4.3 Propiedades de unión y ligandos de la familia CCK/Gastrina

Existen numerosos estudios sobre la caracterización farmacológica de los receptores de CCKR. Para una correcta comprensión sobre este tema, cabe aclarar las definiciones de agonistas y antagonistas peptídicos y su relación con los estados activos y no activos de los CCKR. Los agonistas peptídicos son los que se unen al receptor ejerciendo a su vez la función fisiológica normal del receptor (receptor en estado activo), mientras que los antagonistas se unen al receptor no ejerciendo ninguna actividad funcional (estado no activo del receptor). Por lo tanto los experimentos de unión realizados con los agonistas radiomarcados dan una idea de los parámetros de unión al receptor en estado activo, o sea en este caso, asociado a la proteína G, mientras que los llevados a cabo con antagonistas reflejan las características de unión de los estados inactivos de receptor. Esto en parte logra explicar por qué los experimentos con antagonistas han identificado un gran número de sitios de unión del receptor, comparados con los encontrados en los ensayos con agonistas (59). La afinidad de unión de los agonistas de CCK/Gastrina difiere según los estados activos del receptor, identificándose sitios de alta, baja y muy baja afinidad. En los ensayos entre los derivados de CCK y el CCK1R se obtuvieron valores de K_D entre 50 y 300 ρ M para los sitios de alta afinidad, y de 50 a 200 η M para los sitios de baja afinidad (46, 60, 61).

Por otro lado, los valores de K_D entre los CCK y el CCK2R para los sitios de alta y baja afinidad son entre 100 y 300 ρ M y de 2 a 5 η M respectivamente (62). Los K_D para los sitios de muy baja afinidad son cercanos a 10 μ M para ambos receptores (63). Con respecto a la diferenciación entre agonistas y antagonistas descripta anteriormente cabe mencionar que luego de varios estudios algunos péptidos que inicialmente se comportaban como “antagonista puros”, han mostrado tener una actividad “agonista parcial”, sembrando nuevos interrogantes frente a esta clasificación de los viejos y nuevos derivados de CCK/Gastrina (54).

El ligando natural para CCK1R que se une con la mayor afinidad es el sCCK-8, aunque los CCK-33, CCK-39 y CCK-58 se unen con similar grado de afinidad (64, 65). Los ligandos con mayor afinidad por CCK2R son sGastrina-17 (G-17II) y sCCK-8 (66, 67). La versión no sulfatada de Gastrina (G-17I) tiene de 3 a 10 veces menos afinidad que la G-17II. Teniendo en cuenta las afinidades y las concentraciones fisiológicas se puede suponer que G-17II es el compuesto fisiológico mayoritario de los CCK2R de la



periferia mientras que el sCCK-8 es el que normalmente interacciona con los CCK2R expresados en cerebro.

1.4.4 Expresión de los receptores CCK1R y CCK2R en tumores humanos

Se han identificado varios tipos tumorales que expresan de forma diferencial los receptores de CCKR. El receptor CCK2R tiene una incidencia > 90 % en cáncer medular de tiroides (MTC), mientras que en cáncer de tiroides diferenciado no se sobreexpresa (68). Hay que tener en cuenta que los MTC comprenden entre el 3-12 % de todos los cánceres de tiroides y que no puede ser tratado con ¹³¹I. También se encontró una alta incidencia de expresión en cáncer estromal de ovario (100 %), cáncer de pequeñas células de pulmón (SCLC, 89 %) y en astrocitomas (65 %) (24, 69, 70).

El CCK1R se encontró sobreexpresado en adenocarcinomas pancreáticos y líneas celulares derivadas de esos tumores, y en pequeña medida en tumores gastroenteropancreáticos (GEP) (71).

El CCK2i4svR se sobreexpresa en cáncer pancreático y colorectal, pero no se expresa en la mucosa colorectal normal (52, 72). Sin embargo los niveles de expresión de este receptor parecen ser insuficientes como para ser candidatos de PRRT (73).



Capítulo 2

2.1 Radiofármacos basados en análogos de CCK/Gastrina

2.1.1 Estado actual del desarrollo de radiofármacos para diagnóstico y terapia de análogos de CCK/Gastrina

Hace más de 15 años, Thomas Behr, quien trabajaba en el Departamento de Medicina Nuclear de la Universidad Georg-August (Göttingen, Alemania), observó que el test pentagastrin presentaba una elevada sensibilidad para detectar células malignas en pacientes con MTC y sugirió que esto se debía a una alta incidencia de los receptores de gastrina (CCK2R) en estos tumores (45). De este trabajo surgen los primeros resultados alentadores con la Gastrina I humana (GIH) radiomarcada con ^{131}I .

Casi simultáneamente, el grupo de Berna (Reubi et al.) publicaba sobre la inesperada alta incidencia de este receptor en MTC y al año siguiente presentaba sus primeros resultados de autoradiografías que confirmaban la expresión de los receptores CCK/gastrina tanto en MTC (> 90%) como en SCLC, cáncer estromal de ovario y astrocitomas (68, 69).

A consecuencia de los prometedores resultados obtenidos, Behr y sus colaboradores estudiaron 18 análogos de CCK/Gastrina radiomarcados con ^{131}I , evaluando su afinidad y su localización en ratones inmunosuprimidos portadores de tumores. A partir de estos estudios se seleccionó un péptido de 12 aminoácidos con una secuencia penta-Glu, llamado minigastrina (MG, MG0) (54). Al observarse que las radiomarcaciones con ^{131}I no eran apropiadas por su comportamiento *in vivo*, el grupo del Profesor Reubi desarrolló, a finales de los '90, una serie de análogos de $^{\text{NS}}\text{CCK-8}$ conjugados en su extremo N-terminal a los agentes quelantes DTPA y DOTA, para permitir la marcación con otros radiometales como el Indio-111 (74). En su trabajo, se confirmó que la alta especificidad por el receptor CCK2R está determinada por la presencia de una $^{\text{NS}}\text{Tyr}$, y se observó que la sustitución de las metioninas en las posiciones 3 y 6 por norleucinas no afecta las propiedades de unión; los valores de IC_{50} observados fueron similares, 2,3 nM (CCK-8) y 1,5 nM ($[\text{Nle}^3, ^6]\text{CCK-8}$). Estos resultados son muy relevantes ya que desde los inicios se observaba que la oxidación del residuo metionina en estos análogos provocaba una pérdida de afinidad (Figura 11).

En Rotterdam, de Jong y sus colaboradores del Erasmus, investigaron el potencial del radiofármaco $^{111}\text{In-DOTA-(Nle}^{3,6})\text{CCK-8}$ para diagnóstico y terapia de tumores (75). Se evaluaron la internalización (utilizando la línea celular derivada de un tumor pancreático de rata, AR4-2J), las biodistribuciones, y la captación tumoral en tumores CA20948 (también derivados de un tumor pancreático de rata). Se observó la unión específica tanto en la línea celular como en los tumores; la internalización fue dependiente del tiempo y de la temperatura. Varios años después y en otra ciudad de Holanda, Nijmegen, el grupo del Dr. Laverman (2004) comparó los análogos $^{\text{s}}\text{CCK-8}$ y $^{\text{NS}}\text{CCK-8}$ marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, demostrando que el radiopéptido $^{99\text{m}}\text{Tc-tricina/HYNIC-}^{\text{s}}\text{CCK-8}$ mostraba 15 veces más captación en tumores AR4-2J tanto para el receptor CCK1R como para CCK2R (76). Cuatro años más tarde demostraron que el $^{\text{s}}\text{CCK-8}$ y



la MG0, ambos radiomarcados con ^{111}In , tenían afinidad por la variante sv4iCCK2R (77).

Con el objetivo de mejorar la estabilidad del complejo RN-quelante, Béhé et al. (2003) evaluaron a MG0 conjugado a un DTPA estabilizado con D-Glu, para incrementar la estabilidad de los complejos con Indio-111 e Ytrio-90. Aloj y sus investigadores (2004) probaron este agente quelante unido a un derivado de CCK-8, introduciendo un residuo de glicina espaciador entre el quelante y la secuencia peptídica, y demostraron que este radiopéptido marcado con ^{111}In era más estable comparado con el mismo péptido pero unido al DPTA convencional (78, 79). Para realizar este ensayo, el Profesor Aloj desarrolló un nuevo modelo de estudio, usando la línea celular A431 (derivadas de un carcinoma epidermoide humano) transfectadas con un plásmido (pC3.1) con y sin la secuencia codificante para el receptor CCK2R humano. Esta línea celular es mencionada posteriormente en esta tesina como A431(CCK2R+) o A431(CCK2R-). Y es el modelo que se usa actualmente para el estudio de los derivados de CCK/gastrina.

En otra iniciativa para obtener alguno de estos derivados radiomarcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Nock et al. (2005) evaluaron 3 derivados de MG, con distintos brazos espaciadores (80). La mejor relación tumor/fondo fue para el radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrin 2, con una sola glicina entre el agente quelante y el péptido.

En el año 2007, en Londres, Mather y sus colaboradores evaluaron una biblioteca peptídica de análogos de CCK/MG conjugados a DOTA y DTPA con el objetivo de identificar péptidos con una mejor relación tumor/riñón (81). Ellos observaron que la remoción de la secuencia penta-Glu disminuye la retención en riñón notablemente (de 60 %ID/g a 3 %ID/g), aunque también reduce la captación tumoral en un factor de 3. Además, encontraron que un análogo, con 2 residuos de histidina espaciadores entre el agente quelante y el péptido, el APH070 (o también llamado en este trabajo DOTA-His₂-MG), era el que mostraba los mejores resultados con respecto a la relación tumor/riñón.

Debido a que los complejos formados entre los derivados de DTPA-MG y los emisores beta (-) como Ytrio-90 o Lutecio-177 no son lo suficientemente estables (82), Good (Basel), y otros investigadores de Alemania y Suiza evaluaron otros agentes quelantes unidos a 3 derivados de MG. Estos se diferencian en la cantidad de residuos de glutamato, y para uno de ellos (el DOTA-MG11) se evaluó la sustitución de la metionina (Met¹⁵) por otros aminoácidos no naturales como la Nle y la isoleucina (Ile), o por metioninas oxidadas, como metionina sulfóxido o sulfona (Figura 11) (83). Este trabajo realizado colaborativamente entre diferentes grupos de investigación europeos (COST Action B12, “Radiotracers for in vivo assessment of biological functions”, 2008) tenía el objetivo de incrementar la estabilidad del complejo RN-quelante, mejorar la estabilidad radiolítica de los péptidos, la relación tumor/riñón, y la estabilidad metabólica. Las radiomarcaciones con $^{111}\text{InCl}_3$ tuvieron altas PR, en todos los casos fueron mayores al 95,8 %. La afinidad de los radiopeptidos fue muy buena para los análogos que tenían metionina en su secuencia peptídica (IC₅₀ entre 1,2 y 4,8 nM), y disminuyó notablemente para los que fueron sustituidos (IC₅₀ entre 9,9 -1195 nM), siendo el mejor de ellos el que tenía Nle (^{111}In -DOTA-(Nle)MG11; IC₅₀ = 9,9 nM). Los porcentajes de internalización, expresados como el porcentaje de la actividad total inyectada por millones de células, fueron entre el 6,4 -11,0 %, siendo el más alto para el ^{111}In -DOTA-MG9. Las biodistribuciones en ratones portadores de tumores (AR4-2J) mostraron relaciones tumor/riñón entre 0,46 - 2,25 a las 4 h, siendo el compuesto ^{111}In -DOTA-MG11 el que mejor resultado obtuvo. La estabilidad en suero humano fue



bastante variable, el más inestable fue el radiopeptido con Nle, ya que luego de 2 h de incubación solo se observaba un 32 % de radiopéptido intacto. Se observó una correlación entre la captación tumoral y: la afinidad, el porcentaje de internalización y la estabilidad en suero humano.

Durante el 2009, nosotros evaluamos la PR, la estabilidad en suero humano, las BD en ratones normales, el análisis dosimétrico y la extrapolación a pacientes, del péptido DOTA-His₂-MG radiomarcado con ¹⁷⁷LuCl₃ de alta A.E. y de producción local (RA-03, CAE) (84). Los resultados se discuten en el Capítulo 4.1.

Los análogos lineales de MG existen en varias formas conformacionales en solución. Es por ello que el grupo de Innsbruck (von Guggenberg et al., 2009) basado en su experiencia con los péptidos cíclicos RGD, propuso dos análogos cíclicos, HYNIC-cyclo-MG1 y HYNIC-cyclo-MG2, ambos basados en la secuencia de MG11 y marcados con ^{99m}Tc (85). La ciclación se realizó reemplazando el aa Gly (posición 9) por una D-Lys, la cual se unió con el residuo D-Glu (en posición 1) a través de un enlace amida interno (Tabla 1). Ambos péptidos se diferencian en la sustitución de la Met (cyclo-MG1) por Nle (cyclo-MG2). Estos derivados cíclicos mostraron buena estabilidad *in vitro* y captación específica en la línea celular AR4-2J. Los ensayos en animales portadores de tumores revelaron una rápida eliminación renal y poca captación inespecífica en tejidos. La captación en los tumores fue mayor al 3 %ID/g (in vivo y ex vivo) a 1 h p.i., sin embargo el análisis preliminar de los metabolitos indicó una rápida conversión a su forma lineal. Posteriormente en el año 2012, conjugaron estos análogos cíclicos al agente quelante DOTA para permitir la radiomarcación con los radiometales trivalentes. Ellos observaron que la captación de los radiofármacos en el tumor (de un modelo animal) fue mayor cuando estaba radiomarcado con ⁶⁸Ga (3 % ID/g) que con ¹¹¹In (1 %ID/g), y que las mejores imágenes entre ambos péptidos marcados con ¹¹¹In se obtuvieron con el compuesto ¹¹¹In-DOTA-cyclo-MG2 (86). El DOTA-cyclo-MG1 fue seleccionado para ser evaluado comparativamente junto a otros 11 análogos (COST Action BM0607) y los resultados se presentan más abajo. Recientemente evaluamos la PR y la internalización de estos análogos cíclicos en nuestro laboratorio, los resultados se describen en el capítulo 3.

En otro enfoque innovador, el grupo de Londres (Sosabowski et al., 2009) sintetizó el péptido dimérico DOTA-MGD5, basado en el análogo lineal APH070 (87). Los valores de K_D para este radiopeptido marcado con ¹¹¹In fueron superiores a los valores del compuesto lineal, mientras que los porcentajes de internalización fueron casi el doble. Las imágenes en nanoSPECT/CT revelan un claro aumento de la captación tumoral, y la relación tumor/riñón (realizada post mortem) se incrementó de 1,1 (APH070) a 2,7 (MGD5).

En el año 2011, sintetizamos dos nuevos análogos, DOTA-MG6 y DOTA-MG7, en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital Universitario de la Universidad de Innsbruck (Austria) bajo la dirección del Dr. Roland Haubner y la Dr. Elisabeth von Guggenberg (88). Ambos péptidos fueron sintetizados por síntesis peptídica en fase sólida (estrategia Fmoc) con un sintetizador manual (Tabla 2; Figura 12). Estos octapéptidos lineales derivados de MG poseen en su secuencia al residuo metionina, y 2 aa no naturales, D-Trp y 1Na, que sustituyen al Trp y la Phe respectivamente del extremo Carboxi-terminal. Se diferencian por tener una D-Tyr (DOTA-MG7) en lugar de una Tyr (DOTA-MG6) en la posición 6 (Figura 13). Luego de la síntesis se observó la oxidación del péptido DOTA-MG6, corroborado posteriormente por Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Se llevó a cabo un



protocolo con el objetivo de reducir la metionina oxidada pero no se obtuvieron buenos resultados. El compuesto DOTA-MG7 fue radiomarcado con ^{111}In y ^{68}Ga en los laboratorios de Austria y se evaluó la PR, la estabilidad en SH y la internalización. Las purzas radioquímicas fueron mayores al 97%, observándose poco péptido oxidado. La estabilidad en SH a 4 h no mostró un incremento del péptido oxidado, sin embargo no se observó internalización del radiopéptido. Posteriormente, en nuestros laboratorios, se evaluó este compuesto (cedido gentilmente por el Dr. Decristoforo) radiomarcado con ^{177}Lu de alta A. E. y de producción local (RA-03, CAE); los resultados se mencionan en la discusión (Capítulo 4.1).

Con el objetivo de evaluar comparativamente los mejores análogos de MG y CCK ensayados en los últimos años, se llevó a cabo un estudio colaborativo en el cual se seleccionaron 12 péptidos para ser evaluados por 9 grupos de investigación europeos (Atenas, Basel, Freiburg, Innsbruck, Nijmegen, Londres, Ljubljana, Napoles, y Rotterdam). Los resultados de estos estudios multicéntricos se describen en tres publicaciones del año 2011, agrupadas de la siguiente forma: ensayos de unión a células y de internalización (71), estabilidad biológica y metabolismo (89), y biodistribuciones en ratones (70).

Todos los derivados de CCK/MG fueron sintetizados por el método de síntesis peptídica en fase sólida basada en Fmoc, conjugados a DOTA y marcados con ^{177}Lu e ^{111}In . Nueve análogos contienen metionina en su secuencia, mientras que al resto se sustituyó este residuo por Nle o homo-propargil-glicina (HPG) para prevenir la oxidación. Entre los que tienen Met están MG0 (Behr et al), MG11 (Good et al.), y el análogo cíclico Cyclo-MG1 (von Guggenberg et al.) (45, 83, 85). También este grupo incluye una serie de derivados con distinto número de D-Gln y D-Glu en el extremo N-terminal pero conservando la misma secuencia heptapéptica en el extremo C-terminal (PP-F6, PP-F10, PP-F11, PP-F16), y el análogo surgido de la biblioteca peptídica de Mather, el APH070, que posee dos histidinas en su extremo N-terminal (81, 90). Hay 2 derivados de CCK-8 estudiados, uno posee metionina (G-CCK-8, Aloj et al.) y otro HPG, además de ser el único péptido sulfatado (SA106, Roosenburg et al.) (76, 78). Entre los que no poseen Met, se seleccionó el compuesto divalente estudiado previamente por Sosabowski, el MGD5 (87). También se incluyó el compuesto sargastrín de 17 aa (Marsouvanidis et al) (91). Las secuencias aminoacídicas se muestran en la Tabla 1.

Las BD se realizaron en ratones (BALB/c) atímicos tumorados de ambos flancos con la línea celular A431 con y sin expresión del receptor CCK2R (70). Según los autores, los análogos que mejor perfil farmacocinético tienen son el análogo lineal con 6 residuos D-Glu (PP-FF11) y las versiones divalente y cíclica de minigastrina, MGD5 y cyclo-MG1. Estos radiopéptidos combinan alta captación tumoral específica y baja retención renal. En otro ensayo realizado a posteriori (2012) con los análogos cíclicos de MG marcados con ^{111}In y ^{68}Ga , von Guggenberg observó que en general, la acumulación de actividad en la mayoría de los órganos y en los tumores fue mayor para el radiofármaco marcado con 68-Ga. Dice además que hay una diferencia en las vías de eliminación cuando se cambia el radionucleido; cyclo-MG1 se eliminaba principalmente por riñones cuando estaba marcado con ^{111}In , pero cuando se marcaba con ^{68}Ga se eliminaba mayormente por la ruta hepatobiliaria (86).

Los ensayos de estabilidad *in vitro* se realizaron incubando los radiopéptidos en SH fresco y en homogenatos de hígado y riñón de ratón; los resultados se informaron como el tiempo al cual se observa la mitad de la concentración inicial del radiopéptido intacto ($t_{1/2}$) (89). Todas las PR fueron mayores al 90%, observándose en los análogos que



contenían metionina menos de un 10% de radiopeptido oxidado luego de la marcación; debido a estos resultados se decidió utilizar los radiofármacos sin purificación previa en los ensayos. También se estudiaron los metabolitos en orina de ratón luego de 10 min p.i, no observándose radiopéptido intacto de ninguno de los compuesto. Los $t_{1/2}$ fueron variables, y ninguno de los ensayos *in vitro* permite predecir los resultados observados *in vivo*. Se identificó un sitio de clivaje común entre el residuo Asp y Phe del extremo carboxi-terminal. Excepto en cyclo-MG1 y MGD5, se observó también clivajes comunes en los residuos Tyr y Gly. Como metabolito de la orina del compuesto ^{177}Lu -DOTA-cyclo-MG1, solo se pudo identificar el producto correspondiente al sitio de corte común (entre Asp y Phe). Según los autores, la información surgida de estos estudios puede ser de utilidad para diseñar nuevas estructuras. Concluyen seleccionando el compuesto PP-F11 debido a su comportamiento general en todos los ensayos *in vitro*. Los resultados de los ensayos de unión a células y de internalización se mencionan a continuación (Capítulo 2.1.2).

2.1.2 Ensayos de unión e internalización realizados con radiofármacos de análogos de CCK/ Gastrina.

Los llamados “ensayos de unión” pueden ser utilizados para estimar parámetros de unión entre un radioligando y su receptor específico.

El ensayo de competición, o también llamado de desplazamiento, estima el valor de IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) que es la concentración a la cual el inhibidor reduce en un 50% la unión del radioligando. Es un parámetro de afinidad entre el competidor (ligando frío) y el receptor, y se suele expresar en unidades de concentración (nM). En este procedimiento se co-incuba una concentración fija del radioligando junto a concentraciones crecientes del competidor frío (92, 93).

En el ensayo de saturación se usan concentraciones crecientes del radioligando y luego del procesamiento de los datos por regresión no lineal, se obtiene los valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_D), que es la concentración de radioligando a la cual se ocupan la mitad de los receptores celulares específicos, y también de la B_{max} , que estima el número total de receptores. Idealmente este ensayo debe hacerse con los receptores aislados y no con células viables (sistema abierto), ya que no se llega a la condición de equilibrio requerida. Es por ello que cuando no es posible aislar los receptores celulares, y que mantengan su actividad biológica, como es el caso de los CCK2R expresados en la línea celular A431, se debe expresar los resultados como “ K_D aparente” (92, 93, 94).

Los ensayos de internalización son realizados en células viables y proveen información sobre si el radiofármaco es captado por la célula a través del receptor específico.

En general todos estos ensayos comparten las siguientes características:

- a- El radioligando debe estar en concentraciones muy bajas para evitar la saturación de los receptores; una regla típica es que la concentración del radioligando en el ensayo debe ser menor que el K_D conocido o esperado.
- b- El compuesto radiomarcado (radioligando) debe poseer una alta actividad específica de marcación para proveer una estadística de conteo adecuada.
- c- El competidor o agente bloqueante debe ser un compuesto frío que tenga conocida afinidad y especificidad por el receptor.



La importancia del ensayo de internalización en el desarrollo de radiofármacos de PRRT se debe a que este proceso permitiría aumentar el tiempo de retención del radiofármaco dentro de la célula y así ejercer mayor daño al tumor, generado por las radiación ionizantes (ej. partículas β^-). Los resultados se suelen expresar como un porcentaje calculado en base a la suma de las actividades internalizada y unida a membrana (captación o unión total), en relación con la actividad total agregada. Es necesario estimar la unión inespecífica, co-incubando con un agente bloqueante o incubando el ensayo a 4°C, temperatura a la cual se inhibe la internalización. En este ensayo, la concentración del radioligando debe estar entre 1-10 nM, mientras que el agente bloqueante suele estar entre 100-1000 veces más concentrado (91).

Como parte del proyecto COST BM0607, también se realizaron ensayos de desplazamiento (IC_{50}), de saturación (K_D y B_{max}) y de internalización con los 12 DOTA-derivados (71).

Los estudios de desplazamiento fueron realizados en tejidos tumorales de pacientes, extraídos por cirugía y que sobreexpresan el receptor CCK2R. Los valores de IC_{50} se obtuvieron por autoradiografías de estos tejidos y fueron similares para todos los radiopéptidos en el rango de 0,1 y 1,0 nM (competidor ^{125}I -CCK8), siendo 0,7 nM ($n=3$) el valor reportado para el compuesto ^{111}In -DOTA-cyclo-MG1 (71). Más recientemente, un grupo de investigadores de Korea evaluó los IC_{50} del péptido minigastrina cíclico (Cyclic-MG1 o DOTA-cCCK) y su análogo con la sustitución aminoácida Met por Nle (Cyclic-MG2 o DOTA-[Nle]cCCK), ambos radiomarcados con Galio-68. Los IC_{50} obtenidos están en el mismo rango (nM) que los ensayos publicados previamente para los otros análogos de minigastrina. Sin embargo, el IC_{50} para ^{68}Ga -DOTA-cyclo(Met)MG fue 10 veces mayor que para el análogo con Nle (12,31 nM y 1,69 nM) (95). Ellos concluyen que la sustitución aminoácida de Nle por Met parece aumentar la afinidad de unión en estos péptidos con estructuras cíclicas.

Los ensayos de saturación de los 12 análogos evaluados fueron realizados en la línea celular A431 con y sin el receptor CCK2R transfectado. Los resultados muestran valores de K_D similares entre 1-10 nM y el número de sitios de unión aparente por célula (B_{max}) también fue comparable entre los diferentes radiofármacos ($0,6-2,2 \times 10^6$ sitios por célula) (71). Se observó una menor afinidad cuando el sistema usado fue la línea A431(CCK2R+), posiblemente debido a que las modificaciones post transcripcionales en las células de carcinoma epitelial (A431) difieren de las modificaciones en células de origen neuroendocrino donde la proteína es fisiológicamente expresada. Sin embargo dado los altos valores de unión e internalización encontrados, estas células son un modelo apropiado para la evaluación de los análogos de CCK/Gastrina.

Los ensayos de internalización (realizados bajo el COST BM0607) fueron realizados por dos laboratorios diferentes. Un grupo utilizó las líneas celulares A431(CCK2R+) y A431(CCK2R-), incubando los radiopéptidos por dos horas junto a las células en dos condiciones de temperatura diferentes: 4°C, donde no ocurre internalización, y 37°C, temperatura óptima a la cual la célula cumple sus funciones fisiológicas (internalización positiva). Estos experimentos mostraron una acumulación progresiva de todos los compuestos hasta las dos horas de incubación, así como también la retención de la radiactividad luego del desplazamiento con péptido frío. La diferencia de la actividad asociada a las células entre las dos condiciones ensayadas fue de 5 a 20 veces mayor a 37°C, sugiriendo que la internalización jugaría un papel muy importante en lo referido a aumentar la cantidad de radiopeptido en el tumor.



La otra serie de ensayos de internalización se llevó a cabo en otra línea celular además de la A431, la línea AR4-2J, incubándose los radiopéptidos por 1 hora a 37°C. Para estimar la unión específica se bloqueó con Gastrina I Humana (GIH). En concordancia con los resultados anteriores, todos los compuestos mostraron un alto grado de internalización en ambas líneas celulares (Figura 14), con valores para la mayoría entre 45 y 17% de actividad correspondiente a la fracción internalizada. El péptido PP-11 fue el que mostró el valor máximo (57% de internalización). El derivado cyclo-MG1 cuyo porcentaje de internalización fue entre 17 y 20%, mostró una captación de actividad total diferencial entre ambas líneas celulares, siendo notablemente mayor en la línea que expresa la versión humana del receptor CCK2R (22% contra 1%) (Figura 15).

En el último paper que voy a mencionar, se evaluaron comparativamente los péptidos cíclicos cyclo-MG1 y cyclo-MG2 ambos conjugados a DOTA y radiomarcados con ^{111}In y ^{68}Ga . En este trabajo realizado entre 4 centros de investigación europeos (Innsbruck, Nijmegen, Londres y Berna), se evaluaron la estabilidad *in vitro*, la internalización, las BD y se realizaron imágenes en un equipo SPECT-CT para pequeños animales (86).

Las PR fueron mayores al 98%, y ambos mostraron buena estabilidad en solución acuosa y en plasma humano, aunque el compuesto con metionina obtuvo valores algo menores y se incrementó el porcentaje de radiopéptido oxidado a mayor tiempo de incubación. El porcentaje de unión a proteínas del suero humano fue similar (aprox. 20%) y los valores de Log P, indican una lipofiliencia algo mayor para ^{111}In -DOTA-MG2. La estabilidad en homogenatos de órganos de ratón mostró una degradación completa de ambos RF luego de 2 hs de incubación. Las biodistribuciones en un modelo animal portador de tumores (AR4-2J, línea celular derivada de un tumor pancreático de ratas) mostraron que los compuestos radiomarcados con Galio-68 tenían una mayor captación inespecífica en la mayoría de los órganos. A pesar de que los estudios *in vitro* de unión total en la línea celular AR4-2J (actividad internalizada más la actividad unida a membrana) muestren un resultado levemente mejor para el ^{111}In -DOTA-cyclo-MG1, la captación tumoral *in vivo* fue muy similar entre ambos RF. La comparación de la captación en tumores entre los análogos radiomarcados con Galio-68 e Indio-111 fue mayor para los ^{68}Ga -cyclo-MG-peptidos, y en todos los casos fue específica para el receptor CCK2R. Estos hallazgos son similares a los observados con análogos de somatostatina (SS), donde los ^{68}Ga -SS-peptidos tuvieron un mejor perfil de afinidad por el receptor resultando en un mejoramiento de la imagen. Además se ha reportado una geometría de complejación diferente entre el Indio y el Galio, influenciando posiblemente las propiedades farmacológicas del radiopéptido (96).

Es importante destacar que las condiciones de los ensayos de internalización que se mencionaron en este capítulo fueron muy similares a las realizadas en nuestro laboratorio (Capítulo 3).



Capítulo 3

3.1- Materiales y Métodos

3.1.1- Obtención de ^{177}Lu de elevada actividad específica

Preparación de blancos: una cantidad de Lu_2O_3 enriquecido al 82.0 % en Lutecio-176 (Trace Science International, USA) provisto por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) en el marco del convenio de investigación (CRP) titulado “Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Base on ^{177}Lu for Radionuclide Therapy”, fue disuelto en HCl concentrado (Merck, Suprapur[®]), para obtener una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de esta solución, se realizó otra dilución con HCl 0,1 M (Merck, Suprapur[®]) para obtener una concentración final de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se alicuotó 5 μl de la “dilución de $^{177}\text{LuCl}_3$ 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ” (equivalente a 0,88 μg de Lutecio-177 en tubos de cuarzo de 21-24 mm de largo y 3 mm de diámetro, previamente limpiados con etanol. Las muestras se centrifugaron por 30 min. a 60°C hasta evaporación completa (Concentrador 5301, Eppendorf). Las ampollas fueron cerradas con un soplete de acetileno, puestas en un mini-can de aluminio, cerradas y sometidas a un ensayo de estanqueidad.

Debido a que los mini-can de aluminio irradiados tienen una alta dosis en contacto, originada por la reacción nuclear $^{27}\text{Al}(n, \alpha) ^{24}\text{Na}$, fue necesario diseñar un dispositivo para la apertura segura de los mini-can, el cual se instaló en una celda caliente de transferencia del RA-3.

La apertura por corte de las ampollas de cuarzo fue realizada en nuestro laboratorio con un torno Dremel provisto de un disco diamantado. Una vez abiertos, se disolvió el ^{177}Lu agregando entre 10-20 μl de HCl concentrado (Merck, Suprapur[®]). Se midió la actividad en un activímetro (CRC-15, Capintec) y se estimó la concentración de actividad (mCi/ μl) y la actividad específica al momento de la marcación.

Todos los reactivos y soluciones fueron preparados con agua milliQ tratada con la resina BT Chelex 100 (BioRad) a fin de minimizar el contenido de hierro (Fe). También se utilizaron recipientes plásticos y puntas de micropipetas plásticas a fin de no introducir trazas de Fe.

3.1.2- Marcación de DOTA-cyclo-(Met)MG y DOTA-cyclo-(Nle)MG con $^{177}\text{LuCl}_3$

Para la marcación se tomaron 40 μg de DOTA-cyclo-(Met)MG (pi Chem, Austria) y 52 μg de DOTA-cyclo-(Nle)MG (pi Chem, Austria), ambos disueltos en etanol al 20% y provistos gentilmente por la Dra. Elisabeth Von Guggenberg (Innsbruck, Austria) en el marco de un CRP del OIEA titulado “Therapeutic radiopharmaceuticals based on ^{177}Lu - and ^{90}Y -labeled monoclonal antibodies and peptides: development and medical evaluation”. A ambos péptidos se les adicionó una cantidad de $^{177}\text{LuCl}_3$ (A. E. 18,97 mCi/ μg de ^{176}Lu al momento de la marcación) suficiente para obtener una A. E. de marcación de 0,067 mCi/ μg de péptido (2,7 y 3,5 mCi respectivamente). Ambas



marcaciones se llevaron a pH 5,7 con 70 µl de acetato de amonio 1M (pH 7), y se incubaron en un baño termostático por 1 hora a 80°C.

3.1.3- Determinación de la Pureza Radioquímica (PR)

El porcentaje de PR fue determinado empleando cartuchos de C18 (SepPak C18 Classic cartridges, Waters), usando una elución para activar la matriz (elución A: agua 97,9%; acetonitrilo (ACN) 2%; ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%) y otra para la elución del radiopéptido (elución B: agua 34,9%; ACN 65%; TFA 0,1%)

El porcentaje de PR fue calculado como el porcentaje de actividad en la elución B con respecto a la actividad total (actividad de la elución A + actividad de la elución B + actividad del cartucho).

También se analizaron las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Fase Reversa (RP-HPLC, columna Delta-pak C₁₈, Waters) bajo las siguientes condiciones: solvente A: Agua:TFA 0,1%; solvente B: ACN:TFA 0,1%; Gradiente: de 0-3 min. 100% A; 3-4 min. 60% A; 4-20 min. 32% A; 20-25 min. 0% A; 25-28 min. 0% A; 28-31 min. 100% A.

3.1.4- Ensayo de internalización

El ensayo se llevó a cabo utilizando la línea celular A431, derivadas de un carcinoma epidermoide humano, transfectadas con el plásmido pCR3.1 el cual contiene la secuencia codificante para el receptor CCK2R humano, cedida gentilmente por el Dr. Aloj (78). El control negativo se realizó con la misma línea celular pero transfectada con el plásmido vacío.

Brevemente, se sembraron aproximadamente 1.000.000 de células por pozo en fase de crecimiento exponencial, en placas de 6 pozos, y se dejaron crecer por 24 horas. Se retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS/1% BSA enfriado a 4°C. Para determinar y posteriormente sustraer la unión inespecífica (Unión específica = unión total – unión inespecífica), fueron bloqueados los 3 pozos inferiores con Gastrina I Humana (GIH, Sigma Aldrich) a una concentración final de 1 µM por pozo. El péptido radiomarcado fue agregado por triplicado para obtener una concentración final por pozo de 2,32 ηM (¹⁷⁷Lu-DOTA-cyclo-(Met)MG) y 1,4 ηM (¹⁷⁷Lu-DOTA-cyclo-(Nle)MG)), siendo 1,5 ml el volumen final por pozo. Las placas fueron incubadas por 2 horas a 37°C, con agitación suave a intervalos de 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS/1% BSA enfriado, 2 lavados con una solución de glicina 1M, y dos lavados con NaOH 1M, colectándose las 3 fracciones en forma separada (lavados con PBS/BSA, Glicina y NaOH). Se midieron las actividades (cpm) de cada una de las fracciones manualmente en un contador de pozo (modelo 2200, LUDLUM Measurements Inc.) de forma sistemática y consecutiva, tomando registros del fondo cada 3 muestras, y de un estándar cada 6. Se calcularon los límites de detección (L_D) y de cuantificación (L_C) del analito, como el promedio de 10 mediciones de fondo más 3 o 10 veces la desviación estándar (σ) de estas mismas mediciones (L_D = Fondo promedio + 3σ ; L_C = Fondo promedio + 10σ). Durante el procesamiento de los datos obtenidos, cada valor de fondo fue luego sustraído a las 3 mediciones previas (muestras).



El porcentaje de unión total específico ($\%AT_E$), es la suma de la fracción de actividad internalizada ($\% A_{In}$, fracciones de lisado celular con NaOH) y la fracción correspondiente a la actividad unida a la membrana celular ($\% A_M$, lavados con glicina), ambas fracciones expresadas como un porcentaje con respecto a la actividad total agregada a cada pozo ($AT_E = A_{In} + A_M$). Este porcentaje fue normalizado a la cantidad de proteínas celulares totales por pozo ($\%AT_E/\text{mg}$ de proteínas), determinado posteriormente por un kit disponible comercialmente basado en el método Bradford (Quick start Protein Assay, BioRad).

Los resultados fueron promediados ($n=3$) y se calculó su desviación estándar.

3.2- Resultados

3.2.1- Obtención de ^{177}Lu de elevada actividad específica

La A. E. de $^{177}\text{LuCl}_3$ obtenida al final del bombardeo en el RA-03 fue 32,36 Ci/mg de ^{176}Lu . La A. E. al momento de la marcación fue de 18,97 mCi/mg de ^{176}Lu . El blanco de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ fue disuelto el mismo día de la marcación con HCl concentrado (Suprapur[®], Merck), obteniendo una concentración de actividad de $^{177}\text{LuCl}_3$ de 2,8 mCi/ μl .

3.2.2- Control de Pureza Radioquímica

La PR luego de una hora de incubación fue de 99,1 % para ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Met)MG y de 93,8 % para el radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG.

Los tiempos de retención fueron de 11,5 y 11,1 min. para ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Met)MG y ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG respectivamente (Figura 16 y 17).

3.2.3- Ensayo de internalización

Se observó que las mediciones del fondo como del estándar se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo que tomó medir todas las muestras. El promedio del fondo ($n=10$) fue de 28,7 cpm (STD=8,09), y los L_D y L_C fueron de 52,9 y 109,6 respectivamente.

Se pudo observar un bloqueo efectivo por parte del péptido GIH.

Los porcentajes de unión específica ($\% AT_E/\text{mg}$) en la línea A431(CCK2R+) fueron similares para ambos radiopeptidos; 17,33 y 19,31 % para ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Met)MG y ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG respectivamente (Tabla 3).

La actividad unida en membrana fue menor al 1 % de la actividad total.

El control negativo, realizado en la línea celular A431(CCK2R-), arrojó valores cercanos al cero en lo que respecta a su $\% AT_E/\text{mg}$.



Capítulo 4

4.1- Discusión

Como se ha mostrado en el Capítulo 2, desde hace ya varios años muchos investigadores han volcado sus esfuerzos por encontrar un análogo de CCK/MG apropiado como radiofármaco para diagnóstico y terapia del cancer.

Se pueden distinguir dos enfoques en la búsqueda de los mejores análogos para la terapia de tumores que expresan el receptor CCK2R, los grupos de investigación que se centraron en diseñar péptidos basados en la estructura de minigastrina, cuya Tyr se encuentra en la posición 6 (contando desde el extremo C-terminal), y los que se volcaron a los derivados de CCK-8, cuya Tyr está ubicada en la posición 7 y que además posee dos Met en las posiciones 3 y 6 (Figura 8).

Nosotros evaluamos 4 derivados de minigastrina, dos análogos lineales, el DOTA-His₂-MG (APH070) y el DOTA-MG7 (Figura 13), y dos péptidos cíclicos, DOTA-ciclo-(Met)MG (o Cyclic-MG1) y DOTA-ciclo-(Nle)MG (o Cyclic-MG2), todos radiomarcados con ¹⁷⁷LuCl₃ de alta A.E producido de forma experimental en nuestro laboratorio.

La emergente elección del ¹⁷⁷Lu como radionucleído terapéutico en los países centrales se debe en gran parte a las ventajas de sus características radioquímicas frente a otros radionucleídos: posee emisiones β- con energía máxima de 497 Kev (78 %) con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando que lo hace adecuado para el tratamiento de tumores pequeños; sus fotones γ de 208 Kev (11%) son apropiados para la adquisición de imágenes *in vivo* y realizar estudios dosimétricos personalizados previos al tratamiento y el período de semidesintegración de 6,7 días permite la organización de un sistema adecuado de distribución, pudiendo llegar a servicios de Medicina Nuclear en lugares alejados (97). La otra fortaleza de este RN es que actualmente es producido bajo normas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) en dos continentes (98). Sin embargo la ventaja mas importante para nuestra región es su producción local (RA-03, CAE), que al evitar los costos de transporte y suponiendo el caso de industrializarse la producción, permitiría disminuir los costos de las dosis terapéuticas y posibilitaría el acceso de un mayor número de pacientes en Argentina y en países de la región, ya que algunos de estos países lo emplean rutinariamente.

Siguiendo el orden cronológico en que fueron realizados los ensayos en nuestro laboratorio, a continuación se discuten los resultados obtenidos.

El DOTA-His₂-MG (o APH070), seleccionado en el año 2007 por S. Mather a partir de una biblioteca peptídica, fue evaluado en nuestro laboratorio como parte del CRP “Development of therapeutic radiopharmaceutical base on ¹⁷⁷Lu for radionuclide therapy” (Research Contract ARG-14060, OIEA, 2009). Este decapeptido comparte idéntica secuencia a MG0 en los 8 aminoácidos del extremo carboxi-terminal, incluyendo la Met, pero tiene además dos histidina en la región N-terminal, entre el DOTA y el Glu (Tabla 1). Los resultados experimentales del radiopéptido ¹⁷⁷Lu-DOTA-His₂-MG mostraron una PR mayor al 94% para la A.E. de marcación mayor ensayada (0,1 mCi/ug de péptido), y una aparente oxidación de la metionina durante la marcación, observándose también un incremento del compuesto oxidado en los ensayos de estabilidad en suero humano. Esta fenómeno de oxidación de la metionina (Figura 11) se deduce a partir de los resultados de RP-HPLC, donde se observó un pico con un



tiempo de retención menor al del RF, que se incrementa a mayor tiempo de incubación del RF en SH, y que cuando se incrementa, disminuye proporcionalmente el pico del RF intacto (Figura 18). Para confirmar la oxidación se debería realizar un análisis por espectrometría de masas. Estos resultados son consistentes con los publicados más tarde por Ocak et al. (2011), en donde se observó un porcentaje menor al 10 % de radiopeptido oxidado para los 10 análogos de CCK/MG con metionina estudiados (89). Las BD, realizadas en ratones normales, mostraron una rápida depuración sanguínea y excreción renal. A partir del análisis dosimétrico en un modelo animal, realizado por el Grupo de Evaluaciones Dosimétricas y Radiobiológicas de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN), se estimaron las dosis para el hombre y la mujer de referencia según los métodos de extrapolación “escalación por tiempo” y “método directo”. Según los resultados obtenidos, el órgano crítico es el riñón, y la dosis que recibe este órgano según el método de “escalación por tiempo” son 2,06 cGy/mCi y 2,51 cGy/mCi para el hombre y la mujer adultos respectivamente. Estos resultados son consistentes con datos obtenidos experimentalmente para el ^{177}Lu -DOTA-TATE donde se establece que la dosis en riñón va de 3,7- 8,14 cGy/mCi (99).

Los valores de dosis calculados mediante el método de extrapolación directa resultaron ser significativamente más pequeños (0.73 y 0.80 cGy/mCi para hombre y mujer adultos respectivamente) que los hallados mediante el método de escalación por tiempo. Además de que las dosis halladas por el método de escalación por tiempo son consistentes con otro estudio, resultaron ser más conservativas que las halladas con el método directo, por lo tanto se decidió hacer uso de éstas para el cálculo de la actividad máxima tolerable (AMT). Por último, la AMT que podría ser inyectada sin producir radiotoxicidad en riñones, es 13,2 mCi/kg para hombre adulto y 14,0 mCi/kg para mujer adulta. Aunque la oxidación de la metionina al parecer no afecta la complejación con el ^{177}Lu , se sabe que está asociada a una disminución de la actividad biológica del péptido, por lo tanto se concluyó que estos resultados lo hacen inadecuado para la aplicación clínica.

En el año 2011, gracias a la beca “Jorge Oster” otorgada por la Fundación Bunge y Born, sintetizamos y radiomarcamos dos nuevos análogos, DOTA-MG6 y DOTA-MG7, en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital-Universitario de la Universidad de Innsbruck (Austria) bajo la dirección de Roland Haubner, Elisabeth von Guggenberg y Clemens Decristoforo. La síntesis peptídica en fase sólida y las primeras marcaciones de DOTA-MG7 con ^{111}In y ^{68}Ga fueron realizadas en los laboratorios de Innsbruck. Posteriormente, gracias a la donación del Dr. Decristoforo, este análogo fue radiomarcado en nuestro laboratorio con ^{177}Lu de producción local (RA-03, CAE). El péptido MG7 consta de 8 aa y su secuencia está basada en MG0, aunque tiene 3 sustituciones: la Tyr en posición 6 fue sustituida por D-Tyr, el Trp (posición 4) por D-Trp, y la Phe del extremo carboxi-terminal por 1Na. La PR del ^{177}Lu -DOTA-MG7 fue mayor al 90%, sin embargo este compuesto no se internalizó en la línea celular A431-CCK2R, posiblemente a causa de la sustitución del residuo Tyr por D-Tyr. El resultado de este ensayo, realizado por primera vez en nuestro laboratorio, concuerda con lo observado en los laboratorios de Innsbruck. Un estudio de estabilidad *in vivo* de estos compuestos (MG6 y MG7) podría dar alguna respuesta sobre si la sustitución de la Phe por un aa no natural (1Na) podría evitar el clivaje por parte de las peptidasas en el sitio de corte común observado (entre el residuo Asp y Phe), y aumentar así tiempo de vida media del radiopéptido intacto (89).



Los últimos análogos de MG evaluados en nuestro laboratorio fueron el ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Met)MG y el ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG (von Guggenberg et al.). Como en los péptidos anteriores evaluados, su estructura también se basa en MG0, pero a diferencia de estos, los cyclic-MG1 y cyclic-MG2 son compuestos cíclicos. La ciclación fue realizada reemplazando el residuo Gly (posición 9) por una D-Lys, la cual se unió con el residuo D-Glu (en posición 1) a través de un enlace amida interno. Estos compuestos cíclicos se diferencian únicamente en la sustitución de la Met por la Nle.

Como se mencionó en el Capítulo 1.3.4, un radiofármaco de PRRT debe alcanzar una elevada A.E. de marcación así como también del radionucleído, que en este nuestro caso es el ^{177}Lu . La optimización de la A.E. del ^{177}Lu depende de varios parámetros, como los ciclos de irradiación (1, 2 o 3 ciclos), el enriquecimiento del blanco utilizado, la posición de irradiación y la potencia del reactor durante el ciclo de irradiación (1 ciclo equivale a 4 días). La A.E. máxima obtenida hasta el momento (41,46 Ci/mg de ^{176}Lu) fue irradiando los blancos (82% de ^{176}Lu) durante 3 ciclos, en la posición de mayor flujo de neutrones (aprox. $1,3 \cdot 10^{14}$ n/cm²·seg⁻¹) del Reactor RA-3 (también conocida como “trampa de neutrones”). La A.E. del Lutecio-177 utilizado para la marcación de los compuestos cíclicos fue 32,36 mCi/μg de ^{176}Lu al momento final del bombardeo y 18,97 mCi/μg de ^{176}Lu al momento de la marcación. La pregunta ahora es ¿Es adecuada esta A.E. del ^{177}Lu para la PRRT? Considerando que existen dos productores industriales de Lu-177 de alta A.E. específica bajo normas GMP, uno en América (Missouri University Research Reactor, Estados Unidos) con A.E. > 23 mCi/μg y otro en Europa (IDB Holland, Holanda), con A.E. de 20 mCi/μg, y teniendo en cuenta que el tiempo promedio de entrega desde los centros de producción a nuestro país es de aproximadamente 1 semana (tiempo similar a su periodo de semidesintegración), podemos inferir que la A.E. del ^{177}Lu importado al momento de su uso en Buenos Aires es de 11.5 y 10 mCi/μg respectivamente (98). Ambas son inferiores a la A.E. del ^{177}Lu obtenido a nivel local en forma experimental al momento de uso (18,97 mCi/μg de ^{176}Lu). Esta diferencia en A.E. constituye una ventaja crucial a la hora de encarar la marcación de DOTA-péptidos para el tratamiento del cáncer en la región.

La A.E. de la marcación de ^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Met)MG y ^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Nle)MG fue de 0,067 mCi/μg de péptido. Se deberá optimizar el método de marcación si es necesario para elevar la A.E. a un valor apropiado para el uso clínico (el ^{177}Lu -DOTA-TATE se aplica a pacientes con una A.E. entre 0,8-1,0 mCi/μg de péptido) (100).

La purezas radioquímicas fueron mayores al 90% para ambos radiopéptidos (99,1% para ^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Met)MG y 93,8% para ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG). Los TR fueron similares, 11,5 min (ciclo-(Met)MG) y 11,1 min (ciclo-(Nle)MG) (Figuras 16 y 17). A pesar de que los cromatogramas no permiten una cuantificación de su PR, si se puede observar un resultado que concuerda con los obtenidos por SepPak C18.

La elección del modelo experimental biológico es clave para la evaluación de los radiofármacos basados en biomoléculas. Tal es el caso de los péptidos cíclicos evaluados por el grupo de Innsbruck, donde la elección del modelo animal tumorado con la línea celular AR4-2J casi falla en detectar el tumor, en cambio el modelo basado en la línea celular A431(CCK2R+) tuvo mayor éxito (86).

Las concentraciones de los radiofármacos en el ensayo de internalización no fueron iguales, 2,3 ηM (^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Met)MG) y 1,4 ηM (^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG), sin embargo ambas fueron menores a 10 ηM, que es la concentración de referencia (71). Se puede observar un alto porcentaje de internalización, 17,33 % (Met)



y 19,31 % (Nle), concordante con los resultados publicados previamente para el análogo DOTA-(Met)MG marcado con Indio-111 (^{111}In -DOTA-cyclic-MG1; 60 min. de incubación; 20 % A/mg de proteínas) (71). De forma similar a lo publicado en el mismo trabajo, la actividad asociada a membrana fue menor al 1 % y casi el total de la actividad unida se debió a la internalización del radiofármaco, lo que deja en evidencia la importancia de la internalización de los radiopeptidos.

Ahora bien, a pesar de que los primeros resultados fueron favorables para estos análogos, ¿Qué otros ensayos serían de utilidad para la evaluación pre-clínica de los radiopeptidos? Como se menciona en el trabajo de Ocak et al. sobre la estabilidad biológica de 12 análogos de CCK/MG, los estudios *in vitro* no permiten estimar el comportamiento real *in vivo* del RF, al menos por sí solos (89). De hecho, ninguno de los resultados de estabilidad en SH y en homogenatos de hígado y riñón de ratón pudieron predecir la ausencia de péptido intacto en orina luego de 10 min post inyección en ratones. En cambio, las BD dan información real sobre el comportamiento *in vivo* en el modelo animal, permitiendo observar la acumulación o eliminación del RF en cada órgano y/o tejido; y si se llevan a cabo en ratones portadores de tumores pueden dar cuenta de las relaciones de tumor/fondo y tumor/riñón.

Por otra parte, el análisis dosimétrico en un modelo animal es de vital importancia ya que permite extrapolar estas dosis a un modelo humano (hombre y mujer de referencia) y estimar la MAT según el órgano crítico, lo cual es determinante para establecer un esquema de tratamiento. En este punto cabe aclarar que existen estrategias eficaces que permiten disminuir la dosis en riñones (órgano crítico) y aumentar así la MAT, como es el caso de la administración previa de arginina (30).

Por último, los estudios de eficacia terapéutica en ratones portadores de tumores que expresen el receptor específico (en este caso CCK2R), son los que definen el alcance de este tratamiento en el modelo tumoral. Para ello, es necesario contar con un equipo que permita obtener imágenes *in vivo* como un micro-PET o nano-SPECT/CT.

4.2- Conclusión

En los últimos años hemos evaluado 4 péptidos análogos de Minigastrina radiomarcados con ^{177}Lu de potencial aplicación a PRRT.

Es de suma importancia destacar, que por primera vez a nivel internacional, se realizaron en nuestro laboratorio los ensayos de internalización de ^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Met)MG y ^{177}Lu -DOTA-cyclo-(Nle)MG en la línea celular A431 que expresa el receptor CCK2R humano con resultados promisorios.

La implementación de este ensayo constituye un aporte considerable en el desarrollo de radiofármacos de CCK/Minigastrina basados en ^{177}Lu para PRRT.

4.3- Agradecimientos

Al Dr. José Luis Crudo y la Lic. Noemí Nevares por la paciencia y dedicación.

A Sandra Siri, Karina Socolovsci, docentes y personal del Instituto Dan Beninson.

La realización de estos ensayos fue posible, en parte, a la colaboración del OIEA y la Fundación Bunge y Born por el otorgamiento de la beca “Jorge Oster”. A los colegas C. Decristoforo, E. von Guggenberg y R. Haubner, de la Universidad de Innsbruck, por la



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

buena predisposición y por donarnos gentilmente los péptidos estudiados, al Dr. Aloj por cedernos la línea celular A431(CCK2R) y a Severino Michelin del ARN por su colaboración en el mantenimiento y cultivo de las líneas celulares.



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

4.4- Anexos:

4.4.1 Figuras y tablas.

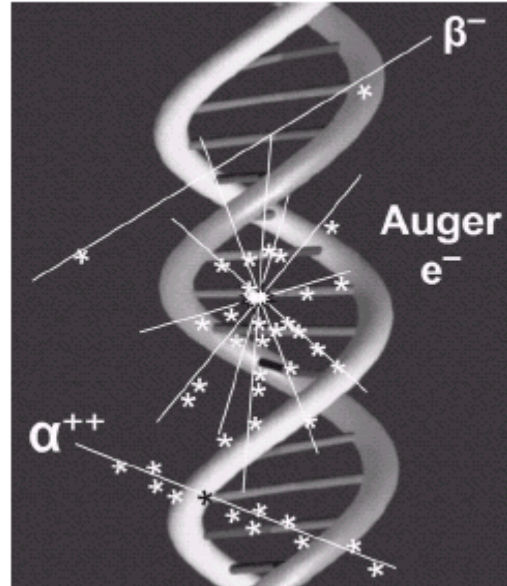
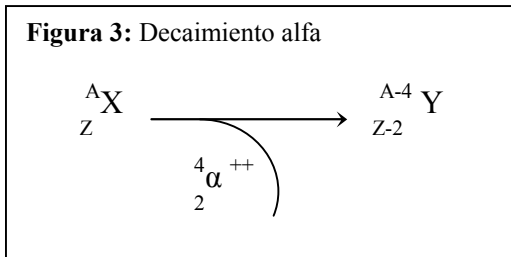
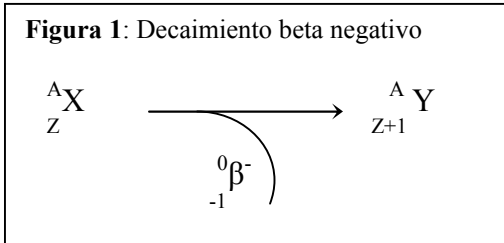


Figura 2: Densidad local de ionización producida por las partículas α , β^- y electrones Auger. (Extraído de: J. Nucl. Med. 2005;46:4S-12S.)

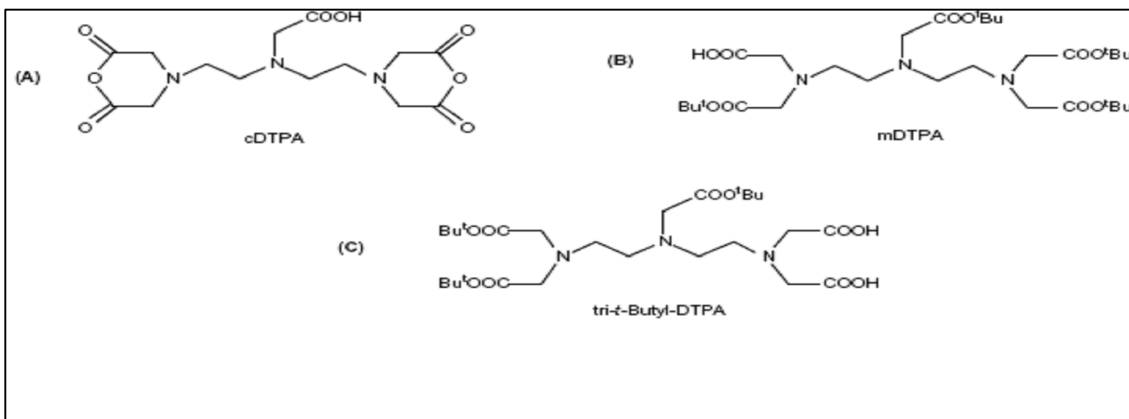


Figura 4: Derivados de DTPA para la complejación a biomoléculas. Extraído de: Current Medicinal Chemistry 2000;7:971-994.

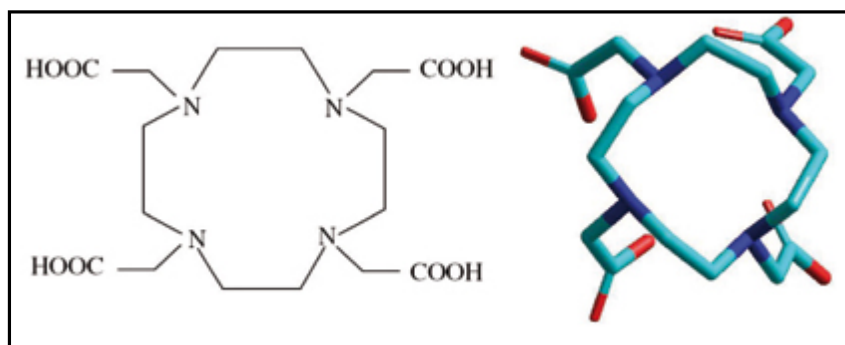


Figura 5: Estructura química y representación 3D de el agente quelante DOTA, extraído de PDB código 1NC4 (Corneillie, Fischer, Meares, 2003). En la representación 3D los átomos de carbono se muestran en celeste, los de nitrógeno en azul y los de oxígeno en rojo.

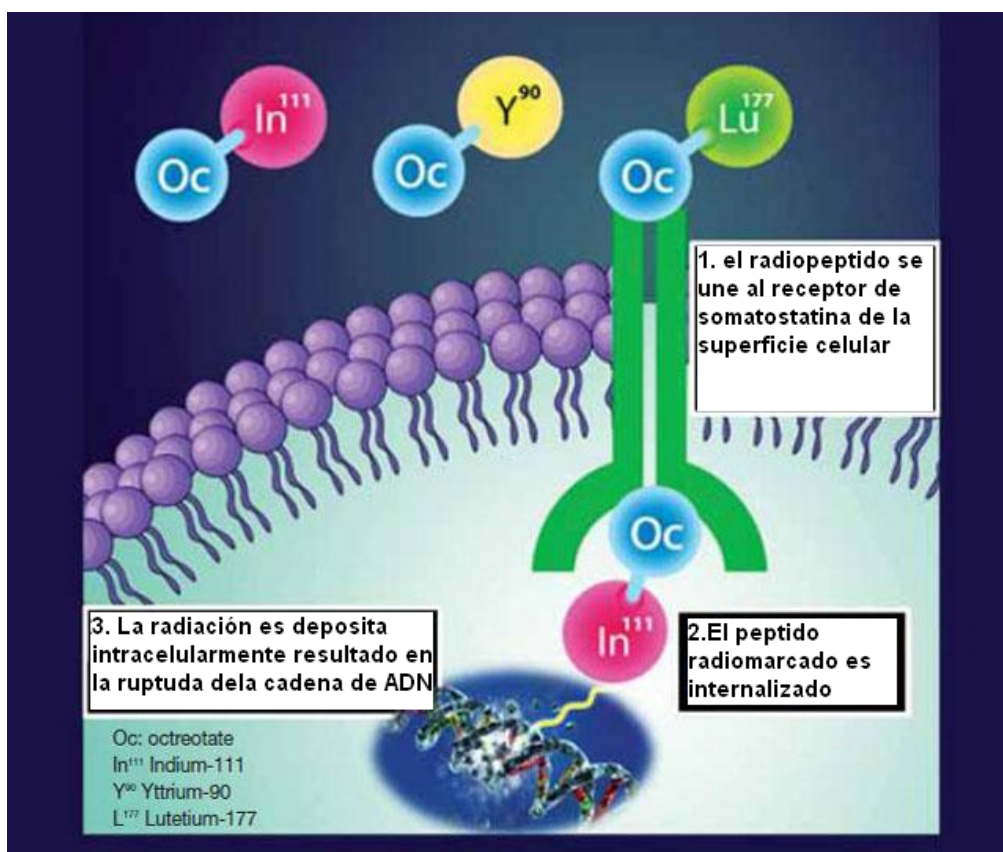


Figura 6: Esquema del mecanismo de acción de la PRRT para análogos de somatostatina.

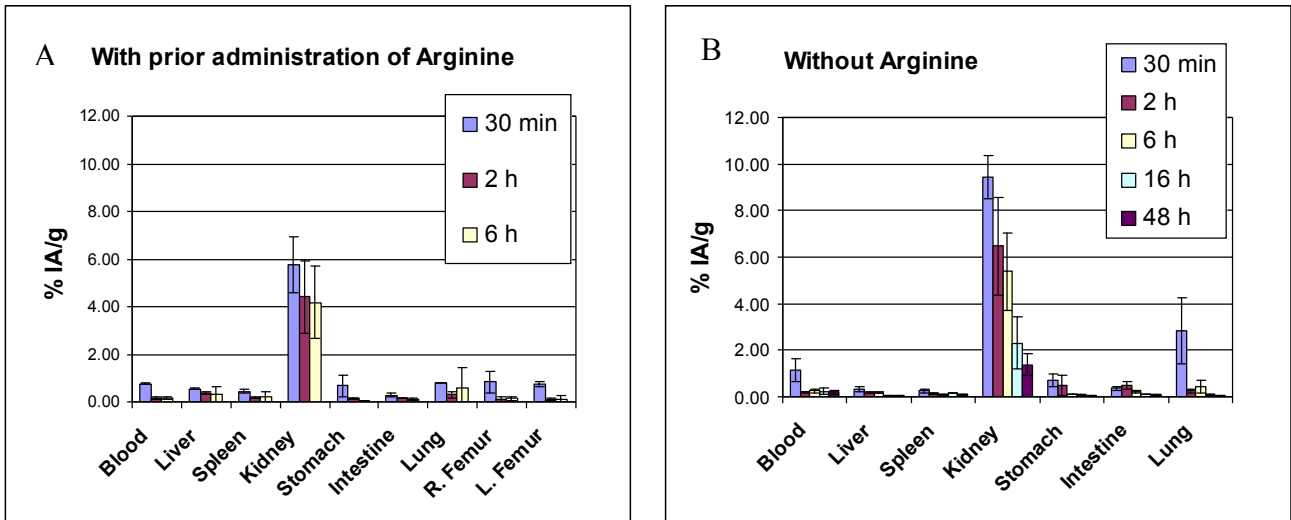


Figura 7: Biodistribuciones de ^{177}Lu -DOTA-SP con (A) y sin (B) administración previa de arginina. Se observa una reducción de la AI/g en riñones.

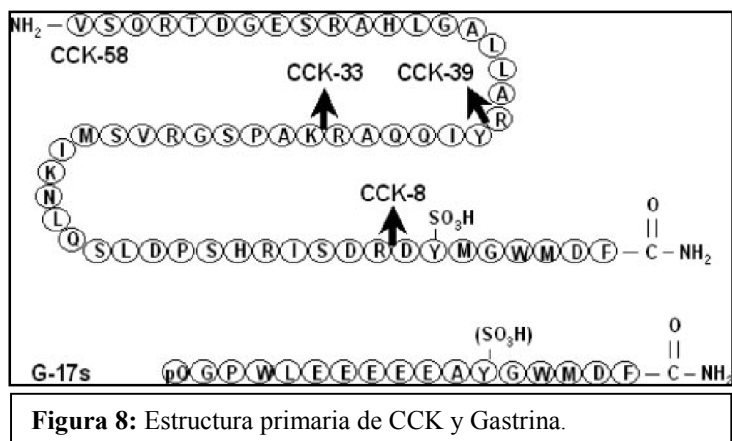


Figura 8: Estructura primaria de CCK y Gastrina.

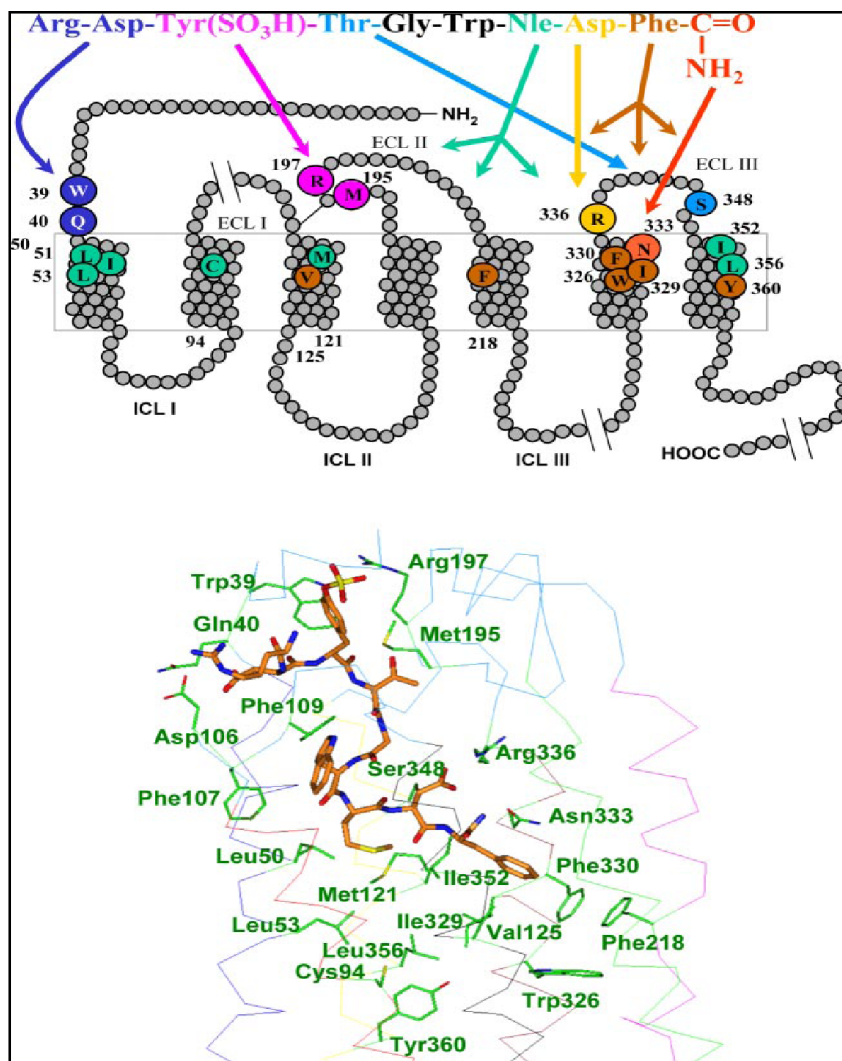


Figura 9: Representación de la interacción del receptor CCK1R con los aminoácidos de CCK involucrado en el sitio de unión (arriba) y vista de la interacción en un modelo tridimensional (abajo). En verde se muestran los aminoácidos del CCK1R que interaccionan con el sitio de unión del ligando, representado en naranja.

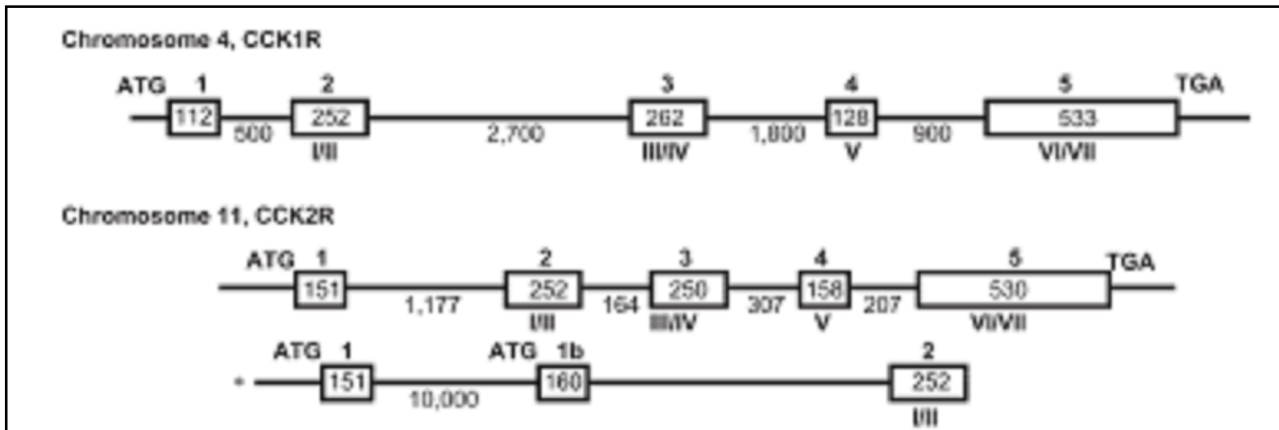


Figura 10: Representación esquemática de los genes que codifican los receptores CCKR. Los números arábigos indican el número de nucleótidos en los intrones y exones. Los números romanos indican el número de dominio transmembrana codificado en los diferentes axones.

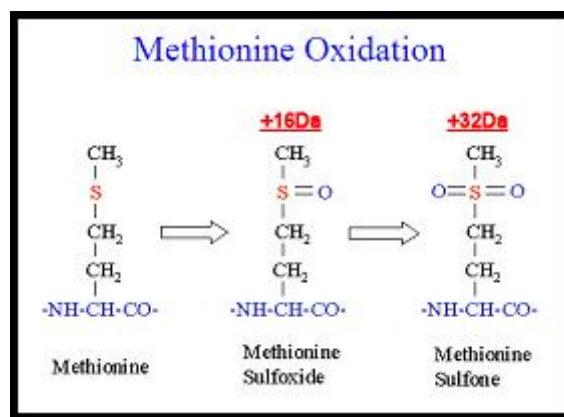


Figura 11: vista esquemática de los posibles productos de oxidación de la metionina.

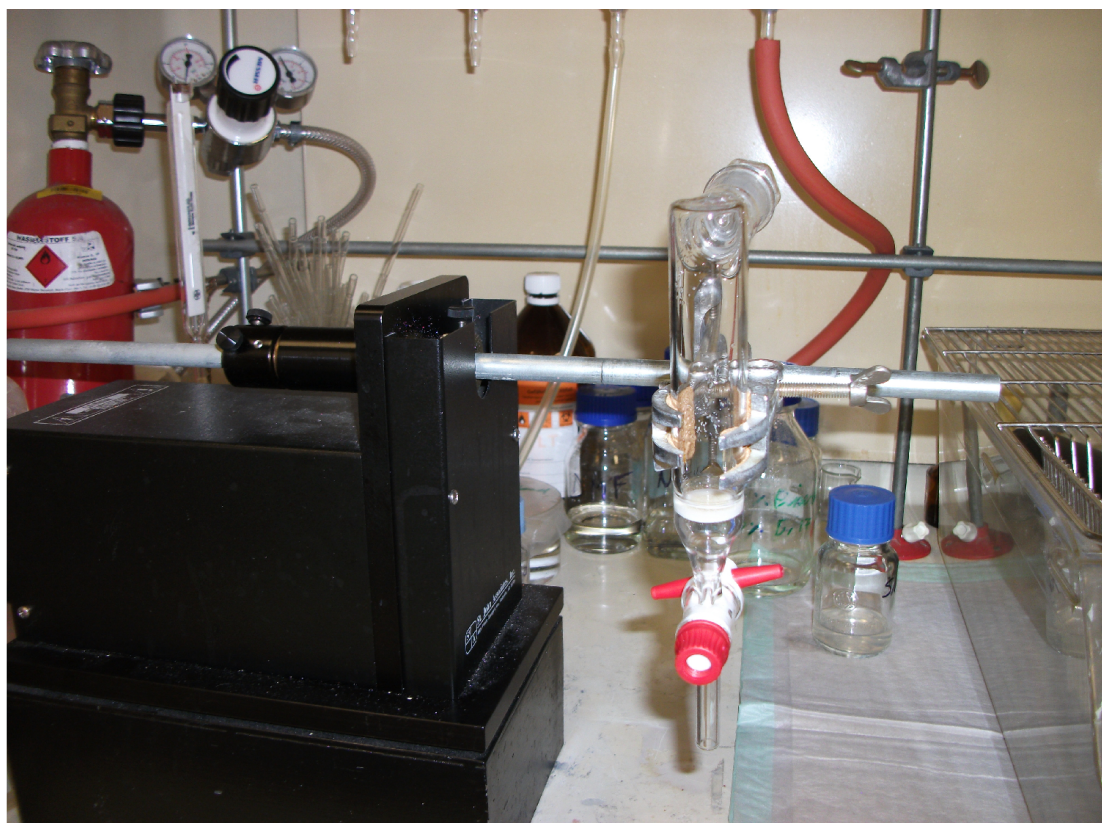


Figura 12: Equipo para síntesis peptídica en fase sólida.

DOTA-D-Glu- (Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	DOTA MG0	2112,5 Da
DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	DOTA-His ₂ -MG	1677,8 Da
DOTA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-D-Trp-Met-Asp-1Nal-NH ₂	DOTA-MG6	1453,6 Da
DOTA-D-Glu-Ala-D-Tyr-Gly-D-Trp-Met-Asp-1Nal-NH ₂	DOTA-MG7	1453,6 Da

Figura 13: Secuencia aminoacídica de DOTA-MG6 y DOTA-MG7 (Azul), DOTA-MG0 y DOTA-His₂-MG (APH070).

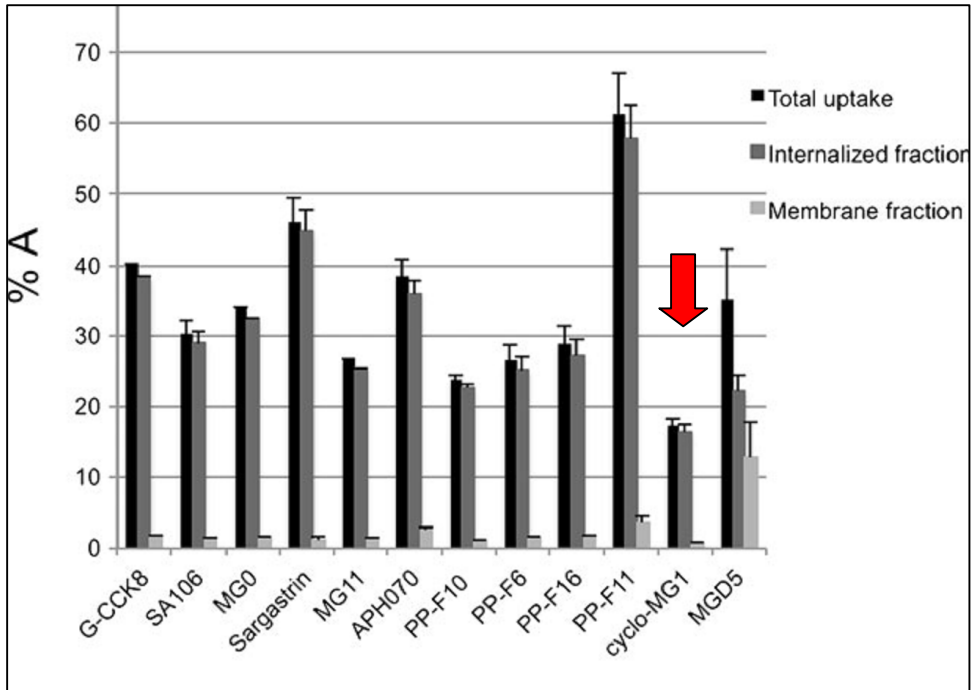


Figura 14: Comparación de la actividad asociada a las células (fracción internalizada y unida a membrana), expresadas como porcentaje con respecto a la actividad total agregada (%A) para 12 análogos de CCK/MG (73).

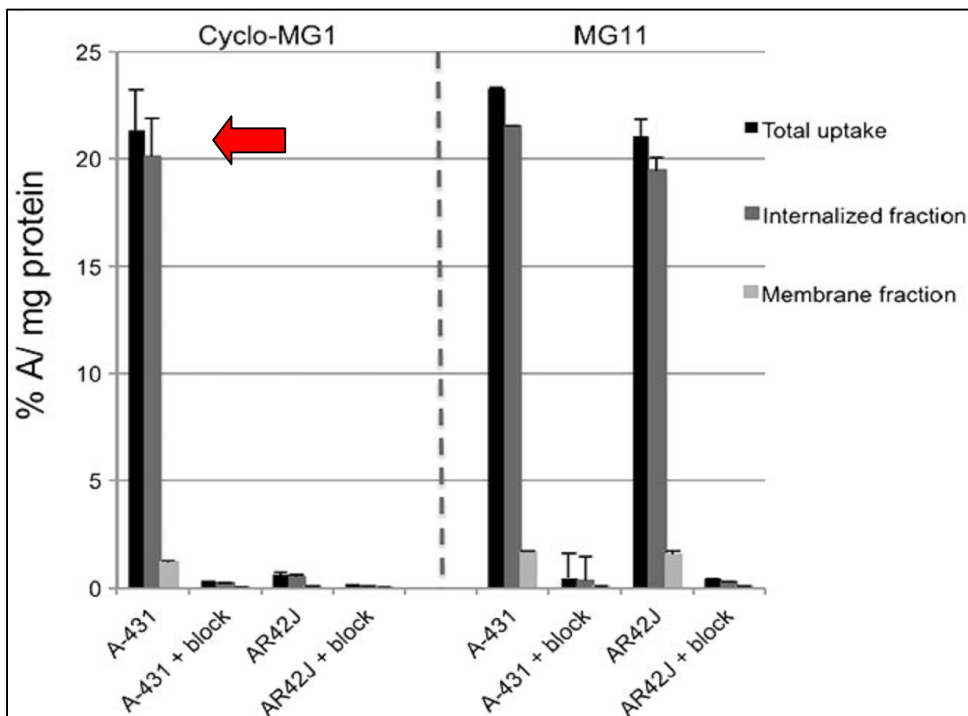


Figura 15: Comparación de la actividad asociada a las células, expresadas como porcentaje con respecto a la actividad total agregada por mg de proteínas (%A/mg) para el compuesto ^{111}In -DOTA-Cyclo-MG1 y ^{111}In -DOTA-MG11 en dos líneas celulares (A431-CCK2R+ y AR4-2J (73))

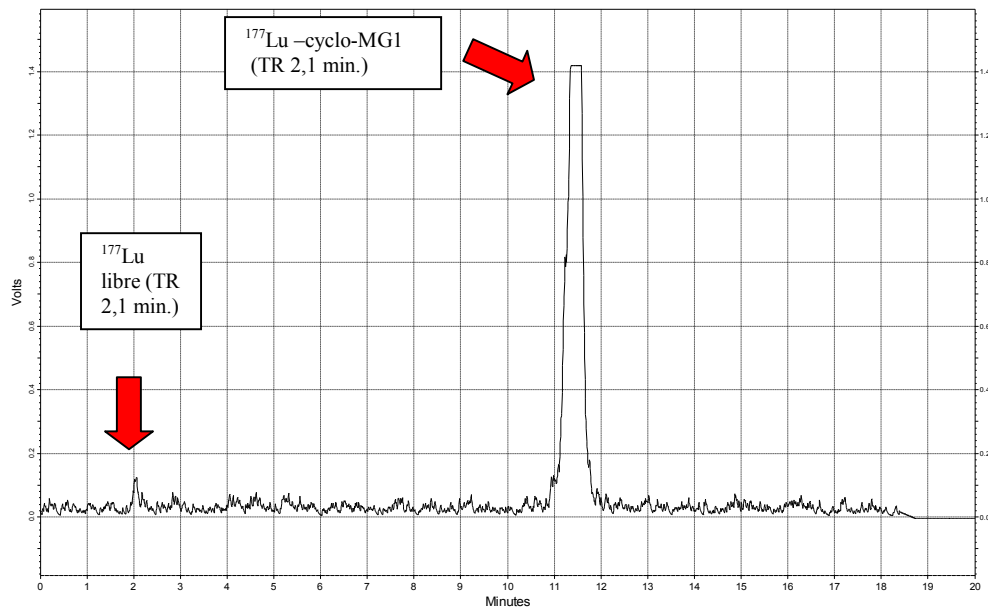


Figura 16: Resultados de PR (RP-HPLC) ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Met)MG (cyclo-MG1), $\text{TR}_1 = 2,1 \text{ min.}$; $\text{TR}_2 = 11,4 \text{ min}$

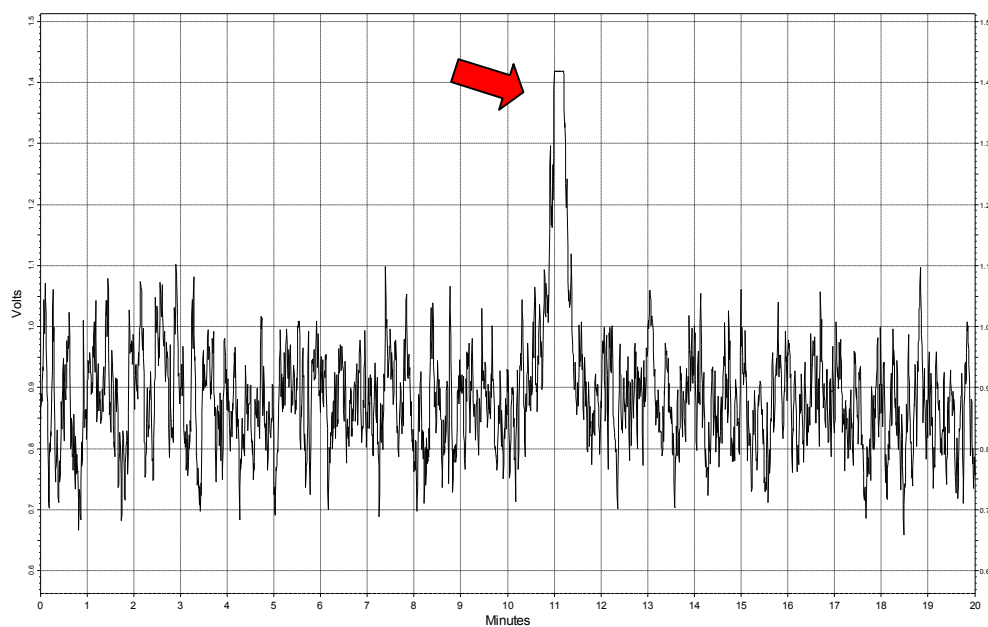


Figura 17: Resultados de PR (RP-HPLC) ^{177}Lu -DOTA-ciclo-(Nle)MG (cyclo-MG1), $\text{TR}_1 = 11,12 \text{ min.}$;



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

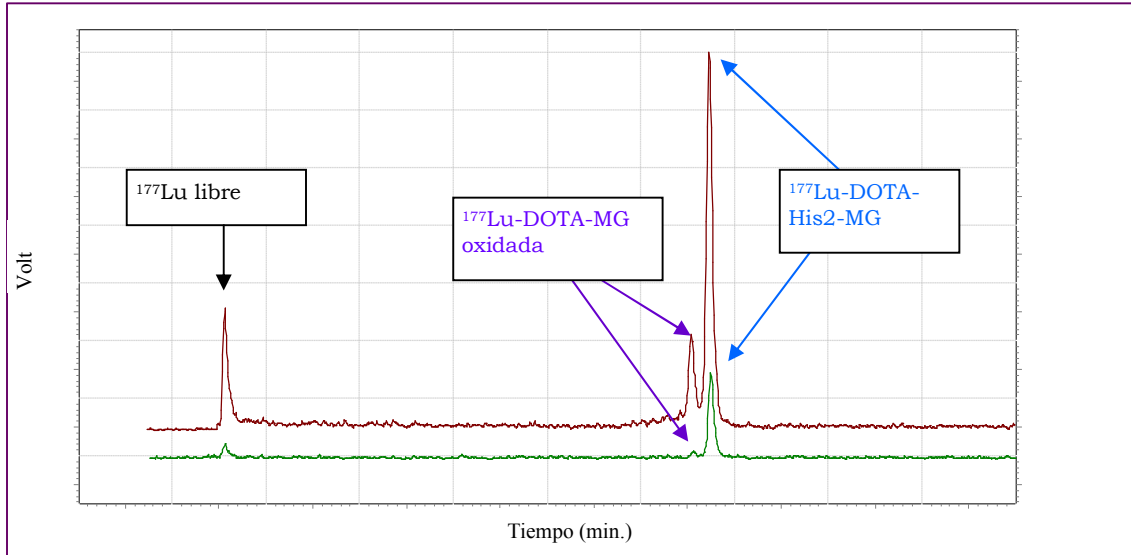


Figura 18: Resultados de PR (RP-HPLC) de ^{177}Lu -DOTA-His2-MG, (A.e. 0.066 mCi/ug de péptido). En verde, se observa una PR post marcación mayor a 90%, en rojo la PR a 24 hs. post marcación fue mayor a 83%, (condiciones de estabilidad: SF y temp. Ambiente). Los picos correspondientes a ^{177}Lu -DOTA-MG oxidada (flechas violeta) son de 3.62% para el verde y de 15.24

Tabla 1: Nombre, secuencia aminoacídica, peso molecular y referencias de los 12 análogos de CCK/MG seleccionados para la evaluación comparativa (COST Action BM0607)

Nombre	Secuencia	Peso Molecular	Referencia
G-CCK8	DOTA-Gly-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1507,0	78
SA106	DOTA-DAsp-Phe(p-CH ₂ SO ₃ H)-HPG-Gly-Trp-HPG-Asp-Phe-NH ₂	1482,6	80
MG0	DOTA-DGlu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ .	2037,0	48
Sargastrin	DOTA-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂	2483,6	92
MG11	DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1531,0	85
APH070	DOTA-His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1677,8	83
PP-F10	DOTA-DGln-DGln-DGln-DGln-DGln-DGln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	2042,9	91
PP-F6	DOTA-DGln-DGln-DGln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1658,7	91
PP-F16	DOTA-DGln-DGlu-DGln-DGlu-DGln-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	2045,9	--
PP-F11	DOTA-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	2048,8	--
Cyclo-MG1	DOTA-cyclo[γ -DGlu-Ala-Tyr-DLys]-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1455,7	88
MGD5	DOTA-Gly-Ser-Cys-(Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂) ₂	2782,9	90



Tabla 2: Procedimiento general de síntesis manual de péptidos en fase sólida.

N°	Paso	Función
1	Introducción de la resina sólida (RinK amide MBHA resin, Merckshuchardt OHG) en el reactor de síntesis manual.	La resina posee grupos aminos libres donde se inicia la síntesis. Esta da como producto final un péptido con un grupo amida en su C-ter.
2	Lavado con DMF por 10 minutos	Rehidratar la resina.
3	Lavado con piperidina al 20% en DMF por 5 minutos	Remover los Fmoc, que son los grupos protectores en los N-terminales de los aminoácidos.
4	Lavado con piperidina al 20% en DMF por 15 minutos.,	Completar la remoción de los Fmoc
5	6 lavados con NMP por 3 minutos.	Eliminar los Fmoc libres del medio de reacción
6	Reacción por 30 minutos con reactivos HATU, HoAt, DIPEA , NPM y el nuevo aminoácido	Activación del grupo carboxilo del aminoácido a acoplar (HoAT y HATU) y síntesis del nuevo enlace peptídico. La DIPEA es para ajustar el pH.
7	6 lavados con NMP por 3 minutos	Eliminar los aminoácidos libres, los reactivos y los productos de reacción no deseados.
8	2 lavados con DCM por 3 minutos,	Secar la resina. Este paso solo se realiza cuando se desea interrumpir la síntesis.

Tabla 3: Resultados del ensayo de internalización expresados como el promedio del % de unión total específica por mg de proteínas.

% AT _E /mg		
	¹⁷⁷ Lu-DOTA-cyclo-(Met)MG	¹⁷⁷ Lu-DOTA-cyclo-(Nle)MG
A431(CCKR2+)	17,33± 0,64	19,31± 0,31
A431(CCKR2-)	0,38±0,30	- 0,09± 0,45



4.5- Referencias Bibliográficas:

- 1 - Langer M., Beck-Sickinger A. G., Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2001;1:71-93.
- 2 - Krenning E. P., Bakker W. H., Breeman W. A., Koper J. W., Kooij P. P., Ausema L., et al. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet*. 1989;1:242-244.
- 3 - Otte A., Mueller-Brand J., Dellas S., Nitzsche E. U., Herrmann R., Maecke H. R., Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet*. 1998;351:417-418.
- 4 - Petrucci R. H., Harwood W. S., Herring F. G. *General Chemistry*, 8th ed., Prentice-Hall 2002, p. 1025-26.
- 5 - Kassis A. I., Adelstein S. J. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med*. 2005;46:4S-12S.
- 6 - Farmacopea Nacional Argentina, 2003
- 7 - Kowalsky, R. J.; Falen, S. W.; *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*; American Pharmacist Association DC, 2004; pp. 256-277.
- 8 - Mahmood, A.; Jones, A. G.; in *Handbook of Radiopharmaceuticals*; Welch, M. J.; Redvanly, C. S. eds.; John Wiley & Sons; England, 2003; pp. 323-362
- 9 - Tisato, F.; Bolzati, C.; Porchia, M.; Refosco, F.; *Mass Spectrometry Reviews*; 2004, 23,309
- 10 - Brechbiel M. W. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q. J. Med. Mol. Imaging* 2008;52:166-173.
- 11 - Pritchard J. H., Ackerman M., Tubis M., Blahd W. H., Indium-111-labeled antibody heavy metal chelate conjugates: a potential alternative to radioiodination. *Proc. Soc. Expt. Biol Med* 1976;151:297-302.
- 12 - Meares C. F., Wensel T. G. Metal chelates as probes of biological systems. *Acc. Chem Res*. 1984; 17:202-209
- 13 - Brechbiel M. W., Gansow O. A., Atcher R. W., Schlom J., Esteban J., Simpson D. E., Colcher D. Synthesis of 1-(p-Isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studies. *Inorg. Chem*. 1986; 220:613-615.
- 14 - Lamberts S., Bakker W., Reubi J. C. Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N. Engl. J. Med*. 1990;323:1073-1077
- 15 - Bakker W. H., Krenning E. P., Breeman W. A. P., Koper J. W., Kooij P. P. M., Reubi J. C., Klijn J. G., Visser T. J., Docter R., and Lamberts S. W. J. Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity and in vivo application in animals. *J. Nucl. Med*. 1990;31:1501-1509
- 16 - Bakker W. H., Albert R., Bruns C., Breeman W.A.P., Hofland L. J., Marbach P., Pless J., Pralet D., Stolz B., Koper J. W., Lamberts S. W. J., Visser T. J., and Krenning E. P. Chapter 4: [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci*. 1991;49:1583-1591
- 17 - Krenning E.P., Kwkkeboom D. J., Bakker W. H., Breeman W. A. P., Kooij P. P. M., Oei H. Y., Van Hagen M., Postema P. T. E., De Jong M., Reubi J. C., Visser T. J., Reijs A. E. M., Hofland L. J., Koper J. W., and Lamberts S. W. J. Somatostatin receptor



scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 1993;20:716-731

18 - Laverman P., Sosabowski J. K., Boerman O. C., Oyen W. J. G. Radiolabelled peptides for oncological diagnosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39(suppl 1):S78-S92.

19 - Reubi J. C. Peptide Receptor as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews* 2003;24(4):389-427

20 - Okarvi S. M., Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancer and other diseases. *Med Res. Rev.* 2004;24:357-397.

21 - Van Den Bossche B., Van de Wiele C., Receptor imaging in oncology by means of nuclear medicine: current status. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1: 67S-75S

22 - Reubi J. C., Macke H. R., Krenning E. P. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med.* 2005;46 suppl 1:67S-75S.

23 - Mariani G., Erba P. A., Signore A. Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs. *J Nucl Med.* 2006;47:1904-1907.

24 - Fani M., Maecke H. R., Okarvi S. M. Radiolabeled peptides: Valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* 2012;2(5):481-501.

25 - Teunissen J. J., Kwakkeboom D. J., de Jong M., Esser J. P., Valkema R., Krenning E. P. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19:595-616.

26 - Virgolini I., Traub T., Novotny C., Leimer M., Fuger B., Li S. R., et al. New trends in peptide receptor radioligands. *Q J Nucl Med.* 2001;45:153-159.

27 - Valkema R., Pauwels S. A., Kvols L. K., Kwakkeboom D. J., Jamar F., de Jong M., et al. Long-term follow-up of renal functions after peptide receptor radiation therapy with ⁹⁰Y-DOTA₀Tyr₃-octreotide and ¹⁷⁷Lu-DOTA₀Tyr₃-octreotate. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1:83S-91S.

28 - Rolleman E. J., Valkema R., de Jong M., Kooij P. P., Krenning E. P., Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur. J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;30:9-15.

29 - Crudo J., Nevares N., Zapata A., López Bularte A., Perez J., Zaretzky A. [Poster]. Disminución de la captación renal de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Substance P en ratones normales por arginina. XXIII Congreso ALASBIMN, Porto Galinhas, Brasil. 28/09–01/10 del 2011. *Alasbimn Journal* 14, (54), October 2011, Radiofarmacia, resumen 31.

30 - Puerta N., Rojo A., Crudo J. L., Zapata A., Nevares N., López Bularte A. C., Perez J., Zaretzky A. Internal Dose Assessment of ¹⁷⁷Lu-DOTA-SP for Quantification of Arginine Renal Protection Effect. 13th International Congress of the International Radiation Protection Association. IRPA 13, Glasgow, Escocia. 14-18 de Mayo 2012.

31 - Rolleman E. J., Forrer F., Bernard B., Bijster M., Valkema R., et al. Amifostine protects rat kidneys during peptide radionuclide therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTA₀Tyr₃-octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;34:763-771.

32 - Vegt E., Wetzels J. F., Russel F. G., Maseereuw R., Boerman O. C., van Eerd J. E., et al. Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin, *J Nucl Med.* 2006;47:432-436.

33 - Van Eerd J. E., Vegt E., Wetzels J. F., Russel F. G., Maseereuw R., Corstens F. H., et al. Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of ¹¹¹In-octreotide in mice and rats. *J Nucl Med.* 2006;47:528-533.



-
- 34 - Nock B. A., Maina T., Krenning E. P., de Jong M. "To serve and protect": Enzyme Inhibitors as Radiopeptide Escorts promote Tumor Targeting. *J Nucl Med.* 2014;55(1):121-127.(ex 99)
- 35 - Ivy A. C., Oldberg E. A hormone reaction for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.* 1928;86:599-613.
- 36 - Mutt V., Jorpes J. E. Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1.cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur. J. Biochem.* 1968;6:156-162
- 37 - Tracy H. J., Gregory R. A. Physiological properties of a series of synthetic peptides structurally related to gastrin I. *Nature* 1964;204:935-938.
- 38 - Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, and Wang T. The gastrins: their production and biological activities. *Annu Rev Physiol* 2001;63:119–139.
- 39 - Rehfeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev* 1998;78: 1087–1108.
- 40 - Takahashi Y, Kato K, Hayashizaki Y, Wakabayashi T, Ohtsuka E, Matsuki S, Ikehara M, and Matsubara K. Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 1931–1935.
- 41 - Wiborg O, Berglund L, Boel E, Norris F, Norris K, Rehfeld JF, Marcker KA, and Vuust J. Structure of a human gastrin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1067–1069 .
- 42 - Dufresne M., Seva C., Fourmy D. Cholecystokinin and Gastrin receptors. *Physiol. Rev.* 2006;86:805-847.
- 43 - Noble F., Wank S. A., Crawley J. N., Bradwejn J., Seroogy K. B., Hamon M., et al. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol. Rev.* 1999; 51:745-781.
- 44 - Noble F., Roques B. P. CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog. Neurobiol.* 1999;58:349-379.
- 45 - Behr T. M., Jenner N., Radetzky S., B  h   M., Gratz s., Yucekent S., et al. Targeting of Cholecystokinin-B/Gastrin receptor in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled Gastrin. *Eur J Nucl Med* 1998;25:424-430.
- 46 - Sankaran H., Goldfine I. D., Deveney C. W., Wong K. Y., Williams J. A. Binding of Cholecystokinin to high-affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem.* 1980;255:1849-1853.
- 47 - Wettschureck N., Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1159-11204.
- 48 - Fourmy D., Lopez P., Poirot S., Jimenez J., Dufresne M., Moroder L., Powers S. P., and Vaysse N. A new probe for affinity labeling pancreatic cholecystokinin receptor with minor modification of its structure. *Eur J Biochem* 1989;185: 397–403.
- 49 - Pearson R. K., Miller L. J., Hadac E. M., and Powers S. P. Analysis of the carbohydrate composition of the pancreatic plasmalemmal glycoprotein affinity labeled by short probes for the cholecystokinin receptor. *J Biol Chem* 1987;262: 13850–13856.
- 50 - Huppi K., Siwarski D., Pisegna J. R., and Wank S. Chromosomal localization of the gastric and brain receptors for cholecystokinin (CCKAR and CCKBR) in human and mouse. *Genomics* 1995;25: 727–729



- 51 - Innis R. B., Snyder S. H. Distinct Cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:6917-6921.
- 52 - Hellmich M. R., Rui X. L., Hellmich H. L., Fleming R. Y., Evers B.M., Townsend Jr C. M. Human colorectal cancers express a constitutively active Cholecystokinin-B/Gastrin receptor that stimulates cell growth. *J Biol Chem*. 200;275:32122-32128.
- 53 - Overington J. P., Bissan A. Hopkins A. L. How many drug targets are there. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(12):993-996.
- 54 - Behr T. M., Jenner N., Béhé M., Angerstein C., Gratz S., Raue F., et al. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/Gastrin receptor- expressing tumors. *J Nucl. Med*. 1999;713:49-66.
- 55 - Wank S. A., Pisegna J. R., de weerth A. Cholecystokinin receptor family. Molecular cloning, structure and functional expression in rat, guinea pig and human. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;713:49-66.
- 56 - Filmore D. It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery (American Chemical Society)*. 2004;November:24-28.
- 57 - Samuelson L. C., Isakoff M. S., and Lacourse K. A. Localization of the murine cholecystokinin A and B receptor genes. *Mamm Genome* 1995;6: 242–246.
- 58 - Miyake A. A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208: 230–237.
- 59 - Gregory RA and Tracy HJ. The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *Gut* 1964;46: 103–114.
- 60 - Jensen R. T., Lemp G. F., and Gardner J. D. Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 2079–2083.
- 61 - Jensen R. T., Wank S. A., Rowley W. H., Sato S., and Gardner J. D. Interaction of CCK with pancreatic acinar cells. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10: 418–423
- 62 - Langer I., Tikhonova I. G., Travers M. A., Archer-Lahlou E., Escrieut C., Maigret B., and Fourmy D. Evidence that interspecies polymorphism in the human and rat cholecystokinin receptor-2 affects structure of the binding site for the endogenous agonist cholecystokinin. *J Biol Chem*. 2005;280: 22198–22204
- 63 - Huang S. C., Fortune K. P., Wank S. A., Kopin A. S., and Gardner J. D. Multiple affinity states of different cholecystokinin receptors. *J Biol Chem*. 1994;269: 26121–26126.
- 64 - Reeve J. R. Jr, McVey D. C., Bunnett N. W., Solomon T. E., Keire D. A., Ho F. J., Davis M. T., Lee T. D., Shively J. E., and Vigna S. R.. Differences in receptor binding and stability to enzymatic digestion between CCK-8 and CCK-58. *Pancreas*. 2002;25: e50–E55.
- 65 - Solomon TE, Yamada T, Elashoff J, Wood J, and Beglinger C. Bioactivity of cholecystokinin analogues: CCK-8 is not more potent than CCK-33. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1984;247: G105– G111.
- 66 - Dufresne M., Escrieut C., Clerc P., Le Huerou-Luron I., Prats H., Bertrand V., Le Meuth V., Guilloteau P., Vaysse N., and Fourmy D. Molecular cloning, developmental expression and pharmacological characterization of the CCKB/gastrin receptor in the calf pancreas. *Eur J Pharmacol*. 1996;297: 165–179.
- 67 - Huang SC, Yu DH, Wank SA, Mantey S, Gardner JD, and Jensen RT. Importance of sulfation of gastrin or cholecystokinin (CCK) on affinity for gastrin and CCK receptors. *Peptides* 1989;10: 785–789.



- 68 - Reubi J. C., Waser B., Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer*. 1996;67:644-647
- 69 - Reubi J. C., Schaer J. C., Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res*. 1997;57:1377-1386.
- 70 - Laverman P., Joosten L., Eek A., Roosenburg S., Kolenc Peitl P., Maina T., Mäcke H., Aloj L., von Guggenberg E., et al. Comparative biodistribution of 12 ¹¹¹In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:1414-1416.
- 71 - Aloj L., Aurilio M., Rinaldi V., D`ambrosio L., Tesauro D., Kolenc Peitl P., Maina T., Mansi., von Guggenberg E., et. Al. Comparison of the binding and internalization properties of 12 DOTA-Coupled and ¹¹¹In-labelled CCK2/gastrin receptor binding peptides: a collaborative Project under COST Action BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:1417-1425.
- 72 - Smith J. P., Verderame M. F., McLaughlin P., Martenis M., Ballard E., Zagon I. S. Characterization of the CCK-C (cancer) receptor in human pancreatic cancer. *Int J Mol Med*. 2002;10:689-694.
- 73 - Korner M., Wasr B., Reubi J. C., Miller L. J. CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours. *J Cell Mol Med*. 2010;14:933-943.
- 74 - Reubi J. C., Waser B., Schaer J. C., Laederach U., Erion J., Srinivasan A. et al. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med* 1998;25:481-490.
- 75 - de Jong M., Bakker W. H., Bernard B. F., Valkema R., Kwekkeboom D. J., Reubi J. C. et al. Preclinical and initial clinical evaluation of ¹¹¹In-labeled nonsulfated CCK8 analog: a pptide for CCKK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med* 1999;40:2081-2087.
- 76 - Laverman P., Béhé M., Oyen W. J., Willems P. H., Corstens F. H., Behr T. M., et al. Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjug Chem*. 2004;15:561-568.
- 77 - Laverman P., Roosenburg S., Gotthardt M., Park J. S., Oyen W. J., de Jong M., et al. Targetong of a CCK2 receptor splice variant with In-labelled cholecystokinin-8 (CCK8) and In-labelled minigastrin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:386-392.
- 78 - Aloj L., Caraco C., Panico M., Zannetti A., Del Vecchio S., Tesauro D., et al. In vitro and in vivo evaluation of In-¹¹¹-DTPAGlu-G-CCK8 for cholecystokinin-B receptor imaging. *J Nucl Med*. 2004;45:485-494.
- 79 - Aloj L., Panico M., Caraco C., Del Vecchio S., Arra C., Affuso A., et al. In vitro and in vivo characterization of Indium-111 and technetium-99m labeled CCK-8 derivatives for CCK-B receptor imaging. *Cancer Biother Radiopharm*. 2004;19:93-98.
- 80 - Nock B- A., Maina T., Béhé M., Nikolopoulou A., Gotthard M., Schmitt J. S., et al. CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (^{99m}Tc)-labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med*. 2005;46:1727-1736.
- 81 - Mather S. J., McKenzie A. J., Sosabowski J. K., Morris T. M., Ellison D., Watson S. A. Selection of radiolabeled gastrin analogs for peptide receptor-targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med*. 2007;48:615-622.
- 82 - Harrison A., Walker C., Parker D. The in vivo release of ⁹⁰Y from cyclic and acyclic ligand-antibody conjugates. *Nucl Med and Biol* 1991;18:469-676.



- 83 - Good S., Walter M. A., Waser B., Wang X., Müller-Brand J., Béhé M. P., Reubi J. C., Maecke H. R. Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:1868-1877.
- 84 - Crudo J., Nevares N. Report of Second research coordination meeting of the CRP on "Development of therapeutic radiopharmaceutical based on ¹⁷⁷Lu for radionuclide therapy" (Research contract ARG-14060). OIEA, Octubre, 2012 pag
- 85 - von Gugenberg E., Sallegger W., Helbok A., Ocak M., King R., Mather S. J., et al. Cyclic minigastrin analogues for gastrin receptor scintigraphy with technetium-99m: preclinical evaluation. *J Med Chem*. 2009;52:4786-4793.
- 86 - von Gugenberg E., Rangger C., Sosabowsky J., Laverman P., Reubi J. C., Virgolini I. J., C. Decristoforo. Preclinical evaluation of radiolabeled DOTA-derivatized cyclic minigastrin analogs for targeting cholecystokinin receptor expressing malignancies. *Mol Imaging Biol*. 2012;14:366-375.
- 87 - Sosabowski J. K., Matzow T., Foster J. M., Finucane C., Ellison D., Watson S. A., Mather S. J. Targeting of CCK-2 receptor-expressing tumors using a radiolabeled divalent gastrin peptide. *J. Nucl Med*. 2009;50:2082-2089.
- 88 - Lopez Bularte A. C., Nevares N. N., Puerta Yepes N., Zapata A. M., Perez J. H., Rojo A. M., Crudo J. L. Estado de avance en ensayos con nuevos radiofármacos de ¹⁷⁷Lu en Terapia Radionucleídica de Receptores Peptídicos (PRRT). [Oral presentation]. XXXVIII Reunion Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN), Hotel Claridge, Buenos Aires, Argentina. 14-18 Nov. del 2011
- 89 - Ocak M., Helbok A., Rangger C., Kolenc Peitl P., Nock B. A., Morelli G., Eek A., Sosabowski J. K., Breeman W. A. P., Reubi J. C., Decristoforo C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative Project under COST BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:1426-1435.
- 90 - Kolenc-Peitl P., Mansi R., Tamma M. L., Gmeiner-Stopar T., Sollner-Dolenc M., Waser B., et al. Highly improved metabolic stability and pharmacokinetics of ondium-111-DOTA-gastrin conjugates for targeting of the gastrin receptor. *J Med Chem*. 2011;54(8):2602-2609.
- 91 - Marsouvanidis P. J., Tatsi A., Nock B. A., Krenning E. P., Maina T., de Jong M. [¹¹¹In]Sargastrin, a Gastrin I-based radioligand targeting CCK2-R-positive tumors in vivo (abstract). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36 Suppl 2:S259.
- 92 - Kiessling F., Pilchler BB. J. (Editors). *Small Animal Imaging: Basics and practical guide*. Ed. Springer, 2011; capítulo 19; 260-262
- 93 - Motulsky H. *The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data*. Published by GraphPad Software, Inc., 1995.
- 94 - Lambert D. G. Drugs and receptors. *Continuing education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*. 2004;4(6):181-184
- 95 - Eun-Ha Joh, Jae Cheong Lim, et al. Cyclic cholecystokinin analogues exhibit high blood stability and binding affinity with cholecystokinin receptor. *OnLine Journal of Biological Sciences* 2014;14(1):26-35.
- 96 - Antunes P., Ginj M., Zhang H., Waser B., Baum R. P., Reubi J. CC., Maecke H. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:982-993



-
- 97 - Pillai M. R. A., Chakraborty S., Das T., Venkatesh M., Ramamoorthy N.. Production logistics of ^{177}Lu for radionuclide therapy. *Applied Radiation and Isotopes* 2003;59:109-118
- 98 - Crudo J., Nevares N., López Bularte A., Quintana J. La producción experimental de Lu-177 de alta actividad específica por el método directo abre nuevas posibilidades en el desarrollo de radiofármacos para tratamiento del cáncer en Argentina. Trabajo presentado a premio en LALCEC 2012.
- 99 - Cremonesi M., Ferrari M., Bodei L., Tosi G., Paganelli G.. Dosimetry in peptide radionuclide receptor therapy: a review. *J. Nucl. Med* 2006;47(9):1467-1475
- 100 - Breeman W. A. P. Practical Aspects of labeling DTPA- and DOTA- peptides with ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu and ^{68}Ga for Peptide-Receptor Radionuclide Therapy in preclinical and clinical applications. University of New Mexico Health Sciences Center, Pharmacy Continuing Education, 2012, vol.5, lesson 5.

