



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Síntesis y radiomarcado de un conjugado heterobivalente
de bombesina y ácido fólico para la evaluación de la
actividad metabólica de células de cáncer de mama”**

T E S I S

Para Obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Liliana Aranda Lara

Comité Tutorial:

Dra. en C. Guillermina Ferro Flores

Tutor Externo

Dra. en C. Keila Isaac Olivé

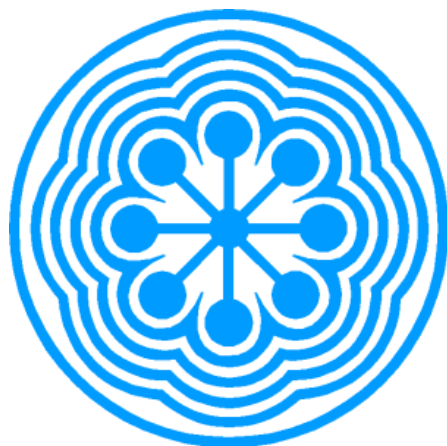
Tutor Académico

Dr. en C. Eugenio Torres García

Tutor Interno

Toluca, Estado de México, Marzo de 2017





ININ

Este trabajo se realizó en la Gerencia de **Aplicaciones Nucleares** en la Salud (Departamento de Materiales Radiactivos) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, bajo la dirección de la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores, **como parte de las actividades del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos CONACyT.**

Financiamiento CONACYT (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443)

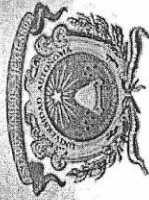
INDICE

		No. página
	Resumen y Summary	1-6
1	Antecedentes	
	1.1 Imagen molecular con radiofármacos	7-9
	1.2 Terapia dirigida con radionúclidos	9-14
	1.3 Efectos biológicos de la radiación ionizante	14-17
	1.4 Cáncer y características biológicas	18-20
	1.5 Función biológica del Receptor del péptido liberador de gastrina y del péptido Bombesina en cáncer	21-23
	1.6 Análogos de Bombesina radiomarcados para diagnóstico y terapia	23-25
	1.7 Función biológica del Receptor de Folato y ácido fólico en cáncer	25-28
	1.8 Derivados de Folato radiomarcados para diagnóstico y terapia	28-30
	1.9 Imagen metabólica de las células de cáncer	30-34
	1.10 Radiofármacos heterobivalentes	34-36
2	Planteamiento del Problema	37
3	Justificación	38
4	Hipótesis	39-41
5	Objetivos	42-43
6	Diseño Metodológico	44
	6.1. Diseño de estudio	44
	6.2. Universo y muestra	44
	6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	44-45
	6.4. Procedimientos para la síntesis y evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del conjugado heterobivalente Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (^{99m} Tc-HYNIC)-Bombesina (1-14)	
	6.4.1 Síntesis de Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (HYNIC)-Bombesina (1-14)	45-46
	6.4.2 Caracterización química del conjugado Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (HYNIC)-Bombesina (1-14)	46-48
	6.4.3 Preparación de Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (^{99m} Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesina (1-14) [^{99m} Tc- Folato-Bombesina]	48
	6.4.4 Determinación de la pureza radioquímica del conjugado ^{99m} Tc-Folato-Bombesina	48-49

6.4.5	Estabilidad en suero humano del conjugado ^{99m} Tc-Folato-Bombesina	49
6.4.6	Afinidad del ^{99m} Tc-Folato-Bombesina a la proteína del receptor GRP y al receptor de Folato	49-50
6.4.7	Cultivo de las células de cáncer de mama T47D	50-51
6.4.8	Expresión de GRPR y FR en las células de cáncer de mama T47D.	51-52
6.4.9	Estudios de captación del conjugado ^{99m} Tc-Folato-Bombesina en células T47D	52-53
6.4.10	Estudios de biodistribución del conjugado ^{99m} Tc-Folato-Bombesina en ratones atómicos con tumores inducidos T47D	53-54
6.4.11	Estudios de imagen con SPECT/CT	54-55
6.4.12	Medición de la actividad metabólica con ^{99m} Tc-Folato-Bombesina vs [¹⁸ F]FDG	55
6.5.	Procedimientos para la síntesis y evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del conjugado heterobivalente Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (¹⁷⁷ Lu-DOTA)-Bombesina (1-14)	
6.5.1	Síntesis de Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (DOTA)-Bombesina (1-14)	56
6.5.2	Caracterización química del conjugado Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (DOTA)-Bombesina (1-14)	57-58
6.5.3	Preparación de Lys ¹ (α,γ -Folato)Lys ³ (¹⁷⁷ Lu-DOTA)-Bombesina (1-14) [¹⁷⁷ Lu- Folato-Bombesina]	58
6.5.4	Estudios <i>in vitro</i>	59-61
6.5.5	Estudios <i>in vivo</i>	61-64
6.6.	VARIABLES DE ESTUDIO	64-65
6.7.	Recolección de datos	65-66
6.8.	Análisis de datos	66
6.9.	Aspecto ético e implicaciones bioéticas	66
7	Resultados	
7.1	Improved Radiopharmaceutical Based on ^{99m} Tc-Bombesin-Folate for Breast Tumour Imaging	67
7.1.1	Carta de aceptación	68
7.1.2	Resumen	69
7.1.3	Abstract	70
7.1.4	Introduction	71-72
7.1.5	Materials and Methods	72

7.1.5.1	Synthesis and chemical characterization	72-74
7.1.5.2	Preparation of Lys ¹ (α,γ -Folate)Lys ³ (^{99m} Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesin (1-14) [^{99m} Tc-Bombesin-Folate]	75
7.1.5.3	<i>In vitro</i> studies	75-78
7.1.5.4	<i>In vivo</i> studies	78-80
7.1.6	Results and discussion	
7.1.6.1	Synthesis of heterobivalent conjugate	80
7.1.6.2	Chemical characterization	81-84
7.1.6.3	Radiochemical purity	85
7.1.6.4	<i>In vitro</i> studies	85-87
7.1.6.5	<i>In vivo</i> studies	87-91
7.1.7	Conclusions	92
7.1.8	References	92-95
7.2	Synthesis and evaluation of Lys ¹ (α,γ -Folate)Lys ³ (¹⁷⁷ Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer	96
7.2.1	Carta de aceptación del artículo	97
7.2.2	Resumen	97
7.2.3	Abstract	98
7.2.4	Introduction	99-100
7.2.5	Experimental methods	100
7.2.5.1	Synthesis of Lys ¹ (α,γ -Folate)Lys ³ (DOTA)-Bombesin (1-14) [Folate-BN]	100-101
7.2.5.2	Labeling of Lys ¹ (α,γ -Folate)Lys ³ (DOTA)-Bombesin (1-14) with ¹⁷⁷ Lu [¹⁷⁷ Lu-Folate-BN]	102
7.2.5.3	Radiochemical purity	102
7.2.5.4	Stability in human serum	102
7.2.5.5	<i>In vitro</i> affinity studies	103
7.2.5.6	<i>In vitro</i> uptake studies	103-104
7.2.5.7	<i>In vivo</i> studies	104-106
7.2.5.8	Imaging	106
7.2.5.9	Statistical Analysis	107
7.2.6	Results and discussion	
7.2.6.1	Chemical characterization	107-109
7.2.6.2	<i>In vitro</i> studies	109-110
7.2.6.3	<i>In vivo</i> studies	110-113
7.2.7	Conclusions	114
7.2.8	References	114-116

7.3	Synthesis and evaluation of the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate radiopharmaceutical.	117
7.3.1	Carta de aceptación	118
7.3.2	Resumen y abstract	119-120
7.3.3	Introduction	121-122
7.3.4	Materials and methods	
7.3.4.1	Synthesis of the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate conjugate	122-124
7.3.4.2	Chemical characterization	124-125
7.3.4.3	Radiolabeling of HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate with ^{99m}Tc	125-126
7.3.4.4	In vitro evaluation	126-128
7.3.4.5	In vivo evaluation	128-129
7.3.5	Results and discussions	
7.3.5.1	Synthesis of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate	129-130
7.3.5.2	Chemical characterization	131-138
7.3.5.3	Radiochemical purity and in vitro studies	139-140
7.3.5.4	In vivo studies	141-144
7.3.6	Conclusions	144
7.3.7	References	145-147
8	Discusión general	148-154
9	Conclusiones generals	155
10	Trabajo a future	156
11	Referencias Bibliográficas	157-169



UAEM | Universidad Autónoma del Estado de México

FACULTAD DE ENFERMERÍA Y OBSTETRICIA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

ACTA DE VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Toluca, México, a 2 de diciembre de 2016

Nombre de la Alumna: Lilitiana Aranda Lara
Título de la tesis: Síntesis y radiomarcado de un conjugado heterobivalente de bombesina y ácido fólico para la evaluación de la actividad metabólica de células de cáncer de mama

Nombre	Dictamen (Aprobado o Rechazado)	Observaciones
Dra. en C. Keila Isaac Olivé	Aprobado	
Dr. en C. Eugenio Torres García	Aprobado	
Dra. en C. Guillermina Ferro Flores	Aprobado	

Keila Isaac

Eugenio Torres

Guillermina Ferro Flores

TUTOR ACADÉMICO
Dra. en C. Keila Isaac Olivé

TUTOR INTERNO
Dr. en C. Eugenio Torres García

TUTOR EXTERNO
Dra. en C. Guillermina Ferro Flores



Dedicatorias

“La conclusión de este trabajo representa para mí la suma de esfuerzos de todas las personas importantes en mi vida que aún sin darse cuenta me apoyaban.”

Por ello es para mí un honor dedicar este trabajo a:

A mi Dany por ser la inspiración de todos los días.

A mi papá David y a mi mamá Ana por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Miguel por ser un buen amigo.

A mis buenas amigas de la maestría: Luz y Vero

A las Doctoras y amigas: Blanquita, Lety, Myr, Nalle y Erika.

Y a ti por ser un apoyo especial.

A todos Muchas Gracias!!!!

Agradecimientos

Al Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares donde se realizó esta investigación.

A la Dra. Guille y a su equipo de trabajo Dra. Blaquita, Dra. Lety, Dra. Myrna, Dra. Nalle y Dra. Erika **del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos CONACyT**, quiero agradecerles todo el apoyo brindado durante estos años.

Un especial agradecimiento a la Dra. Guille por la oportunidad que me brindó para llevar a cabo el presente proyecto y sobre todo por su voluntad inquebrantable y perseverancia para culminar con éxito el presente trabajo.

A la Dra. Keila Isaac Olivé y al Dr. Eugenio Torres García les agradezco su tiempo, dedicación y confianza para realizar esta tesis, así como sus consejos y enseñanzas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de formación académica otorgada durante la realización de este proyecto.

Resumen

Las moléculas heterobivalentes radiomarcadas han mostrado ser una estrategia adecuada para obtener imágenes del tumor de manera sensible, específica y no invasiva debido a que interactúan concomitantemente con diferentes blancos moleculares sobre la célula tumoral. Una de las características fenotípicas de las células de cáncer de mama es la sobre-expresión de receptores de membrana que regulan el comportamiento celular. Entre estos receptores se encuentran el receptor del péptido liberador de gastrina (GRPR) y el receptor de folatos (FR), los cuales al unirse con alta afinidad a la Bombesina y ácido fólico/folato respectivamente, producen respuestas celulares que favorecen el crecimiento y proliferación celular. El objetivo del presente trabajo fue sintetizar y caracterizar químicamente los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$, con la finalidad de evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* su potencial como radiofármacos heterobivalentes para diagnóstico y/o tratamiento de células de cáncer de mama +GRPR y +FR. Adicionalmente, se evaluó el potencial de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ para medir la actividad metabólica de dichas células a través de imágenes SPECT. Para obtener a los conjugados $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$, los péptidos $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ se conjugaron a ácido fólico mediante un enlace amida. Los productos se purificaron por HPLC de exclusión molecular y se caracterizaron por espectroscopia UV-Vis, IR-FT y espectrometría de masas MALDI-TOF. El radiomarcado de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se realizó con EDDA/tricina como coligantes y SnCl_2 como agente reductor. Para el radiomarcado de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$

con ^{177}Lu , se utilizó $^{177}\text{LuCl}_3$ diluido con buffer de acetato 1 M a pH=5. La pureza radioquímica se evaluó en un HPLC en fase reversa. Se evaluó la estabilidad de los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$ en suero humano. Se determinó la afinidad de los conjugados heterobivalentes a la proteína recombinante GRPR y a la proteína humana FR. La captación *in vitro* se evaluó en células de cáncer de mama T47D (+GRPR y +FR). La biodistribución y captación en el tumor se determinaron en ratones atómicos con tumores inducidos T47D. Para evaluar la especificidad de los conjugados heterobivalentes, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo* se bloquearon los receptores GRPR y FR. Los estudios de imagen en ratones atómicos con tumores T47D se obtuvieron con un micro-SPECT/CT. La actividad metabólica del tumor se determinó a partir de imágenes SPECT/CT utilizando $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y se comparó con ^{18}F -FDG y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato. Se estimó la dosis absorbida en el tumor, riñón, hígado y páncreas a partir de la actividad acumulada en la región de interés. Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* se compararon con sus respectivos monómeros $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$.

Los estudios espectroscópicos y el análisis por HPLC indicaron que los conjugados heterobivalentes se obtuvieron con alta pureza química y alta pureza radioquímica (>95%). Los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$ mostraron alta estabilidad en suero humano con 2% de unión a proteínas a las 2 h de incubación. Ambos conjugados mostraron alta afinidad a la proteína recombinante del GRPR y a la proteína humana del RF. Los estudios *in vitro* mostraron que los conjugados heterobivalentes tienen reconocimiento

específico a las células de cáncer de mama T47D +GRPR y +FR, y mostraron un incremento en la captación debido al efecto concomitante entre la unión Bombesina-GRPR- y Folato-FR. Los estudios de biodistribución de los conjugados heterobivalentes en ratones atómicos con tumores inducidos T47D, mostraron alta captación en el tumor con alto contraste en las imágenes SPECT/CT. $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ permitió evaluar a través de imagen la actividad metabólica del tumor. El compuesto $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ mejoró la dosis absorbida al tumor debido a la unión concomitante de Bombesina-GRPR y Folato-FR.

Este estudio demostró que los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ mejoran la detección de células de cáncer de mama +GRPR y +FR, por lo que, pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o tratamiento de tumores de mama que sobre-expresan GRPR y FR.

Summary

The radiolabelled heterobivalent molecules have showed to be an important strategy for specific, sensitive, and noninvasive tumor imaging due to interact concomitantly with different targets on tumor cells. One of the phenotypic characteristics of breast cancer cells is the overexpression of membrane receptors, such as gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and folate receptor (FR), which binding to Bombesin and folic acid with high affinity to produce cellular responses that favor the growth and proliferation cell.

The aim of this work was to synthesize and carry out the chemical characterization of the $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ heterobivalent conjugates, with the purpose to evaluate their potential as heterobivalent radiopharmaceuticals for diagnosis and / or treatment of breast cancer cells +GRPR and +FR. Additionally, $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ potential was evaluated for measurement metabolic activity.

To obtain $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ and $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$, the peptides $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ and/or $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ was conjugated to folic acid. The reaction mixture was purified using size exclusion HPLC and UV-Vis and IR-FT spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry were used for chemical characterization. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labelling of $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ was performed using EDDA/tricine as coligands and SnCl_2 as reducing agent. ^{177}Lu labelling of $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ was carried out by adding $^{177}\text{LuCl}_3$ to the $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ in 1M sodium acetate buffer pH 5 and incubated at 92 °C during 20 min. Radiochemical purity was determined by reversed-phase HPLC. Stability

in human serum was evaluated and *in vitro* affinity studies were carried out in gastrin-releasing peptide receptor recombinant protein or purified human folate receptor protein. The *in vitro* uptake was evaluated in T47D breast cancer cells (+GRPR y +FR). The biodistribution and tumor uptake were accomplished in athymic mice with T47D tumors. Molecular images in athymic mice with T47D-induced tumors were obtained with micro-SPECT/CT. Tumor metabolic activity was determined from SPECT / CT images using Lys¹ (α , γ -folate) Lys³ (^{99m}Tc-HYNIC) -Bombesin (1-14) and compared with ¹⁸F-FDG and ^{99m}Tc-Folate. Absorbed dose in the tumor, kidney, liver and pancreas were estimated. The *in vitro* and *in vivo* results were compared with Lys¹Lys³(^{99m}Tc-HYNIC)-Bombesina (1-14) and Lys¹Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesina (1-14). Spectroscopic studies and HPLC analyses indicated that the radioconjugate was obtained with high chemical and radiochemical purity (>95%). The Lys¹(α , γ -folate)Lys³(^{99m}Tc-HYNIC)-Bombesin (1-14) and Lys¹(α , γ -folate)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesin (1-14) heterobivalent conjugates showed high stability in Human serum with 2% of binding protein at 2 h incubation. Both conjugates showed high affinity to the GRPR recombinant protein and FR human protein. *In vitro* results showed that heterobivalent conjugates have specific binding recognition by T47D breast cancer cells (+GRPR and +FR) and showed an increase in tumor uptake, due to concomitant effect produced by the Bombesin-GRPR and Folate-FR interactions. Biodistribution studies showed high tumor uptake with high contrast for SPECT/CT images. Lys¹(α , γ -folate)Lys³(^{99m}Tc-HYNIC)-Bombesin (1-14) allowed to evaluate tumor metabolic activity using SPECT/CT imaging . Lys¹(α , γ -folate)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesin (1-14) improved the absorbed dose to the tumor due to the concomitant effect between Bombesin-GRPR y Folate-FR.

This study demonstrated that the use of $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ and $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ improve the recognition of breast cancer cells +GRPR and +FR and can be used as heterobivalent radiopharmaceuticals for diagnosis and / or treatment of breast cancer cells that overexpress GRPR and FR. Additionally, $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folate})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ has the potential to evaluate tumor metabolic activity.

1. Antecedentes

1.1 Imagen molecular con radiofármacos

Las técnicas de imagen molecular, como SPECT y PET, tienen la habilidad de detectar y medir cuantitativamente, de manera no invasiva, eventos biológicos a nivel celular y molecular (expresión génica, el tráfico de proteínas, actividad metabólica, actividad enzimática, etc.) en humanos y otros seres vivos [1]. Dichos eventos pueden estar directa o indirectamente relacionados con procesos fisiopatológicos o cáncer. La visualización de estos eventos requiere de sondas específicas (algunas veces llamadas trazadores debido a las cantidades sub-farmacológicas utilizadas) que proporcionen una señal analítica, la cual es detectada por un método particular para dar como resultado una imagen en 2D o 3D [2]. Para las técnicas de imagen SPECT y PET, se utilizan radiofármacos de tercera generación caracterizados por usar agentes quelantes bifuncionales que coordinan metales radiactivos y unen mediante enlaces covalentes a moléculas biológicas que transportan al radionúclido a sitios específicos de las células (como receptores de membrana) [3]. En el caso de SPECT, el ^{99m}Tc es el radionúclido más utilizado en el diseño y síntesis de radiofármacos con fines de diagnóstico (Figura 1.1), debido a que su emisión gamma (γ : 140.5 keV) permite una adecuada calidad de imagen que facilita el diagnóstico, su tiempo de vida media ($t_{1/2}$: 6.05 horas) que favorece la eliminación rápida del cuerpo después de la administración del radiofármaco generando dosis relativamente bajas al paciente y a su fácil disponibilidad debido al bajo costo de los generadores ^{99}Mo - ^{99m}Tc [4,5].

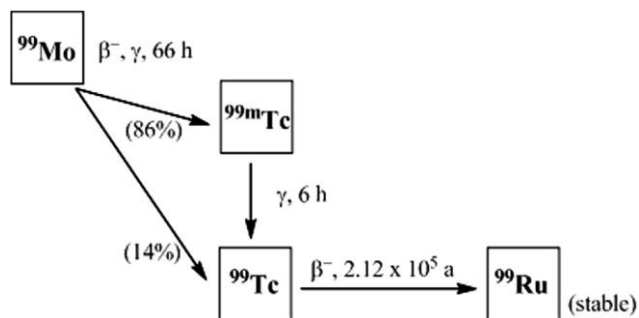


Figura 1.1. Esquema de decaimiento del $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Dependiendo de la aplicación, los radiofármacos de tercera generación pueden utilizarse como agentes de diagnóstico o como agentes terapéuticos, los cuales dependerán del tipo de radionúclido utilizado en su diseño. En general, las características de los radiofármacos deben ser tales que aporten la máxima eficiencia para el diagnóstico o tratamiento mientras que la dosis administrada sea la mínima posible [6]. Algunas de las características que se deben considerar para el diseño y desarrollo de radiofármacos son: la farmacocinética, la selección del blanco molecular y la selección de molécula de reconocimiento específico (biomarcador). Por ejemplo, la modificación de las propiedades farmacocinéticas del trazador se pueden alcanzar al modificar la química del complejo quelante-metal y/o región de enlace del biomarcador, la introducción de coligantes en la esfera de coordinación del metal, o la inserción de un linker. Todos estos factores modifican el tiempo de retención del radiofármaco en sangre, la cinética de interacción del biomarcador con el receptor y la ruta de excreción. Para imagen molecular, el radiofármaco debe tener su máxima captación en la región blanco en el menor tiempo posible con una señal/ruido adecuada. Para imagen y terapia molecular, el tiempo de residencia del trazador en sangre debe ser mínimo, pero, debe ser suficiente como para que el radiofármaco llegue al sitio específico. Por último, es

necesario que el agente tenga una alta excreción renal para minimizar la acumulación de la radiactividad en el tracto gastrointestinal [7].

1.2 Terapia dirigida con radionúclidos

La terapia dirigida con radionúclidos tiene el objetivo de producir un efecto terapéutico en tejidos blanco y reducir la toxicidad producida por la radiación en los tejidos sanos mediante la administración de moléculas biológicas radiomarcadas con radionúclidos emisores de partículas cargadas [8].

Un radiofármaco con fines terapéuticos utiliza radionúclidos emisores de partículas α , β y e^- Auger con energías desde unos pocos eV hasta 9 MeV (Tabla 1.1)[9]. El efecto terapéutico producido por las partículas cargadas dependerá de la energía depositada durante su trayectoria en el tejido y de la respuesta a la radiación de los tejidos. La ventaja que tiene la terapia dirigida con radionúclidos con respecto a la radioterapia de haz externo, es que las partículas se detienen abruptamente dentro del tejido blanco y depositan de manera selectiva la mayor parte de su energía en áreas pequeñas minimizando la dosis de radiación en tejido sano.

Tabla 1.1. Características generales de radionúclidos terapéuticos

Decaimiento radiactivo	Partículas emitidas por decaimiento (#)	$E_{(min)}-E_{(max)}$	Alcance	LET
Partículas α	Núcleo de Helio (1)	5-9 MeV ^H	40-100 μm	$\sim 80 \text{ keV}/\mu\text{m}$
Partículas β^-	Electrones energéticos	50-2300 keV*	0.05-12 mm	$\sim 0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$
e^- Auger	Electrones energéticos	eV-keV ^H	2-500 μm	$\sim 4-26 \text{ keV}/\mu\text{m}$

^I Número de partículas emitidas por decaimiento del átomo

^H Monoenergético

* Distribución de energía continua

La distancia que recorren las partículas α , β y e^- Auger en el medio, corresponde con el tamaño de dichas partículas, por ejemplo, las partículas beta tienen un alcance en el tejido de hasta 12 mm, lo que puede ser equivalente a 100 diámetros celulares (Figura 1.2). Estas

partículas pueden perder y depositar su energía cinética total o parcialmente durante su trayectoria, lo que permite la eliminación de células que se encuentran adyacentes a la célula que tiene unido el radiofármaco. Este efecto es mejor conocido como “irradiación de fuego cruzado” (Figura 1.3)[10].

A largo de la trayectoria de las partículas α , β y e^- Auger en el medio se pueden generar diferentes densidades de ionización que dependen de la energía y de la velocidad de la partícula y del número atómico del medio. Las partículas α son consideradas altamente ionizantes así como los e^- Auger, ya que estos forman clústeres con alta densidad de ionización, mientras que las partículas β son consideradas poco ionizantes, por lo que, su eficacia terapéutica implica alta concentración del radionúclido dentro del tejido blanco (Figura 1.4) [11]. Con el fin de determinar el efecto biológico de la radiación ionizante, se ha introducido el concepto de transferencia lineal de energía (LET), el cual es una aproximación usada para estudiar la distribución espacial de la ionización y excitación producidos a lo largo de la trayectoria de la radiación ionizante. Este asume que la energía se deposita de manera continua y progresiva a través de la materia y se expresa como la relación que hay entre la energía liberada por la radiación ionizante en cierta distancia ($\text{keV}/\mu\text{m}$) [12]. Muchos de los radionúclidos utilizados para terapia, tales como ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{186}Re , o ^{67}Cu , emiten radiación de bajo LET de $0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ en forma de partículas β , electrones de conversión interna, así como también rayos X y gamma [10].

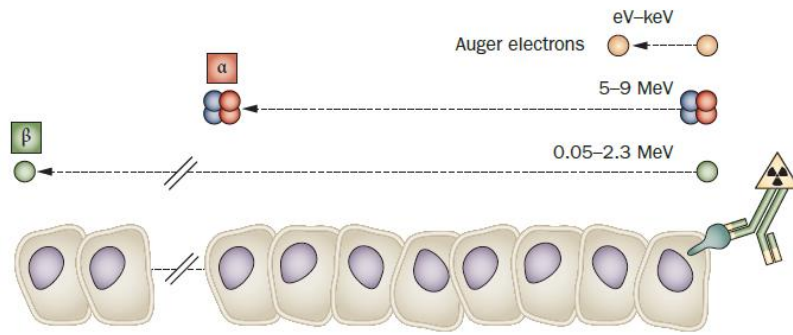


Figura 1.2. Alcance de las partículas α , β y e^- Auger relativa al diámetro celular.

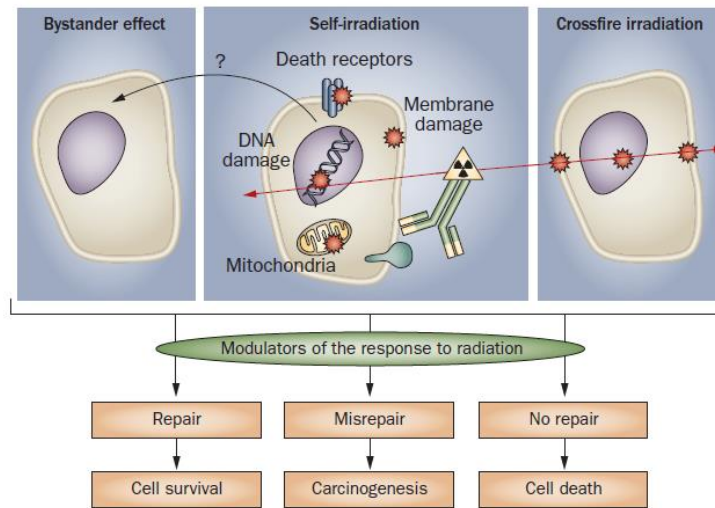


Figura 1.3. Efectos biológicos de la radiación ionizante.

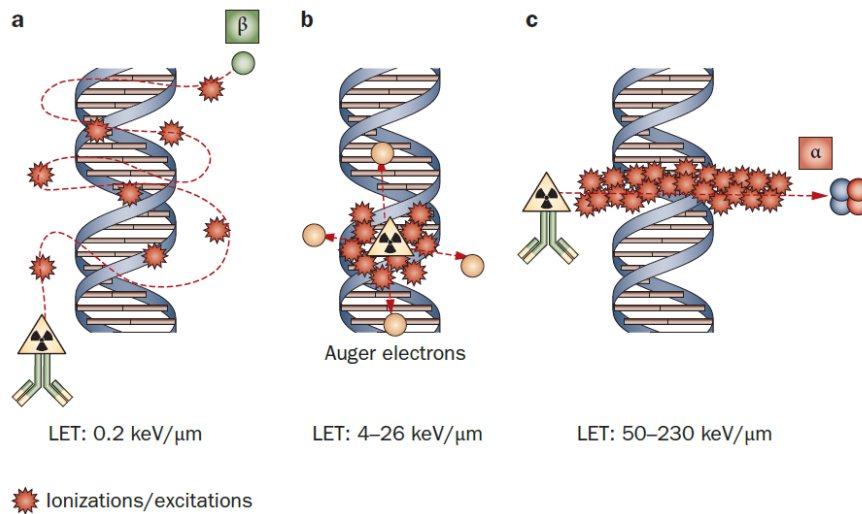


Figura 1.4. Densidad de ionización de las partículas α , β y e^- Auger.

El ^{177}Lu es un radionúclido emisor de partículas cargadas que es utilizado en terapia molecular debido a sus propiedades de emisión (Figura 1.5). El ^{177}Lu emite partículas β^- negativas con energías máximas de 498 keV y 133 keV con un alcance de penetración en el tejido de 1.7 mm y 0.23 mm, respectivamente; lo que favorece el depósito de su energía en volúmenes pequeños como micrometástasis. Cuando el ^{177}Lu está unido a un blanco molecular a través de una molécula con reconocimiento específico, el alcance de la partícula β^- (0.23 mm) es ideal para depositar la energía en cada célula blanco con diámetro promedio de 0.02 mm. La dosis absorbida al núcleo de la célula estimado es 0.075 mGy por desintegración que ocurre en la membrana de la célula y 0150 mGy por desintegración en el citoplasma [13]. El ^{177}Lu también emite fotones γ con energías de 113 keV (6.6%) y 208 keV (11%) apropiadas para la adquisición de imágenes *in vivo* en equipos SPECT y para la realización de estudios dosimétricos personalizados, previos a la terapia con radionúclidos, que permiten establecer la dosis máxima tolerable para un determinado radiofármaco de ^{177}Lu a partir de imágenes del paciente. Las emisión β^- y γ del ^{177}Lu son importantes para el desarrollo de agentes teranósticos [14,15].

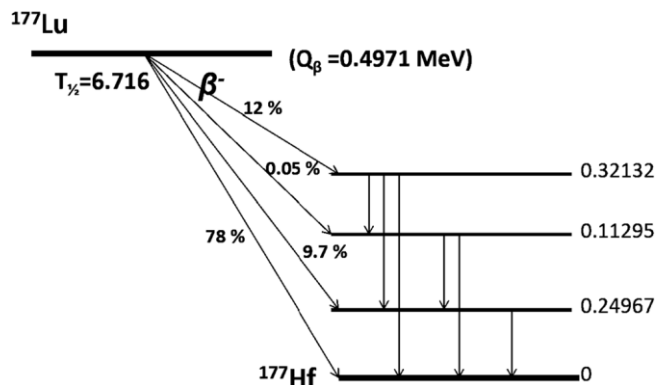


Figura 1.5. Esquema de decaimiento de ^{177}Lu .

El término teranóstico se refiere a estructuras químicas o nanoplataformas con vectores moleculares de reconocimiento específico que incorporan funciones de diagnóstico y terapia de forma simultánea. Estas moléculas pueden ser útiles en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a la terapia [13].

Nanopartículas conjugadas a péptidos y marcadas con ^{177}Lu , se han considerado como una nueva clase de radiofármacos teranósticos. Estos sistemas multifuncionales contienen al agente quelante bifuncional DOTA, el cual es capaz de formar complejos con ^{68}Ga y ^{177}Lu , los cuales pueden usarse para la identificación de tumores y monitorear el tratamiento a través de imagen PET/SPECT e imagen óptica utilizando las propiedades fluorescentes de las nanopartículas, y se pueden utilizar para terapia de blancos moleculares debido a la emisión β del ^{177}Lu [13,16]. Recientemente, sistemas multifuncionales de dendrímeros conjugados a DOTA, Bombesina y ácido fólico y con nanopartículas de oro en su cavidad dendrítica han mejorado la detección de células positivas a receptores GRPR y FR y sus propiedades teranósticas cuando se marcan con ^{68}Ga y ^{177}Lu . En este caso particular el Lu-177 también se utilizó para obtener imágenes por luminiscencia Cerenkov [16]. Dicha modalidad se origina por la detección de fotones con longitudes de onda entre 350-900 nm emitidos por efecto Cerenkov, el cual se produce cuando una partícula cargada atraviesa el medio con una velocidad mayor que la velocidad de propagación de la luz en ese medio, generando fotones con longitudes de onda entre 350-900 nm debido a la excitación que produce la polarización de los átomos del medio[17,18].

Al igual que los nanosistemas, estructuras químicas como DOTAGA-FFK(Sub-KuE)-PSMA han mostrado potencial para formar moléculas teranósticas con rápida farmacocinética y alta afinidad a PSMA utilizando ^{68}Ga y ^{177}Lu . El compuesto ^{68}Ga -DOTAGA-FFK(Sub-KuE)-

PSMA generó imágenes PET con alto contraste de cáncer metastásico de próstata y fue útil para la estratificación y seguimiento de los pacientes sometidos a terapia con ^{177}Lu -DOTAGA-FFK(Sub-KuE)-PSMA, mientras que su contraparte ^{177}Lu -DOTAGA-FFK(Sub-KuE)-PSMA mostró características de detección y retención adecuadas para tratamiento, así como alta efectividad terapéutica sin efectos secundarios detectables, lo que calificó a $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -DOTAGA-FFK(Sub-KuE)-PSMA como agente teranóstico para cáncer metastásico de próstata [19,20].

1.3 Efectos biológicos de la radiación ionizante

La radiación ionizante produce efectos biológicos a través de dos mecanismos: el directo e indirecto. El efecto directo involucra reacciones de oxidación de un electrón mientras que el efecto indirecto es mediado por la disociación del agua, permitiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como: radicales de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidróxilo ($\cdot\text{OH}$) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) como: peroxinitrato (ONO_2^-) y óxido nítrico (NO). A diferencia de $\cdot\text{OH}$ que es una especie muy reactiva y se difunde hasta 4 nm, el ONO_2^- puede difundirse fácilmente dentro de las células y en su forma protonada (ONOH) puede causar daño en el ADN, muerte celular así como peroxidación de proteínas y lípidos [12,21].

En el ADN se han identificado diferentes tipos de daño como: rompimientos de una sola cadena y de doble cadena, daños en las bases nitrogenadas, crosslinks ADN-ADN y ADN-proteína, aberraciones cromosómicas. Estas lesiones al no ser reparadas dan como resultado la muerte celular a través de apoptosis o catástrofe mitótica. Sin embargo, no todas las lesiones sin reparar son letales para la célula, ellas pueden pasar a las células hijas y dar lugar

a mutaciones, inestabilidad genómica y eventualmente al desarrollo de cáncer (Figura 1.6) [21].

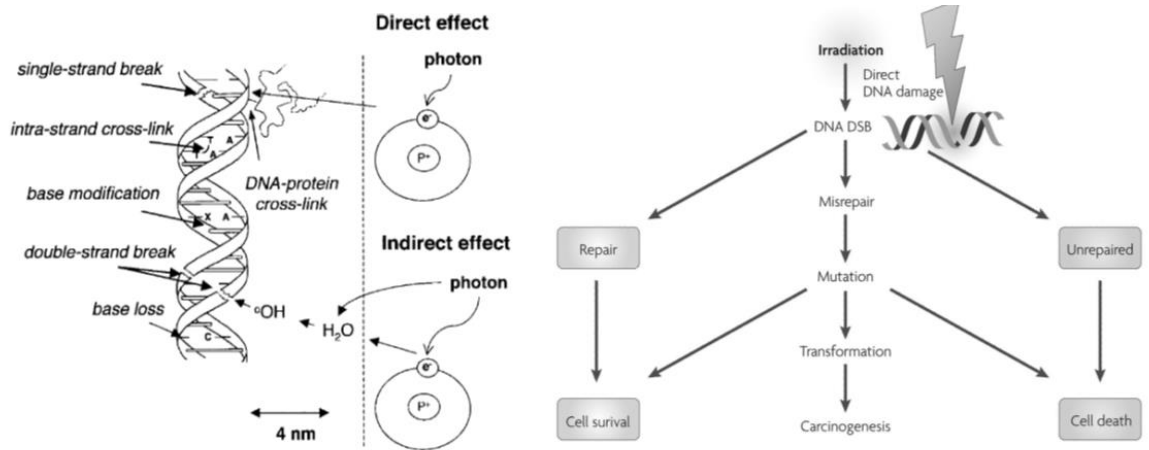


Figura 1.6. Lesiones inducidas en el ADN por la radiación ionizante y efectos biológicos en la célula.

El daño en el ADN activa a las enzimas serina/treonina proteína cinasa ATR, las cuales activan las proteínas involucradas en el control del ciclo celular y reparación del ADN. Dependiendo del grado de daño y de la capacidad de reparación de las células, el resultado puede ser la muerte o supervivencia celular. En general, la apoptosis en tumores sólidos es casi nula, debido a que p53 está mutado, las proteínas pro-apoptóticas (tales como BAX y APAF1) están inactivadas, o las proteínas anti-apoptóticas (BCL2 y survivina) están sobre-reguladas. Por lo que, la muerte celular en tumores sólidos debido a la exposición a la radiación ocurre durante la mitosis o senescencia. Se ha demostrado que la radiación puede activar receptores de factores de crecimiento (ERBB), receptores de muerte celular (FAS/CD95, DR5/TRAIL), la enzima esfingomielinasa ácida, y otras tirosinas-cinasas localizadas en la membrana plasmática. Después de la activación, estas modulan rutas de señalización citosólicas como la ruta proteína-quinasa activada por mitógenos ERK5,

ERK1/2, p38 JNK1/2 y AKT/PI3K que pueden promover la muerte celular via JUNK1/2, sobrevivencia celular a través de ERK1/2, AKT o la apoptosis mediada por ceramidas [10].

Otro de los blancos de la radiación ionizante es la mitocondria, donde la interacción de ROS y NO produce un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial dando lugar a la liberación de proteínas pro-apoptóticas como citocromo C y factores de inducción de apoptosis. Las especies reactivas de oxígeno como O_2^- , también contribuyen al stress oxidativo intracelular, el cual produce deleciones en el ADN mitocondrial. Cuando estas deleciones involucran genes que codifican ATPasa mitocondrial, complejo I deshidrogenasa NADH y al citocromo oxidasa C, dan lugar a defectos en el metabolismo mitocondrial y en la eficiencia de reparación del ADN así como también incremento en el nivel de ROS [22].

El efecto biológico de la radiación depende de la tasa de dosis absorbida, la oxigenación del tejido, del volumen de tejido irradiado y de la respuesta celular a la radiación, la cual es altamente dependiente del tejido irradiado y del microambiente.

Varios de los efectos biológicos de la radiación ionizante no sólo se restringen a las células que son directamente irradiadas o células blanco sino que también, puede dañar a células vecinas al tumor que no son irradiadas. Este efecto es mejor conocido como efecto bystander, en el cual las células irradiadas liberan señales de estrés que producen en las células no irradiadas una respuesta biológica similar a la respuesta biológica asociada con la exposición directa a la radiación ionizante [23].

La célula responde a la radiación ionizante al producir una respuesta bystander a través de dos rutas principales. Una involucra la comunicación célula-célula a través de las uniones de tipo gap y la segunda involucra la liberación de señales en la matriz extracelular (Figura 1.7).

Los macrófagos pueden ser importantes mediadores los cuales en respuesta al daño

producido en el tejido irradiado liberan señales bystander que afectan a las células no irradiadas [24]. Se ha demostrado que el efecto bystander produce mutaciones, efectos clastogénicos, muerte celular o apoptosis mediante la liberación de mediadores de estrés como ROS, RNO, citosinas (interleucinas 8, interleucinas 6, factor de necrosis tumoral, e interleucina-33), Ca^{2+} , ADN extracelular (ecDNA), los cuales inducen estrés oxidativo en las células no irradiadas, o bien; pueden activar células inmunes (macrófagos y linfocitos T) que participan en la respuesta inflamatoria y en la producción de ROS y NO que dan lugar a una disfunción a nivel mitocondrial que puede exacerbar el proceso oxidativo al liberar más ROS y RNS [21].

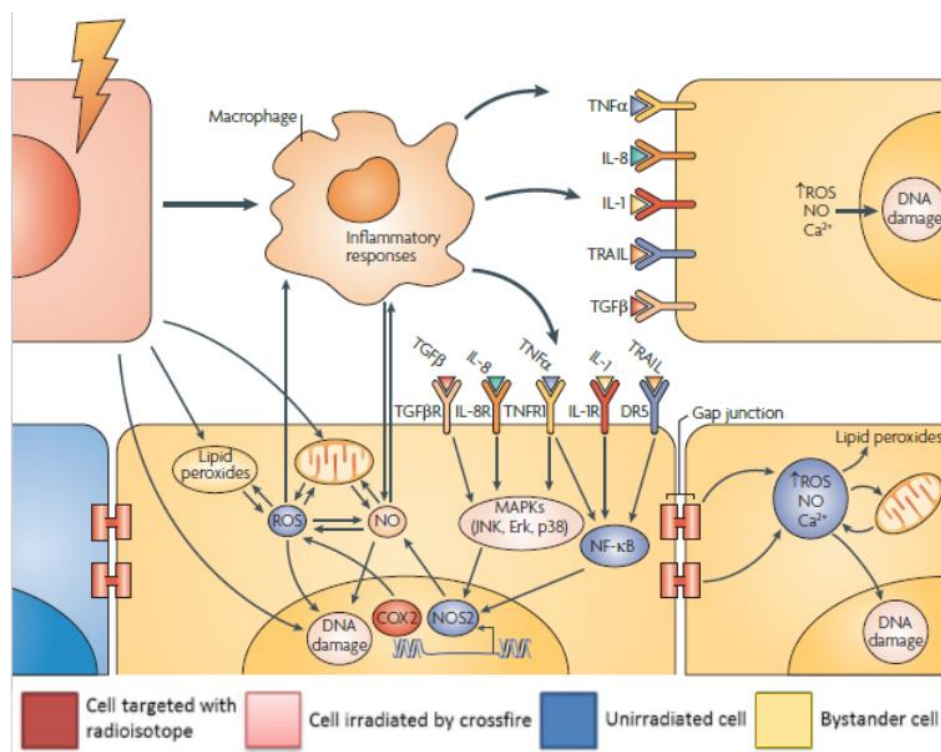


Figura 1.7. Representación esquemática de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta bystander.

1.4 Cáncer y características biológicas

El cáncer es el resultado del crecimiento descontrolado de un tipo de células que ocurre junto con la invasión de tejidos circundantes y la propagación de células malignas [25]. De acuerdo con Hanahan y Weinberg (2000), seis alteraciones fisiológicas esenciales caracterizan a una célula tumoral: señalización autocrina anormal que contribuye al crecimiento incontrolado de las células de cáncer, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), ilimitado potencial de replicación, angiogénesis ininterrumpida, e invasión de tejidos y metástasis [26,27]. Recientemente, se han integrado dos nuevas características distintivas de las células de cáncer. Uno de ellas involucra la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular a fin de apoyar eficientemente la proliferación neoplásica, y la otra es la evasión de la respuesta inmunológica [27]. Detrás de estas características, se encuentra la inestabilidad del genoma, la cual genera la diversidad genética que facilita la adquisición de dichas característica, y también se encuentra procesos inflamatorios, que recientemente han mostrado ser importante en la proliferación de células malignas (Figura 1.8) [25].

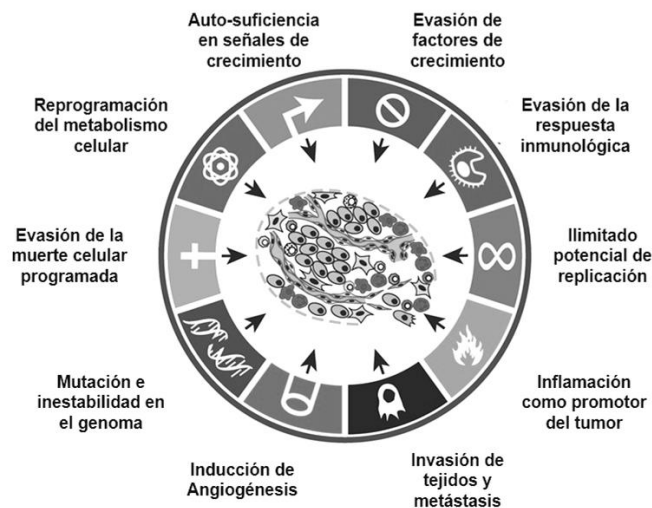


Figura 1.8. Características biológicas de las células de cáncer.

El paso de una célula normal a una célula de cáncer (proceso tumorigénico), puede ser dividido en tres fases: iniciación, promoción y progresión del tumor. Durante la iniciación, el ADN muta por carcinógenos químicos o físicos, permitiendo la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores. La promoción tumoral, se caracteriza por utilizar factores que estimulan el crecimiento del tumor. En esta fase, la inflamación y varias citoquinas- tales como interleucina-1 (IL-1), IL-6 y factores de necrosis tumoral- pueden promover el crecimiento del tumor. Finalmente, la progresión del tumor se caracteriza por el incremento en el tamaño del tumor, la invasión y metástasis. Durante esta fase, nuevas mutaciones pueden ser adquiridas permitiendo a la célula de cáncer adquirir una ventaja sobre el crecimiento y tener más de un fenotipo maligno [25]. La activación de múltiples vías mediadas por receptores en las células de cáncer y en el microambiente del tumor son considerados como blancos moleculares para el desarrollo de agentes de imagen y terapia más eficientes (Figura 1.9) [28].

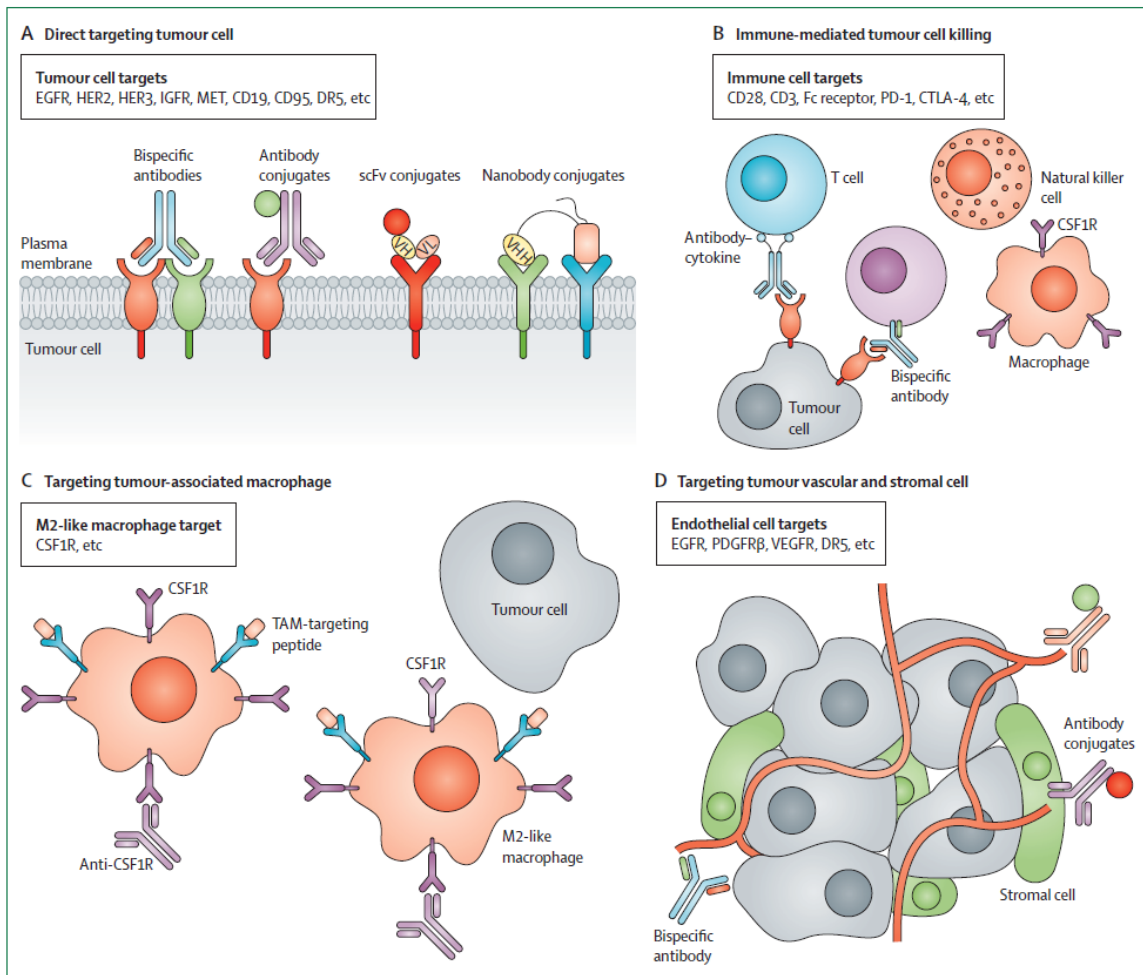


Figura 1.9. Blancos moleculares expresados en la célula de cáncer y en el microambiente del tumor.

Una de las características fenotípicas de las células de cáncer es la sobre-expresión de receptores de membrana que regulan el comportamiento celular. Entre estos receptores se encuentran los acoplados a proteínas G, que comprenden a una gran familia de receptores de superficie celular que regulan funciones biológicas como la proliferación, sobrevivencia y motilidad celular, y son clave en el crecimiento del tumor, angiogénesis y metástasis [29].

1.5 Función biológica del Receptor del péptido liberador de gastrina y del péptido Bombesina en cáncer

El receptor del péptido liberador de gastrina (GRPR) es un receptor de superficie celular acoplado a la proteína G que juega un papel importante en un amplio rango de funciones fisiológicas y fisiopatológicas en respuesta a la unión del péptido liberador de gastrina (GRP) [29]. El GRP es un péptido de 27 aminoácidos (Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) que estimula la secreción de hormonas/ neurotransmisores, la contracción de los músculos y tiene efectos sobre las células del sistema inmunológico. Además, el GRP está involucrado en las funciones del sistema nervioso central al regular el ritmo del ciclo circadiano, la liberación de TSH, la respuesta de ansiedad y termorregulación [30,31]. En las células de cáncer actúa como mitógeno, morfógeno y como factor pro-angiogénico [32]. Tanto el RNAm como la proteína del GRP y del GRPR están sobre-expresados en células de cáncer de pulmón, páncreas, estómago, mama, próstata, colon y en varios tumores del sistema nervioso central. La sobre-expresión y la unión GRP/GRPR desencadena diferentes mecanismos de señalización que estimulan el crecimiento, supervivencia, migración e invasión de las células de cáncer (Figura 1.10) [29,33]. Se ha sugerido que el GRP modifica el comportamiento dinámico del citoesqueleto de actina a través de la activación de quinasas de adhesión focal, que conducen a cambios en el movimiento celular e interacciones célula-célula y célula-matriz, favoreciendo la migración y agresividad de las células de cáncer que sobre-expresan GRP/GRPR [34,35], por lo que se consideran como factor pronóstico en la metástasis de cáncer de mama y puede ser usado para monitorear la respuesta a la terapia [36].

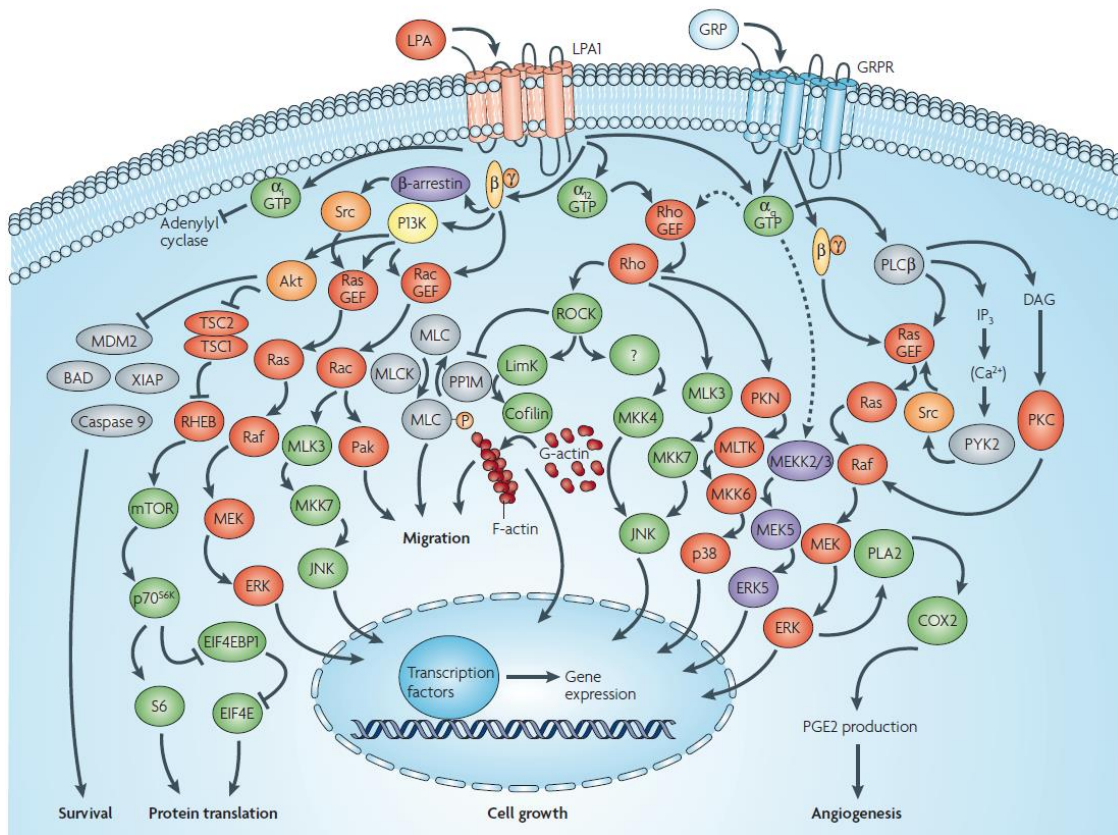


Figura 1.10. Cascada de señalización del GRPR y GRP.

La Bombesina (1-14) (BN) es un péptido con 14 aminoácidos (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) similar en estructura y función al GRP, ya que comparte una secuencia homóloga de 7 aminoácidos (Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) en la región C-terminal, la cual es necesaria para el reconocimiento específico y la alta afinidad al GRPR [33]. La BN al igual que el GRP induce la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, y participa en la migración y metástasis de células de cáncer al actuar sinérgicamente con mensajeros extracelulares, en particular con los agonistas de los receptores tirosina quinasa (Figura 1.11) [37-39]. Otra ventaja de la interacción Bombesina/GRPR en la biología del cáncer es su propiedad angiogénica, en el que se ha demostrado que la bombesina induce la expresión de marcadores angiogénicos como:

moléculas de adhesión plaqueto/endoteliales (PECAM-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y elevados niveles de proteínas quinasas p-AKT [30].

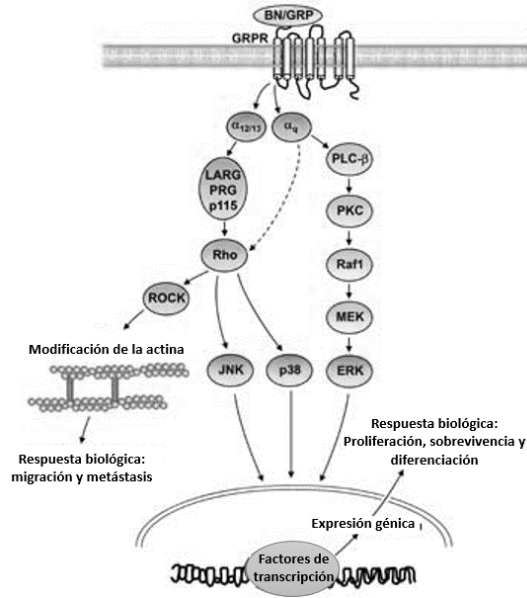


Figura 1.11. Respuestas biológicas inducidas por la interacción GRP/GRPR y BN/GRPR.

1.6 Análogos de Bombesina radiomarcados para diagnóstico y terapia

Con base en la interacción BN/GRPR y en la sobre-expresión del GRPR en las células de cáncer, el GRPR ha sido considerado como blanco molecular para el diseño y desarrollo de nuevos agentes de diagnóstico y terapia de cáncer [39]. Diferentes análogos de BN, incluidos BN (7-14) y BN (1-14), han sido marcados con radionúclidos emisores gamma y de positrones para obtener imágenes moleculares de tumores positivos a GRPR utilizando las técnicas SPECT y PET.

Para SPECT, se han utilizado diversos análogos de bombesina marcados con ^{99m}Tc para detectar y estadificar el cáncer de mama así como para identificar ganglios linfáticos afectados [31]. Específicamente, el análogo Lys³-Bombesina (1-14) marcado con ^{99m}Tc (^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-Lys3-BN) mostró alta estabilidad en suero humano, unión específica

al receptor y rápida internalización en células positivas a GRPR. La biodistribución de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Lys³-BN mostró una rápida eliminación en sangre y excreción renal [40]. Las imágenes de SPECT en pacientes con cáncer de mama mostraron una captación asimétrica en la mama con alta acumulación en las regiones tumorales [41]. Es importante mencionar que, la diversidad de estos radiopéptidos marcados con ^{99m}Tc , radica principalmente en los diferentes agentes quelantes bifuncionales, coligantes y linkers utilizados para su síntesis (Figura 1.12) [31].

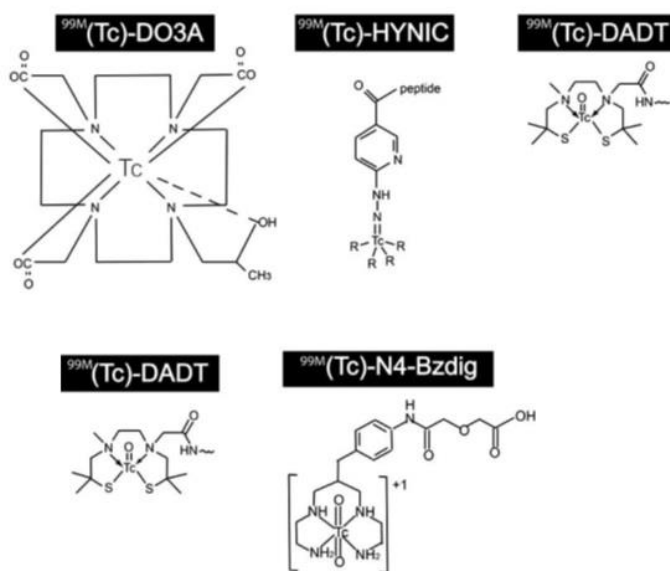


Figura 1.12. Estructura química de linkers comunes utilizados para marcar análogos de Bombesina con ^{99m}Tc .

Asimismo, los análogos de BN, tanto agonistas como antagonistas, se han marcado con ^{177}Lu para evaluar *in vitro* e *in vivo* su potencial para el tratamiento de cáncer (tabla 1.2). Por ejemplo, ^{177}Lu -DO3A-CH₂CO-G-4-amonobenzoilo-Q-W-A-V-G-H-L-M.NH₂ (^{177}Lu -AMBA) mostró ser un agente terapéutico eficaz durante tratamientos *in vivo* ya que disminuyó la tasa de crecimiento del tumor y prolongó la vida del ratón [42]. De igual manera, se han hecho modificaciones en los derivados de bombesina, como la unión de

polietilenglicol (PEG), con el fin de aumentar la captación y mejorar la retención en el tumor [43]. Sin embargo, las mayoría de los análogos de BN marcados con ^{177}Lu tienen una captación significativamente alta en páncreas, por lo que pocos radiopéptidos se han evaluado a nivel clínico [7].

Tabla 1.2. Análogos de Bombesina marcados con ^{177}Lu y captación en el tumor.

Radiopéptido	Captación en el tumor
^{177}Lu -DO3A-amide-b-Ala-BBN(7-14)NH ₂	-
^{177}Lu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH ₂	4.22±1.09 (1h, PC-3)
^{177}Lu -BZH2	0.79±0.06 (4h, AR4-2J)
^{177}Lu -AMBA	6.35±2.23 (1h, PC-3)
^{177}Lu -DOTA-PEG ₄ -BBN(7-14)NH ₂	7.46±1.63 (4h, PC-3)
^{177}Lu -DOTA-BBN(2-14)NH ₂	-
^{177}Lu -DOTA-PEG _{5k} -Lys-BN	3.43±0.63 (1h, PC-3)
^{177}Lu -RM2	10.97±0.99 (4h, PC-3)

1.7 Función biológica del Receptor de folato y del ácido fólico en cáncer

El receptor de folato (FR) está representado por una familia de glicoproteínas ricas en cisteínas (38 a 45 kDa) que están unidas a la membrana plasmática por un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI), su función es transportar y acumular folatos o ácido fólico dentro de la célula mediante endocitosis (Figura 1.13), dicho proceso regula la homeostasis de folato y puede conferir una ventaja sobre el crecimiento y división celular al modular la captación de folato del suero o al generar señales regulatorias [44,45].

En humanos se han identificado tres genes que codifican receptores de folato funcionales: FR α , FR β y FR γ (también conocidos como FOLR1, FOLR2 y FOLR3; respectivamente). La expresión de receptores de folato está restringida a células que participan en el desarrollo embrionario (placenta y tubos neurales) y en la reabsorción de folato (riñones). Entre las tres isoformas, el FR α se expresa ampliamente, con bajos niveles en tejidos normales pero con

altos niveles en adenocarcinomas de ovario, útero, mama, cérvix, riñón y colon, así como también en coriocarcinoma testicular, tumores cerebrales endodimarios, mesotelioma pleural maligno y tumores de la glándula pituitaria [46,47].

Se ha sugerido que en etapas tempranas de la carcinogénesis, el FR α incrementa la captación de folato para estimular la reparación ADN y conferir una ventaja en el crecimiento y progresión del tumor [48]. Durante la progresión del tumor, se encontró que la expresión de FR α está asociada con la resistencia a la terapia en cáncer de ovario, al mediar la resistencia a la apoptosis y al apoyar la motilidad celular [49].

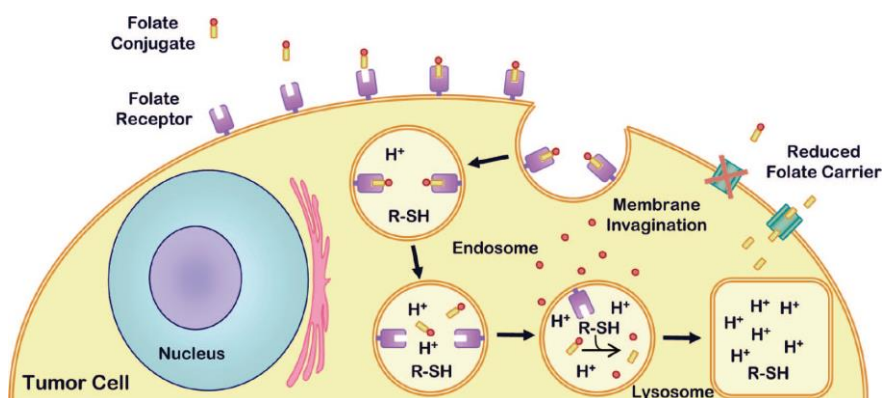


Figura 1.13. Endocitosis mediada por el receptor de folato

El ácido fólico en su forma oxidada o folato (Figura 1.14) es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en numerosas reacciones bioquímicas a través de su habilidad para donar o aceptar unidades de un sólo átomo de carbono, las cuales son importantes en el metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos (Figura 1.15) [50]. En el metabolismo de ácidos nucleicos, las coenzimas de folato juegan un papel importante en la síntesis y reparación del ADN o ARN. En el metabolismo de aminoácidos, el folato es requerido para la síntesis de metionina, serina, glicina, cisteína y homocisteína. La síntesis de metionina es

La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa el ácido fólico o folato hacen que éste sea una molécula esencial para una rápida proliferación celular [51]. Se ha demostrado que la interacción del folato con el FR α contribuye en el crecimiento y progresión de las células de cáncer al regular la proliferación, migración e invasión celular. Por otro lado, es bien conocido que la deficiencia de folato altera el metabolismo de un átomo de carbono y por tanto el suministro de grupos metilo, lo que promueve la hipometilación del ADN e inestabilidad cromosómica favoreciendo la carcinogénesis [54-56].

1.8 Derivados de Folato radiomarcados para diagnóstico y terapia

El ácido fólico emergió como un agente de diagnóstico y terapia de cáncer debido a su alta afinidad al receptor FR α y a la dependencia de folato de muchos tumores, así como a sus propiedades no tóxicas y no-inmunogénicas. Con respecto al desarrollo de radiotrazadores, otras ventajas de utilizar el ácido fólico son su accesibilidad para la modificación química y su robustez frente a temperaturas elevadas que a menudo son necesarios para procedimientos de radiomarcaje [57]. Por tales motivos, el ácido fólico es considerado como caballo de Troya al liberar selectivamente agentes para imagen o terapia a células +FR [58].

En las últimas dos décadas se han desarrollado y evaluado tanto *in vitro* como *in vivo* una variedad de radiofolatos para imagen nuclear SPECT y PET. En el caso de los derivados de folato para SPECT, el ^{99m}Tc ha sido el radionúclido más utilizado debido a sus propiedades físicas de decaimiento (emisión $\gamma=140$ keV, $t_{1/2}=6$ h), bajo costo y fácil producción [58]. Varios agentes quelantes han sido utilizados para marcar al ácido fólico con ^{99m}Tc , tales como etilendicisteína (EC) [59,60], ácido dietilentriamina-penta-acético (DTPA) [61,62], hidracina-nicotinamida (HYNIC) [63-67], mercapto-acetil-N-Gly-Gly-Gly (MAG3) [68] y tricarbonilo (CO) $_3$ [69], así como también otros sistemas de coordinación [70-72]. Muchos

de estos conjugados mostraron alta afinidad al receptor de folato pero alta captación en los riñones, debido a que las células del túbulo proximal absorben y retiene folato como un proceso fisiológico para prevenir la pérdida de vitaminas [73]. Sólo uno de estos radioconjugados -^{99m}Tc-EC20 (EtarfolideTM, Endcyte Inc.)- ha sido evaluado en humanos y actualmente se emplea en varios ensayos clínicos para la selección de pacientes que pueden beneficiarse con terapias dirigidas para tumores positivos a receptores de folato [49,74].

Por otro lado, la alta captación de radiofolatos en los riñones ha sido un factor limitante para la aplicación de estos derivados en la terapia contra el cáncer. Se considera que usar conjugados de ácido de fólico marcados con radionúclidos emisores de partículas β^- como el ¹⁷⁷Lu, pueden comprometer significativamente el riesgo de daño en los riñones debido a las altas dosis de radiación [75].

Varias estrategias se han investigado para minimizar el riesgo de radionefropatía después de la terapia dirigida con radionúclidos [76,77]. Por ejemplo, el método más exitoso para reducir la captación de radiopéptidos en los riñones, es la co-administración de aminoácidos catiónicos, el cual fue demostrado por primera vez por Hammond et al. (1993) [78]. Este concepto también se evaluó en combinación con radiofolatos, pero la aplicación de L-lisina y L-glutamato, no tuvo impacto en la retención renal de la radiactividad [79]. Estudios preclínicos han mostrado que la administración de dosis sub-terapéuticas y terapéuticas del antifolato Pemetrexato, reducen la captación de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bz-EDA-folato (¹⁷⁷Lu-EC0800) en los riñones hasta un 80%, mientras que la acumulación en el tumor no se ve afectada con dosis sub-terapéuticas pero incrementa con dosis terapéuticas [80]. Recientemente se desarrolló un derivado de folato (¹⁷⁷Lu-cm09) que contiene albumina en su estructura (Figura 1.16). Esta modificación mejoró la vida media de ¹⁷⁷Lu-cm09 en suero

humano como consecuencia de la unión a proteínas. Comparado con el radiofolato ^{177}Lu -EC0800, ^{177}Lu -cm09 mostró un incremento en la captación del tumor y redujo el tiempo de retención y toxicidad en los riñones [75,81].

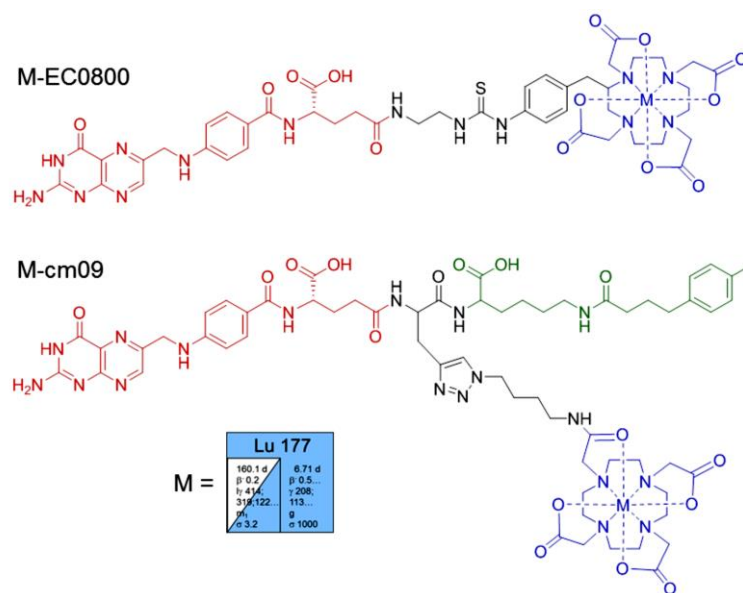


Figura 1.16. Estructura química de ^{177}Lu -EC0800 y ^{177}Lu -cm09.

1.9 Imagen metabólica de las células de cáncer

El metabolismo hace referencia a las reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas que toman lugar dentro de las células para mantener la homeostasis. Estas reacciones están organizadas dentro de rutas metabólicas, las cuales están reguladas por la concentración y eficacia catalítica de enzimas y así como también de la concentración de cofactores [82].

Las células de cáncer tiene únicos requerimientos metabólicos caracterizados por mejorar la captación de nutrientes y rutas metabólicas, para soportar la biosíntesis de macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) que son necesarias para el crecimiento y división

celular (Figura 1.17). Estas rutas incluyen la síntesis de novo de purinas y pirimidinas (timidina monofostato) dependientes de folato [83].

Numerosos estudios han demostrado que los tumores malignos pueden ser detectados con alta sensibilidad por imagen del metabolismo de la glucosa, aminoácidos o lípidos utilizando tomografía por emisión de positrones (Tabla 3.1) [84,85].

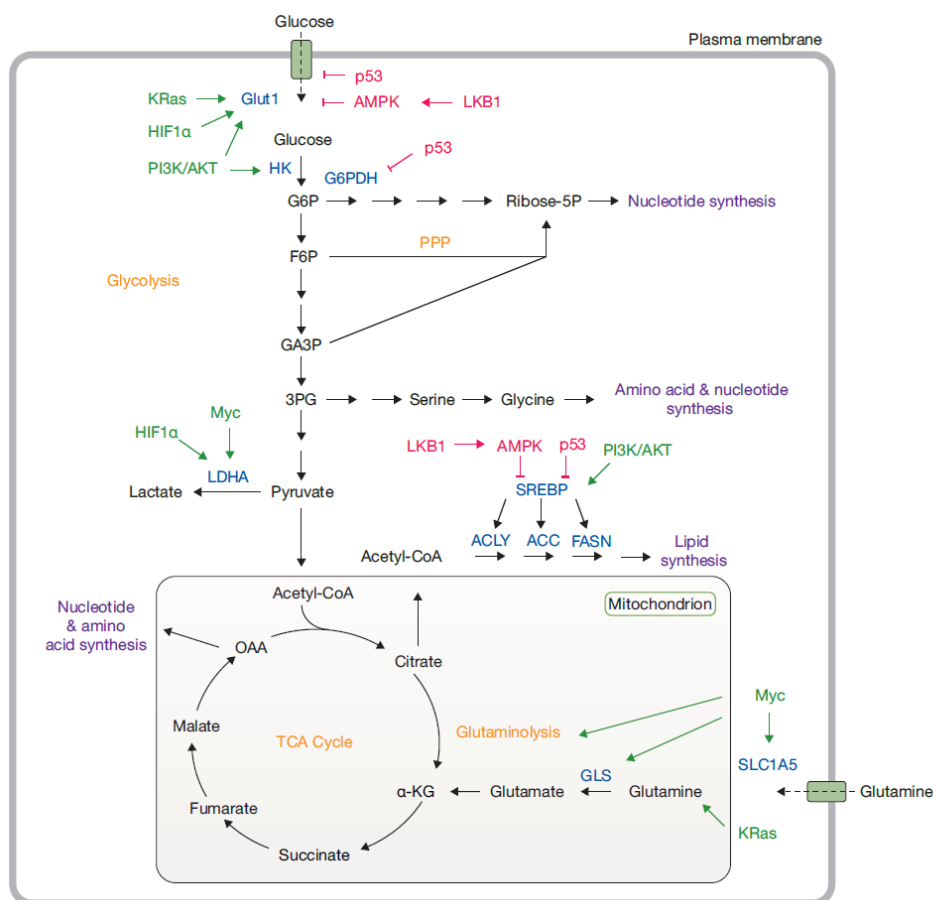


Figura 1.17. Rutas metabólicas involucradas en la síntesis de nucleótidos, aminoácidos y lípidos.

Tabla 3.1. Radiofármacos utilizados para evaluar metabolismo mediante PET		
Biomarcador	Vida media (min)	Aplicación
<i>Metabolismo en metástasis</i>		
¹⁸ F-Fluoride	110	Metabolismo osteoblástico
<i>Metabolismo energético en tumor</i>		
¹⁸ F-FDG	110	Metabolismo de glucosa
¹⁸ F-FTHA	110	Metabolismo de ácidos grasos
¹¹ C-Palmitate	20.4	Metabolismo de ácidos grasos
¹¹ C-Acetato	20.4	Metabolismo oxidativo
¹¹ C-Acetoacetato	20.4	Metabolismo de cuerpos cetona
¹¹ C-glucosa	20.4	Metabolismo de glucosa
<i>Metabolismo en tumor</i>		
¹⁸ F-FLT	110	Síntesis de ADN
¹⁸ F-FDOPA	110	Transporte de aminoácidos
¹⁸ F-FACBC	110	Transporte de aminoácidos
¹¹ C-Metionina	20.4	Metabolismo de proteínas
¹¹ C-Colina	20.4	Componente de membrana
¹⁸ F-Flurometilcolina	110	Componente de membrana
¹⁸ F-Fluroetiltirosina	110	Metabolismo de aminoácidos
¹⁸ F-Fluroglutamina	110	Glutaminólisis
¹⁸ F-FPGln	110	Glutaminólisis

Como bien se sabe, muchas de las células de cáncer generan ATP mediante el metabolismo anaeróbico de la glucosa a lactato en el citoplasma, incluso en presencia de niveles de oxígeno que podrían soportar el metabolismo aeróbico mitocondrial (efecto Warburg). A pesar de que este fenotipo metabólico permite a las células de cáncer generar ATP rápidamente, el número de moléculas de ATP producidas por cada molécula de glucosa es mucho más bajo que las producidas por el metabolismo mitocondrial, aumentando la demanda de glucosa en las células de cáncer [86]. Con base en este fundamento y considerando que en las células de cáncer se sobre-expresan transportadores de glucosa GLUT1 y enzimas glucolíticas, el análogo de glucosa ¹⁸F-FDG ha sido el radiofármaco de rutina que se utiliza para medir el transporte celular y metabolismo de la glucosa utilizando la tomografía por emisión de positrones (PET). Este análogo de glucosa entra a la célula de

la misma manera que la glucosa y es fosforilada por la hexoquinasa para formar ^{18}F -FDG-6-fosfato, el cual no es metabolizado por las enzimas permitiendo su acumulación en las células, lo que proporciona un indicador de la demanda de glucosa (Figura 1.18) [84,86,87].

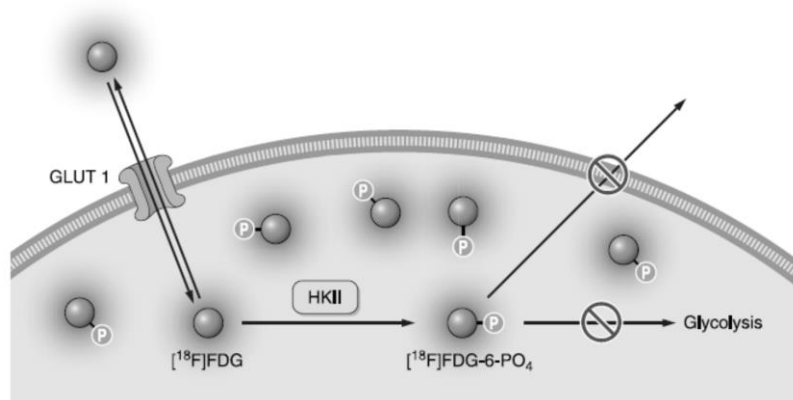


Figura 1.18. Mecanismo de captación y acumulación de ^{18}F -FDG

El ^{18}F -FDG también se ha utilizado para evaluar la respuesta al tratamiento con agentes quimioterapéuticos convencionales y/o radioterapia, con la premisa de que una disminución en la glucólisis puede ocurrir en tumores que son sensibles a la terapia y que los tumores que son resistentes al tratamiento no mostrarán cambios en el metabolismo de la glucosa [88].

Existen diferentes métodos para medir los cambios en el metabolismo de la glucosa mediante la tasa o cantidad total de acumulación de ^{18}F -FDG en el tumor. Uno de los métodos más utilizados es el valor semi-cuantitativo denominado SUV, que estima la concentración de la actividad *in vivo* (kBq/ml) a partir de imágenes estáticas a un tiempo dado, tomando en cuenta el peso del paciente y la actividad inyectada del paciente [89].

Sin embargo, la imagen del ^{18}F -FDG tiene algunas limitaciones: 1) falsos positivos en algunos procesos benignos como inflamación e infección, 2) acumulación en regiones normales como tejido linfoide, 3) En gliomas, tiene pobre relación tumor-fondo debido a los altos niveles de captación de glucosa en el cerebro normal, 4) carece de utilidad clínica en

cáncer de próstata debido a su alta excreción renal y baja expresión de transportadores GLUT1. Nuevos radiotrazadores se están desarrollando para hacer frente a estas deficiencias, así como explorar otras vías metabólicas que permitan obtener imágenes moleculares [88]. Análogos de glucosa marcados con ^{99m}Tc también han sido evaluados en modelos murinos para evaluar el metabolismo de la glucosa en el tumor. Estos compuestos de glucosamina han mostrado alta acumulación en el tumor, sin embargo, la captación en el cerebro ha sido baja, lo que pone en duda si este compuesto puede medir metabolismo de la glucosa [90,91].

1.10 Radiofármacos heterobivalentes

El concepto de heterobivalente hace referencia a compuestos que se unen a dos blancos moleculares diferentes que se expresan en una misma célula, siempre y cuando la afinidad de uno de los ligantes no interfiera con la unión del otro con su blanco correspondiente[92]. Las moléculas heterobivalentes radiomarcadas han mostrado que mejoran sus propiedades con respecto a los monómeros, ya que aumentan la captación en el tumor, mejoran la relación tumor-fondo y prolongan la retención en el tumor [93,94], por lo que han mostrado ser una estrategia adecuada para obtener imágenes del tumor de manera sensible, específica y no invasiva. Estas características se deben principalmente a que los sistemas heterobivalentes interactúan concomitantemente con sus respectivos blancos moleculares, lo cual mejora la afinidad de unión y disminuye la tasa de disociación entre el conjugado y los receptores blanco (Figura 1.19) [92-95].

Algunos requisitos para el diseño de un conjugado heterobivalente son [92]: expresión concomitante de los receptores blanco en la célula de cáncer, alta sobre-expresión de por lo menos uno de los receptores mientras que el otro puede estar moderadamente expresado, pero idealmente ambos receptores deben presentar altas densidades, ambos ligantes deben

exhibir por lo menos moderada afinidad para sus respectivos receptores, la farmacocinética y la afinidad de los ligantes no debe alterarse después de la conjugación, la estructura que une a ambos ligantes debe permitir la unión simultánea a sus respectivos receptores.

El sistema heterobivalente que más se ha evaluado en estudios preclínicos es la secuencia c(RGDyK)-Bombesina (7-14), la cual se ha marcado con emisores de positrones como ^{18}F , ^{68}Ga y ^{64}Cu , con el propósito de diagnosticar tumores positivos a receptores $\alpha_5\beta_3$ (T47D, MDAMB-435) y GRPR (PC-3) utilizando la técnica de imagen PET. La conjugación covalente de ambos péptidos fue con el propósito de reducir los problemas observados con los monómeros tales como, la lipofilia y excreción hepatobiliar de la Bombesina (7-14), y la rápida excreción renal del c(RGDyK); así como también la baja acumulación en el tumor y la estabilidad *in vivo* de ambos compuestos [94,96-100].

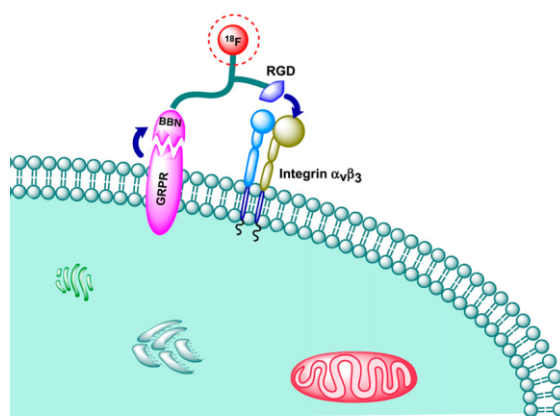


Figura 1.19. Molécula heterobivalente.

Recientemente, biomarcadores de superficie celular como el antígeno de membrana prostático específico (PSMA) y el receptor GRP han recibido considerable atención como blancos para el desarrollo de conjugados heterobivalentes radiomarcados con el fin de mejorar el diagnóstico de cáncer de próstata. Por ejemplo, el conjugado ^{68}Ga -inhibidor PSMA-Bombesina (6-14), mostró que puede unirse eficientemente a PSMA y a GRPR en células de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP, lo que mejoró la sensibilidad de detección.

Además, los perfiles de biodistribución se optimizaron al incorporar una secuencia de aminoácidos cargados, la cual redujo significativamente la captación en órganos normales como los riñones y el hígado [101,102].

2. Planteamiento del problema

¿Se podrá optimizar la detección específica de las células de cáncer de mama positivas a receptores del péptido liberador de gastrina (GRPR) y de folato (FR) mediante la interacción concomitante de la Bombesina y del Folato de los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ con sus respectivos receptores?

¿Se podrá obtener información de la actividad metabólica de dichas células a través de la captación mediada por el reconocimiento específico del Folato de la molécula $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$?

¿Será suficiente la captación específica del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ para producir una dosis absorbida terapéutica en tumores de cáncer de mama debido a la interacción concomitante de la Bombesina y del Folato con los receptores GRPR y FR?

3. Justificación

La importancia de desarrollar a los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$, es que con estos radiofármacos se podrá optimizar la captación *in vivo* en células de cáncer mama positivas a receptores FR y GRPR debido al efecto concomitante que produce la unión específica GRPR-Bombesina y FR-folato, con el fin de mejorar la detección de dicha neoplasia mediante imagen SPECT. Asimismo, al tomar en cuenta que el ácido fólico participa en procesos de biosíntesis de ADN y ARN y en el metabolismo de aminoácidos se podrá evaluar la actividad metabólica de dichas células mediante la cuantificación por imagen de la captación mediada por el folato del conjugado heterobivalente $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$. Por otro lado, al considerar la emisión de partículas β^- del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ y su internalización celular a través de la unión específica de la Bombesina y el folato a los receptores GRPR y FR se podrá tener una mayor contribución en la dosis absorbida en las células de cáncer de mama + GRPR y +FR.

4. Hipótesis

Si las células de cáncer de mama sobre-expresan GRPr y FR con el consecuente incremento del índice proliferativo y de la actividad metabólica entonces una nueva molécula heterobivalente del tipo $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ (Figura 4.1) y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ (Figura 4.2) será útil para: (i) la detección específica in vivo de cáncer de mama y posibles metástasis a ganglios linfáticos, (ii) obtener información de la actividad metabólica del tumor, y (iii) radioterapia de blancos moleculares específicos cuando se utiliza con ^{177}Lu .

Hipótesis alterna: El reconocimiento específico de los receptores GRPr y FR mediante los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ será suficiente para al menos una de las siguientes opciones: (i) detectar in vivo de manera específica el cáncer de mama, (ii) evaluar la actividad metabólica de células de cáncer de mama a partir de imágenes moleculares, y (iii) radioterapia de blancos moleculares específicos cuando se utiliza con ^{177}Lu .

Hipótesis nula: El reconocimiento específico de los receptores GRPr y FR mediante los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ será insuficiente para: (i) detectar in vivo de manera específica el cáncer de mama, (ii) evaluar la actividad metabólica de células de cáncer de mama a partir de imágenes moleculares, y (iii) radioterapia de blancos moleculares específicos cuando se utiliza con ^{177}Lu .

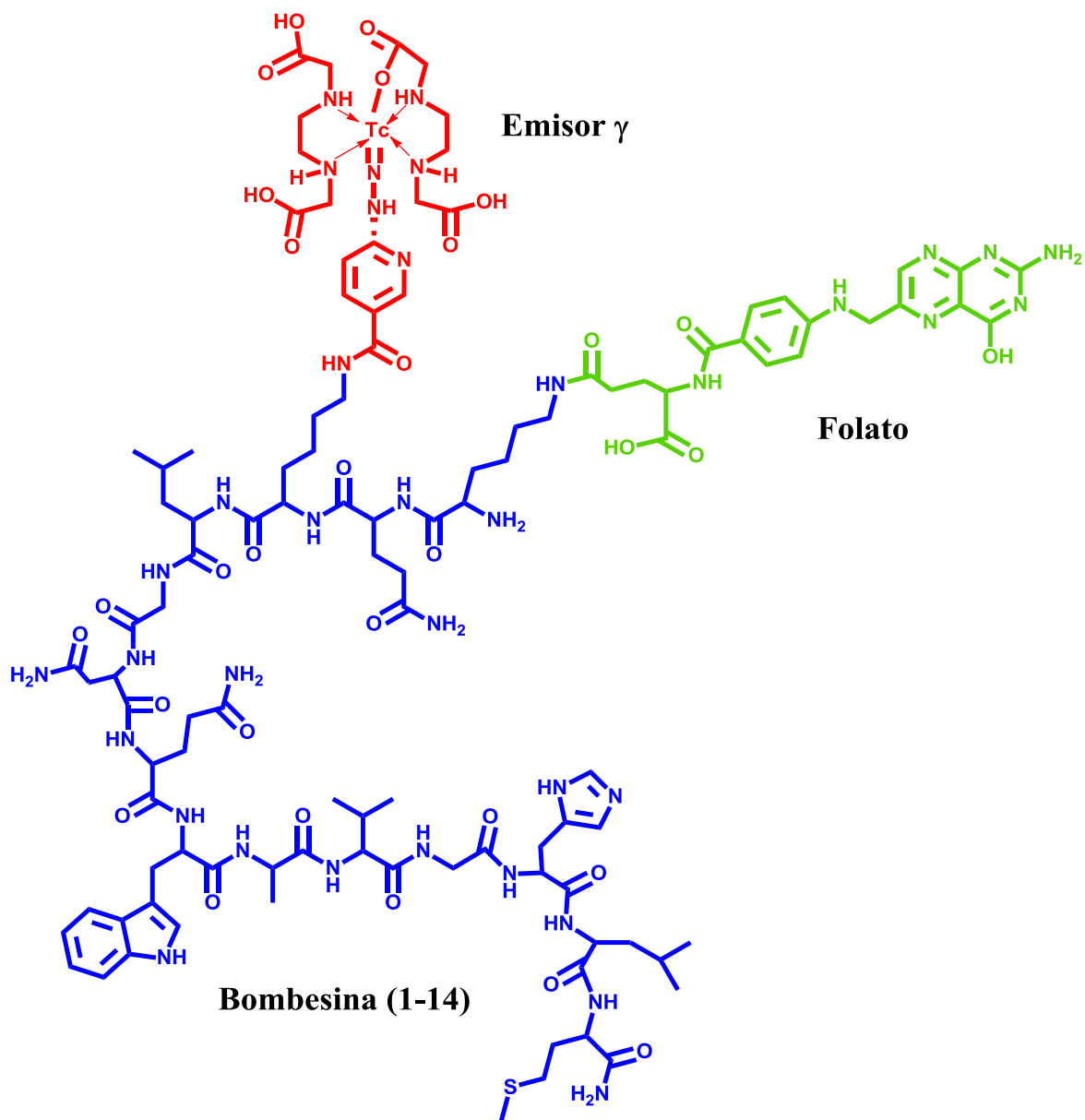


Figura 4.1. Estructura del conjugado heterobivalente $Lys^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})Lys^3(^{99m}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$

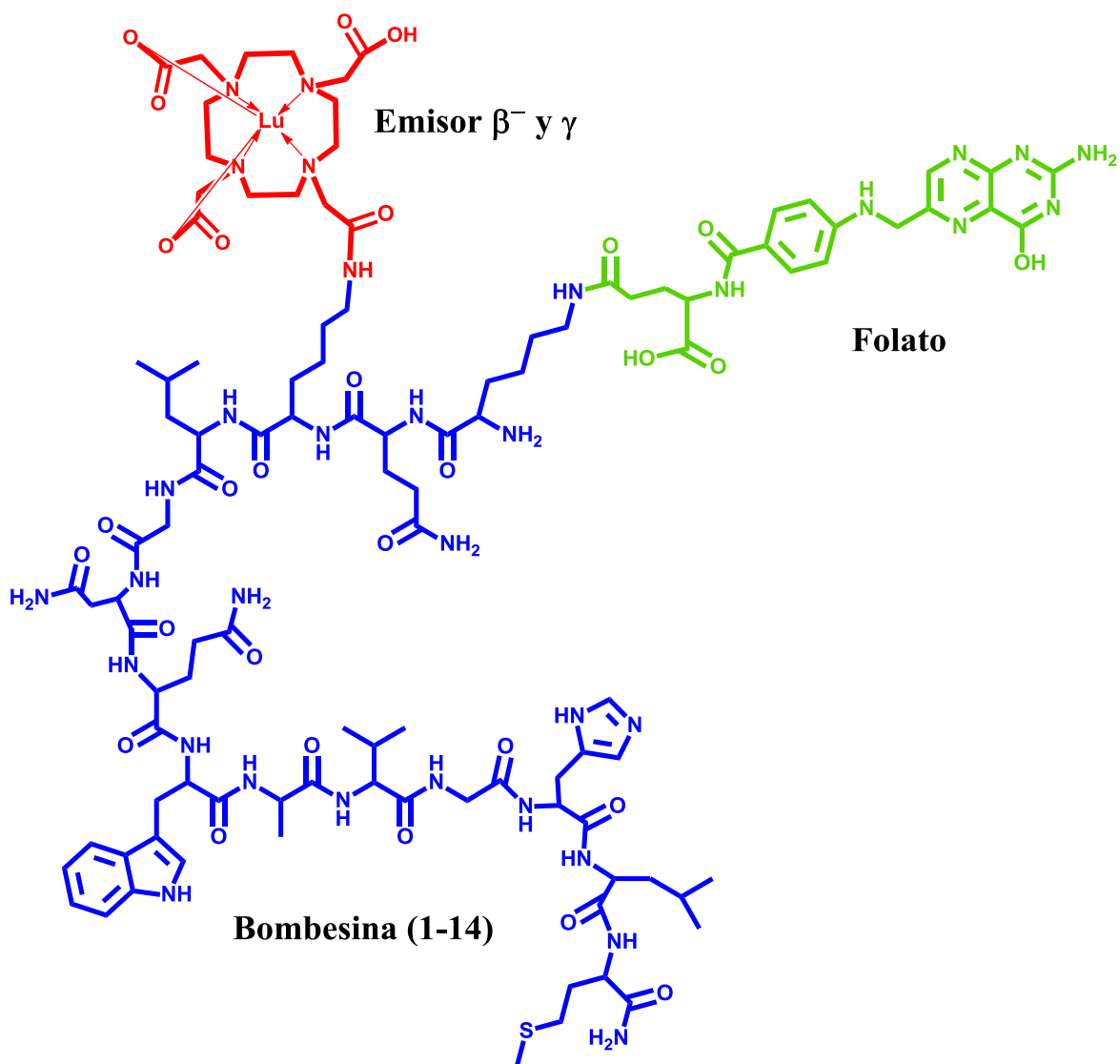


Figura 4.2. Estructura del conjugado heterobivalente $Lys^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})Lys^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$.

5. Objetivos: Objetivo general y específicos

5.1 Objetivo general

Sintetizar, radiomarcarse y caracterizar químicamente a $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ con la finalidad de evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* su potencial como radiofármacos heterobivalentes para diagnóstico y/o tratamiento de cáncer de mama positivo a receptores del péptido liberador de gastrina (GRPR) y de folato (FR). Adicionalmente, se evaluó el potencial de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ para medir la actividad metabólica de células de cáncer de mama +RF y +GRPR a través de imágenes SPECT.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar por espectroscopia UV-Vis e IR-FT el ácido fólico y los péptidos $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ y $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$.
2. Realizar la síntesis de los conjugados $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ y caracterizarlos por espectroscopia UV-Vis, IR-FT y espectrometría de masas MALDI-TOF.
3. Realizar el radiomarcado del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ con ^{177}Lu .
4. Evaluar la pureza radioquímica de los conjugados $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina}(1\text{-}14)$ por HPLC en fase reversa.

5. Evaluar la estabilidad en suero humano de los conjugados $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ a diferentes tiempos.
6. Evaluar la afinidad de los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ a la proteína recombinante del receptor GRP y a la proteína humana del receptor de Folato mediante un ensayo de competencia.
7. Evaluar la captación *in vitro* de los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ en células de cáncer de mama T47D.
8. Realizar la biodistribución de los conjugados $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ en ratones atómicos con tumores inducidos T47D.
9. Obtener imágenes *in vivo* de la actividad metabólica de tumores inducidos T47D positivos a receptores FR y GRPR en ratones atómicos mediante la administración del conjugado heterobivalente $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$.
10. Obtener imágenes *in vivo* de la actividad metabólica en ratones atómicos con tumores inducidos T47D utilizando $^{18}\text{F-FDG}$ y $^{99\text{m}}\text{Tc-Folato}$ para comparar con las imágenes obtenidas con $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$.
11. Realizar la biocinética y dosimetría de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ a partir de los estudios de biodistribución en ratones atómicos con tumores inducidos T47D.

6. Material y Métodos

6.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Este estudio tiene un enfoque cuantitativo estructurado, transversal, observacional, descriptivo y de seguimiento de medidas experimentales con asignación aleatoria y grupo control.

6.2 Universo y Muestra

Universo: Línea celular de cáncer de mama T47D y ratones atómicos de 20 a 22 g con tumores inducidos con células T47D.

Tamaño de muestra: 30 millones de células T47D para estudios *in vitro* y 60 ratones atómicos con tumores inducidos T47D.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión. Pureza radioquímica de los radioconjugados mayor a 90 %. Cultivos celulares de T47D libres de bacterias, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 100 % de humedad, en medio RPMI-libre de folato con suplemento de suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (100 µg/mL de estreptomycin). Ratones atómicos con peso de 20 a 22 gramos y tumores inducidos con células T47D.

Criterios de exclusión. Pureza radioquímica de los radioconjugados heterobivalentes menor al 95 %. Líneas celulares sin proliferación. Ratones con sospecha de inexistencia de tumor.

Criterios de eliminación. Líneas celulares contaminadas e inestables en el crecimiento durante los procesos de medición. Ratones que mueran, durante la administración del radioconjugados, y los que tengan más de un tumor.

6.4 Procedimientos para la síntesis y evaluación *in vitro* e *in vivo* del conjugado heterobivalente $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$

6.4.1 Síntesis de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$

La síntesis de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ se basó en una reacción de acoplamiento para la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo activados del ácido fólico y la amina de la Lys^1 del péptido $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ (Figura 6.1).

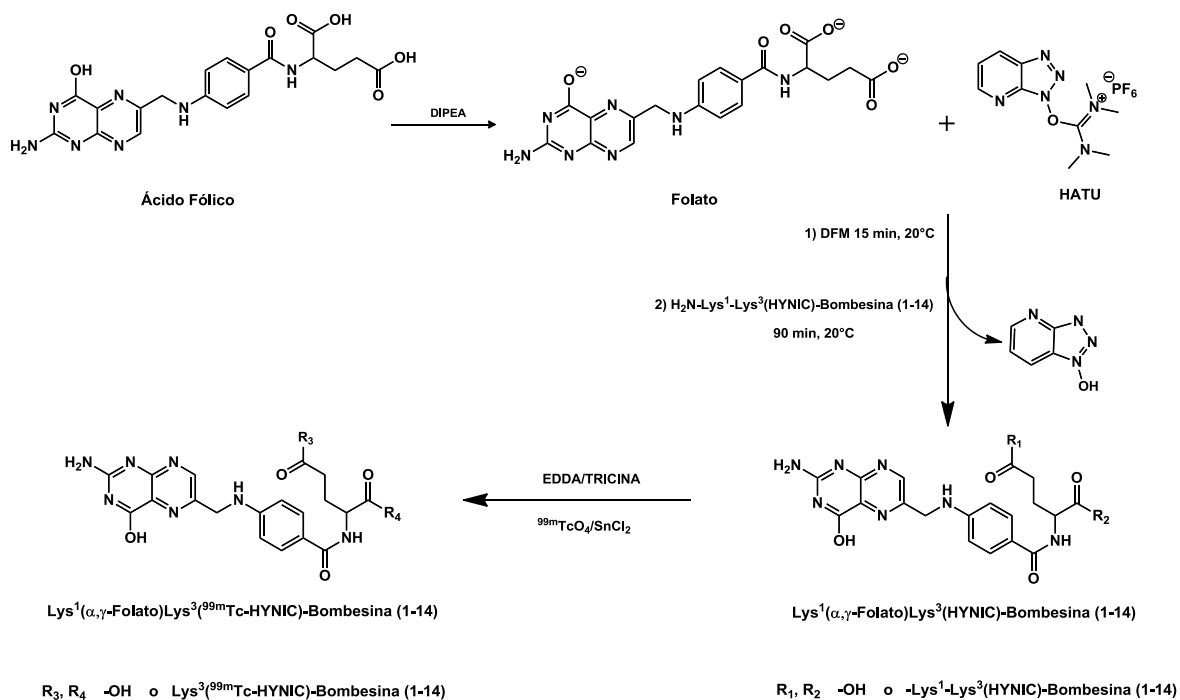


Figura 6.1. Síntesis y radiomarcado de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$.

Activación de los grupos carboxilato: 80 μ L de una disolución de ácido fólico a 22.5 mM (2.25 μ mol; 1 mg en 100 μ L de DMF) se agregaron a una mezcla que contiene 50 μ L de N,N-Diisopropiletilamina a 0.2 M (9.3 μ mol; 1.2 mg in 50 μ L de DMF) y 50 μ L del agente activador HATU (2.63 μ mol, 1 mg en 50 μ L de DMF). La mezcla de reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente (20°C).

Formación del enlace amida: A 80 μ L de la solución anterior (1 μ mol de folato activado) se le adicionaron 20 μ L (0.57 μ mol; 50 mg/mL agua grado inyectable) de Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14). La mezcla de reacción se incubó por 90 min a temperatura ambiente (20°C) y se llevó a sequedad al vacío. La mezcla se reconstituyó en 0.5 mL de agua inyectable y se purificó por cromatografía de alta resolución (HPLC) de exclusión molecular con detector de UV-vis, usando una columna YMCPack-diol-60 (8 mm x 500 mm I.D), flujo de 0.7 mL/min y agua grado HPLC como fase móvil. Se recolectó la fracción con un tiempo de retención de 13.83 min y se llevó a sequedad al vacío. Cabe mencionar que el conjugado se mantuvo como una mezcla de regioisómeros Lys¹(α -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesin(1-14) y Lys¹(γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14), por lo que se caracterizó y usó sin la separación de dichos derivados.

Para estudios comparativos HYNIC-GGC-Folato se preparó bajo el mismo procedimiento.

6.4.2 Caracterización química del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14)

Para la caracterización química del ácido fólico, del péptido Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) y del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) se emplearon técnicas espectroscópicas que permiten evaluar de manera cualitativa y/o cuantitativa el efecto de conjugación del folato a la bombesina. Las pruebas de caracterización que se

realizaron fueron Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia IR-FT y Espectrometría de masas utilizando la técnica de ionización MALDI-TOF.

Espectroscopia de UV-vis. El espectro de UV-vis para el ácido fólico (1 mg disuelto en 0.1 mol/l NaOH), Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) y del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) se obtuvieron en el rango de 200-700 nm con el espectrómetro Perkin-Elmer Lambda-Bio (Waltham, MA, USA) utilizando una celda de cuarzo de 1 cm.

Espectroscopia IR. El espectro de IR del ácido fólico, Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) y del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14), en estado sólido, se obtuvieron en un espectrómetro Perkin-Elmer (Spectrum 400) con una plataforma de ATR (GladiATR, Pike Technologies) utilizando una punta de diamante.

Espectrometría de masas con técnica de ionización MALDI-TOF. El espectro de masas de Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) se midió con el espectrómetro de masas microflex (Bruker, Billerica, MA, USA), operando en modo reflector y se utilizó como matriz el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. Los datos se procesaron con software Bruker Daltonics.

Modelado molecular. Las moléculas de los regioisómeros Lys¹(α -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14) y Lys¹(γ -Folato)Lys³(HYNIC)-Bombesina (1-14), se construyeron tomando en cuenta la valencia, el tipo de enlace, la posición del grupo carbonilo, la carga y la hibridación. Se calculó la energía mínima mediante el procedimiento MM3 y la energía mínima del conformero más estable mediante el procedimiento CONFLEX asociado con la geometría óptima de las estructuras utilizando el programa CAChe Pro 5.04 para Windows (Fujitsu Ltd., 2000-2001). Las moléculas calculadas también se modelaron con MOPAC-

PM5-COSMO (CaChe Pro 5.04) para evaluar el efecto del solvente (agua) sobre la estabilidad y arreglos estequiométricos de los regioisómeros en agua, los cuales definen el alcance de la reactividad frente a los iones metálicos. Asimismo, las moléculas calculadas se utilizaron para construir las moléculas marcadas con ^{99m}Tc , $\text{Lys}^1(\alpha\text{-Folato})\text{-Lys}^3(^{99m}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\gamma\text{-Folato})\text{-Lys}^3(^{99m}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$, las cuales también se calcularon por MM3 y CONFLEX.

6.4.3 Preparación de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ [^{99m}Tc - Folato-Bombesina]

El radiomarcado se llevó acabo al agregar 0.5 mL de una solución de EDDA-Tricina (30 mg de EDDA en 1.5 mL de 0.1 M NaOH y 60 mg de tricina en 1.5 mL de buffer de fosfatos a 0.2 M, pH=7), 10 μL de una solución de SnCl_2 (1 mg/mL, en 0.012 M HCl) y 0.5 mL de disolución de pertecnetato de sodio (GETEC-ININ, México, 740-925 MBq) a 70 μL de Folato-Bombesina (0.5 mg/mL). La disolución se incubó a una temperatura de 92°C en un baño seco durante 20 min. Posteriormente la solución se diluyó con 0.9% NaCl a la concentración descrita en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para efectos comparativos, $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-GGC}(\alpha,\gamma)\text{-Folato}$ ($^{99m}\text{Tc-Folato}$) y $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ ($^{99m}\text{Tc-Bombesina}$) se prepararon usando el mismo procedimiento de marcado.

6.4.4 Determinación de la pureza radioquímica del conjugado $^{99m}\text{Tc-Folato-Bombesina}$

La pureza radioquímica se determinó por HPLC en fase reversa acoplado a un detector de radiactividad (Radio-HPLC Detector IN/US System γ -RM model) y a un detector de UV

(Waters 2996 Photodiode Array Detector). Se utilizó una columna μ Bondapak C-18, 10 μ m, 125 A° (3.9 mm x 300 mm).

Se empleó un sistema de gradientes para la fase móvil utilizando TFA 0.1%/agua como solvente A y TFA 0.1%/acetonitrilo como solvente B a un flujo de 1 mL/min. El gradiente comenzó en 100% del solvente A durante 3 min, cambiando 50% del solvente A en 10 min, se mantuvo esta proporción por 10 min y se cambió a 30% del solvente A en 3 min, finalmente se regresó a 100% del solvente A por 4 min. Con este sistema, el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre tiene un tiempo de retención (t_R) de 3-3.5 min y el $^{99m}\text{Tc-EDDA/Tricina}$ un $t_R = 4.0- 4.6$ min.

6.4.5 Estabilidad en suero humano del conjugado $^{99m}\text{Tc-Folato-Bombesina}$

Para determinar la estabilidad en suero humano del conjugado $^{99m}\text{Tc-Folato-Bombesina}$, 200 μ L del radiofármaco se diluyeron en una relación 1:10 con suero humano fresco y se incubaron a 37°C. La estabilidad del radiofármaco se determinó a partir de 100 μ L de cada muestra tomadas a diferentes tiempos de 10 min a 24 horas mediante el análisis de los perfiles cromatográficos de UV y radiactividad obtenidos por HPLC de exclusión molecular (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, PBS). Un cambio en el perfil de radiactividad a un peso molecular mayor indicó unión a proteínas, mientras que el peso molecular más bajo indicó unión a la cisteína.

6.4.6 Afinidad del $^{99m}\text{Tc-Folato-Bombesina}$ a la proteína del receptor GRP y al receptor de Folato

Para evaluar la afinidad del conjugado $^{99m}\text{Tc-Folato-Bombesina}$ a la proteína recombinante del receptor del péptido liberador de gastrina GRP (Novus Biologicals, LLC, USA) y a la proteína humana del receptor de Folato (Sigma-Aldrich, SL, USA), se desarrollaron ensayos

de competencia por los sitios de unión entre la molécula Folato-Bombesina y el radiofármaco ^{99m}Tc -Folato-Bombesina. El perfil de competencia se obtuvo cuantificando el porcentaje de unión de una concentración constante de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina que permanece en la muestra a medida que se le añaden concentraciones crecientes de Folato-Bombesina.

Para el procedimiento se utilizó una microplaca de 96 pozos (Corning, NY, USA) recubierta con poli-Lisina (100 μL /por pozo, 0.1 mg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, con el fin de fijar la proteína del receptor GRP o del receptor de folato. La poli-Lisina se retiró de los pozos y la placa se lavó dos veces con 200 μL de agua tipo 1. Posteriormente, se adicionaron 100 μL (15 ng) de una solución de la proteína GRPR o FR (0.15 ng/ μL en Coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2) en cada pozo y la placa se incubó a 4°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, la placa se lavó dos veces con 200 μL buffer de unión (0.1% albúmina de suero bovino (ASB) in coating buffer) y se incubó con un buffer de bloqueo (1% ASB en coating buffer) a temperatura ambiente por 2 h. Se retiró el buffer de bloqueo para adicionar 140 μL de buffer de unión que contienen 70 kBq de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y 100 μL de cada dilución preparada de Folato-Bombesina (de 10000 a 0.01 nM) y se incubaron a 37°C por 1 h. Después de la incubación, los pozos se lavaron tres veces con buffer de unión y se midió la actividad en cada pozo con un detector de NaI (Tl) Auto-In-V-tron, 4010, NML, Inc. Por último, se determinó el IC_{50} (concentración de Folato-Bombesina que inhibe el 50% de unión de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina) para cada receptor mediante un análisis de regresión no-lineal.

6.4.7 Cultivo de las células de cáncer de mama T47D

Las células T47D de cáncer de mama se obtuvieron originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection) por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador

Zubirán y el Instituto Nacional de Cancerología cumpliendo con todas las normas vigentes de bioseguridad para su adquisición. Las células se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y 100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute-libre de folato (RPMI-libre de folato, Sigma-Adrich Co) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y con antibióticos al 1% (estreptomicina y penicilina). El medio fue sustituido cada tercer día con 10 mL por caja de cultivo.

6.4.8 Expresión de GRPR y FR en las células de cáncer de mama T47D

Para corroborar la expresión del receptor GRP y de Folato en las células T47D, se amplificó y cuantificó el fragmento de ADN que corresponde a cada receptor mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa en tiempo real (RT-qPCR). El ARN se extrajo de las células de cáncer usando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, USA) y la concentración de ARN se estimó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El ARN (2 µg, cantidad constante) se retro-transcribió a ADN usando un ensayo comercial (Roche Applied Science, IN, USA).

Las sondas e iniciadores (primers) para la amplificación por PCR en tiempo real se diseñaron con la librería comercial de Roche (Universal Probe Library Assay Design Centre). La PCR en tiempo real se llevó a cabo con el sistema LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con el siguiente protocolo: activación de la Taq-ADN polimerasa y la desnaturalización del ADN a 95°C por 10 minutos, con 45 ciclos de amplificación de 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, y 1 s a 72 °C. Posteriormente, tres microlitros de ADN complementario se usaron para las amplificaciones con iniciadores específicos (Tabla 6.1). La expresión del gen constitutivo Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se utilizó como

control. Los datos obtenidos se analizaron con el método $\Delta\Delta\text{CT}$. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias respecto a la expresión génica del receptor de folato en T47D.

Tabla 6.1. Iniciadores específicos de la secuencia de ADN del receptor GRP y del receptor de folato utilizados para cuantificar el nivel de expresión de los receptores utilizando PCR en tiempo real.

Receptor	Iniciadores (primers)
GRPR	sentido: 5'-CCCGTGGGAAGGGAATATACA-3'
	antisentido: 5'-GCGGTACAGGTAGATGACATGAT-3'
FR-α	sentido: 5'-GAGCAGAGCAGAAGCCTGA-3'
	antisentido: 5'-GGTGATCCTTTGGGTTTCAGTT-3'
GAPDH	sentido: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	antisentido: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

6.4.9 Estudios de captación del conjugado $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina en células T47D

Se realizó una dilución de las células T47D en medio fresco hasta tener aproximadamente 1×10^6 células en un tubo de ensayo (0.5 mL) y se incubaron con 20 μL (0.9 MBq) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Bombesina o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato a 37 °C por 1 h. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con buffer de fosfato salino (PBS). Se determinó la actividad en el botón celular con un detector de centelleo tipo-pozo (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). La radiactividad en el botón celular representa al radiofármaco que se une a la membrana y al que se internaliza. La actividad asociada a la membrana se removió al agregar 1 mL de una solución de ácido acético a 0.2 M/ NaCl 0.5

M. Los tubos de ensayo nuevamente se centrifugaron para obtener la actividad en el botón, la cual se asocia con el radiofármaco internalizado. Se tomó una alícuota con la actividad inicial que significó el 100 % y entonces se calculó la actividad captada en las células.

Los estudios de bloqueo se determinaron en paralelo usando 50 μL de Lys³-Bombesina (0.5 mM) o 50 μL de ácido fólico en 0.01 M NaOH (0.5 mM) los cuales se colocaron 30 min antes de la adición del radiofármaco.

6.4.10 Estudios de biodistribución del conjugado ^{99m}Tc-Folato-Bombesina en ratones atímicos con tumores inducidos T47D

Modelo animal. La captación en el tumor, los estudios de biodistribución y de imagen se realizaron en ratones atímicos de acuerdo a las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Se utilizaron ratonas atímicas hembras con un peso entre 18 y 20 g. Las ratonas se mantuvieron en cajas de acrílico estériles, con aserrín, temperatura constante, humedad, ruido y periodos de oscuridad (12/12 horas de luz/oscuridad). Las ratonas se mantuvieron en una dieta libre de folato por tres semanas antes de los estudios de biodistribución e imagen.

Inducción del tumor. La inducción de tumores en la región dorsal superior de las ratonas de 6 a 7 semanas de edad, se realizó mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células T47D suspendidas en 0.1 ml de PBS. Los sitios de inyección se observaron regularmente para verificar la formación y progresión del tumor.

Estudios de Biodistribución. Los ratones atímicos con tumores inducidos T47D fueron inyectados intravenosamente con ^{99m}Tc-Folato-Bombesina (100 μL , 9 MBq) y se sacrificaron a 0.5, 2 y 24 h (n=3 para cada tiempo) después de la administración del radiofármaco. El corazón, bazo, páncreas, hígado, pulmones, riñones, el tumor y muestras de sangre, intestino,

hueso y músculo fueron retirados y colocados en tubos de ensayo de plástico previamente pesados. La actividad contenida en cada órgano se determinó con un detector de centelleo tipo-pozo (Canberra) junto con dos alícuotas de la dilución estándar de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina (solución original) que representa el 100 % de la dosis inyectada, para obtener la actividad corregida por decaimiento. Las actividades medidas se usaron para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

Para los estudios de Bloqueo, los ratones con tumores T47D inducidos se inyectaron en la vena de la cola con Lys³-Bombesina (1-14) (50 μL , 0.5 mM) o ácido fólico (50 μL in 0.01 M NaOH, 0.5 mM) 10 minutos antes de la inyección intravenosa de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina (100 μL , 9 MBq), Los ratones se sacrificaron dos horas después de la administración del radiofármaco siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Con fines de comparación, se administraron los radiofármacos ^{99m}Tc -Bombesina o ^{99m}Tc -Folato (100 μL , 9 MBq) en ratones atómicos con tumores T47D y se sacrificaron a las 2 h después de la administración (n=3 para cada grupo), como se describe anteriormente.

6.4.11 Estudios de imagen con SPECT/CT

Las imágenes de SPECT/CT se adquirieron 2 h después de la administración del radiofármaco usando un micro-SPECT/CT (Albira, ONCOVISION; Gem Imaging S. A., Valencia, Spain) para verificar la captación en el tumor de ^{99m}Tc -Folato, ^{99m}Tc -Bombesina o ^{99m}Tc -Folato-Bombesina.

Los ratones se mantuvieron anestesiados por inhalación con isoflurano al 2% en conjunto con aire y oxígeno puro. Se colocaron en posición prona y se adquirió la imagen a cuerpo entero. Para la adquisición de la imagen SPECT en 3D se consideró un campo de visión (FOV) de 60 mm con una ventana simétrica al 20% centrada a 140 keV, se usó un colimador

tipo pinole y se tomaron un total de 64 proyecciones de 30 segundos cada una hasta cubrir 360°. El conjunto de imágenes se reconstruyó usando un algoritmo con parámetros en modo estándar proporcionados por el fabricante. La adquisición de la imagen CT se realizó con un voltaje de 35 kV, con una corriente de 700 μ A y con un total de 64 proyecciones micro-CT. De la dosis inyectada de ^{99m}Tc -Folato, ^{99m}Tc -Bombesina o ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y considerando el peso de cada ratón, se estimó el valor de captación estándar promedio (SUV=mean tumour-standardized uptake value) (n=3) [$\text{SUV}_{\text{promedio}} = (\text{Bq/g}) / (\text{actividad inyectada, Bq/peso corporal, g})$] usando el Software PMOD Data Analysis (PMOD technologies).

6.4.12 Medición de la actividad metabólica con ^{99m}Tc -Folato-Bombesina vs ^{18}F FDG

Para medir la actividad metabólica del tumor a partir del SUV de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina que se obtiene de las imágenes SPECT, se usó como referencia el SUV del ^{18}F FDG. Cada ratón se inyectó con ambos radiofármacos, para realizar una comparación directa de los agentes en el mismo ratón. Un grupo de tres ratones se inyectó con 9 MBq de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y 11 MBq con ^{18}F FDG. Una hora y media después de la administración de los radiofármacos, los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno y se tomaron las imágenes con micro-SPECT/PET/CT (Albira, ONCOVISION; Gem Imaging S. A., Valencia, Spain). Estos ratones también se inyectaron con ^{99m}Tc -Folato 24 horas después de la administración de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina. El SUV se calculó para cada radiofármaco como se mencionó anteriormente.

Análisis estadístico. La diferencias entre los estudios de bloqueo y sin bloqueo, tanto *in vitro* como *in vivo*, se evaluaron con la prueba de *t*-student ($p < 0.05$).

6.5 Procedimientos para la síntesis y evaluación *in vitro* e *in vivo* del conjugado heterobivalente Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesina (1-14)

6.5.1 Síntesis de Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14)

La síntesis de Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) se basó en una reacción de acoplamiento para la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo activados del ácido fólico y la amina de la Lys¹ del péptido Lys¹Lys³-DOTA-Bombesina (1-14).

Activación de los grupos carboxilato: 80 μ L de una disolución de ácido fólico a 22.5 mM (2.25 μ mol; 1 mg en 100 μ L de DMF) se agregaron a una mezcla que contiene 50 μ L de N,N-Diisopropiletilamina a 0.2 M (9.3 μ mol; 1.2 mg in 50 μ L de DMF) y 50 μ L del agente activador HATU (2.63 μ mol, 1 mg en 50 μ L de DMF). La mezcla de reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente (20°C).

Formación del enlace amida: A 80 μ L de la solución anterior (1 μ mol de folato activado) se le adicionaron 20 μ L (0.57 μ mol; 50 mg/mL agua grado inyectable) de Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14). La mezcla de reacción se incubó por 90 min a temperatura ambiente (20°C) y se llevó a sequedad al vacío. La mezcla se reconstituyó en 0.5 mL de agua inyectable y se purificó por cromatografía de alta resolución (HPLC) de exclusión molecular con detector de UV-vis, usando una columna YMC-Pack-diol-60 (8 mm x 500 mm I.D), flujo de 0.7 mL/min y agua grado HPLC como fase móvil. Se recolectó la fracción con un tiempo de retención (t_R) de 12-16 minutos y se llevó a sequedad al vacío. El conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) se caracterizó y usó como una mezcla de regioisómeros Lys¹- α -Folato-Lys³-DOTA-Bombesina (1-14) y Lys¹- γ -Folato-Lys³-DOTA-Bombesina (1-14).

Para estudios comparativos DOTA-GGC-Folato se preparó bajo el mismo procedimiento.

6.5.2 Caracterización química del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14).

Espectroscopia de UV-vis. El espectro de UV-vis para Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) y Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) se obtuvieron en el rango de 200-700 nm con el espectrómetro Perkin-Elmer Lambda-Bio (Waltham, MA, USA) utilizando una celda de cuarzo de 1 cm.

Espectroscopia IR. El espectro de IR de Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) y Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14), en estado sólido, se obtuvieron en un espectrómetro Perkin-Elmer (Spectrum 400) con una plataforma de ATR (GladiaATR, Pike Technologies) utilizando una punta de diamante.

Espectrometría de masas con técnica de ionización MALDI-TOF. El espectro de masas de Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) se midió con el espectrómetro de masas microflex (Bruker, Billerica, MA, USA), operando en modo reflector y se utilizó como matriz el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. Los datos se procesaron con software Bruker Daltonics.

Modelado molecular. El péptido Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) y los regioisómeros Lys¹(α -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) y Lys¹(γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) se construyeron tomando en cuenta la valencia, el tipo de enlace, la posición del grupo carbonilo, la carga y la hibridación para comparar los cambios estructurales después de la conjugación del folato. Se calculó la energía mínima mediante el procedimiento MM3, la energía mínima del conformero más estable mediante el procedimiento CONFLEX y el calor de formación usando los procedimientos MOPAC/PM5 y MOPAC/PM5/COSMO. Dichos procedimientos se calcularon con la geometría óptima de las estructuras utilizando el

programa CAChe Pro 5.04 para Windows (Fujitsu Ltd., 2000-2001). Las moléculas calculadas también se modelaron con MOPAC-PM5-COSMO (CaChe Pro 5.04) para evaluar el efecto del solvente (agua) sobre la estabilidad y arreglos estequiométricos de los regioisómeros en agua, los cuales definen el alcance de la reactividad frente a los iones metálicos.

6.5.3 Preparación de Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesina (1-14) [¹⁷⁷Lu- Folato-Bombesina]

El radiomarcado se llevó acabo al agregar 50 μ L de ¹⁷⁷LuCl₃ (1850 MBq, n.c.a., ITG, Alemania) a 100 μ g del conjugado Lys¹(α,γ -Folato)Lys³(DOTA)-Bombesina (1-14) en 150 μ L de buffer de acetato de sodio 1 M, pH, con un periodo de incubación de 20 minutos a 92°C. La solución final se diluyó con 2 mL de una solución de NaCl al 0.9% que contiene 20 mg de ácido ascórbico.

Con fines de comparación, ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-Folato (¹⁷⁷Lu-Folato) y Lys¹Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesina (¹⁷⁷Lu-Bombesina) se prepararon bajo el mismo procedimiento.

Determinación de la pureza radioquímica. La pureza radioquímica se determinó por HPLC en fase reversa acoplado a un detector de radiactividad (Radio-HPLC Detector IN/US System γ -RM model) y a un detector de UV (Waters 2996 Photodiode Array Detector). Se utilizó una columna μ Bondapak C-18, 10 μ m, 125 Å (3.9 mm x 300 mm).

Se empleó un sistema de gradientes para la fase móvil utilizando TFA 0.1%/agua como solvente A y TFA 0.1%/acetonitrilo como solvente B a un flujo de 1 mL/min. El gradiente comenzó en 100% del solvente A durante 3 min, cambiando 50% del solvente A en 10 min, se mantuvo esta proporción por 10 min y se cambió a 30% del solvente A en 3 min, finalmente se regresó a 100% del solvente A por 4 min.

6.5.4 Estudios *in vitro*

Estabilidad en suero humano. Para determinar la estabilidad en suero humano del conjugado ^{177}Lu -Folato-Bombesina, 200 μL del radiofármaco se diluyeron en una relación 1:10 con suero humano fresco y se incubaron a 37°C . La estabilidad del radiofármaco se determinó a partir de 100 μL de cada muestra tomadas a diferentes tiempos de 10 min a 24 horas mediante el análisis de los perfiles cromatográficos de UV y radiactividad obtenidos por HPLC de exclusión molecular (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, PBS). Un cambio en el perfil de radiactividad a un peso molecular mayor indica unión a proteínas, mientras que el peso molecular más bajo indica unión a la cisteína.

Afinidad de ^{177}Lu -Folato-Bombesina a la proteína del receptor GRP y al receptor de Folato
Para evaluar la afinidad del conjugado ^{177}Lu -Folato-Bombesina a la proteína recombinante del receptor del péptido liberador de gastrina GRP (Novus Biologicals, LLC, USA) y a la proteína humana del receptor de Folato (Sigma-Aldrich, SL, USA), se desarrollaron ensayos de competencia por los sitios de unión entre la molécula Folato-DOTA-Bombesina y el radiofármaco ^{177}Lu -Folato-Bombesina. El perfil de competencia se obtuvo cuantificando el porcentaje de unión de una concentración constante de ^{177}Lu -Folato-Bombesina que permanece en la muestra a medida que se le añaden concentraciones crecientes de Folato-DOTA-Bombesina.

Para el procedimiento se utilizó una microplaca de 96 pozos (Corning, NY, USA) recubierta con poli-Lisina (100 μL /por pozo, 0.1 mg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, con el fin de fijar la proteína del receptor GRP o del receptor de folato. La poli-Lisina se retiró de los pozos y la placa se lavó dos veces con 200 μL de agua tipo 1. Posteriormente, se adicionaron 100 μL (15 ng) de una solución de la proteína

GRPR o FR (0.15 ng/ μL en Coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2) en cada pozo y la placa se incubó a 4°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, la placa se lavó dos veces con 200 μL buffer de unión (0.1% albúmina de suero bovino (ASB) in coating buffer) y se incubó con un buffer de bloqueo (1% ASB en coating buffer) a temperatura ambiente por 2 h. Se retiró el buffer de bloqueo para adicionar 140 μL de buffer de unión que contienen 70 kBq de ^{177}Lu -Folato-Bombesina y 100 μL de cada dilución preparada de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina}$ (1-14) (de 10000 a 0.01 nM) y se incubaron a 37°C por 1 h. Después de la incubación, los pozos se lavaron tres veces con buffer de unión y se midió la actividad en cada pozo con un detector de NaI (TI) Auto-In-V-tron, 4010, NML, Inc. Por último, se determinó el IC_{50} (concentración de Folato-DOTA-Bombesina que inhibe el 50% de unión de ^{177}Lu -Folato-Bombesina) para cada receptor mediante un análisis de regresión no-lineal.

Cultivo celular. Las células T47D de cáncer de mama se obtuvieron originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection) y se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO_2) y 100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute-libre de folato (RPMI-libre de folato, Sigma-Adrich Co) suplementado al 10 % con suero fetal bovino (FBS) y al 1% con antibióticos (estreptomycin y penicilina). El medio fue sustituido cada tercer día con 10 mL por caja de cultivo.

Estudios de captación in vitro. Se realizó una dilución de las células T47D en medio fresco hasta tener aproximadamente 1×10^6 células en un tubo de ensayo (0.5 mL) y se incubaron con 20 μL (0.9 MBq) de ^{177}Lu -Folato-Bombesina o ^{177}Lu -Bombesina o ^{177}Lu -Folato a 37 °C por 1 h. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con buffer de fosfato salino (PBS). Se determinó la actividad en el botón celular con

un detector de centelleo tipo-pozo (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). La radiactividad en el botón celular representa al radiofármaco que se une a la membrana y al que se internaliza. La actividad asociada a la membrana se removió al agregar 1 mL de una solución de ácido acético a 0.2 M/ NaCl 0.5 M. Los tubos de ensayo nuevamente se centrifugaron para obtener la actividad en el botón, la cual se asocia con el radiofármaco internalizado. Se tomó una alícuota con la actividad inicial que significó el 100 % y entonces se calculó la actividad captada en las células.

Los estudios de bloqueo se determinaron en paralelo usando 50 µL de Lys³-Bombesina (0.5 mM) o 50 µL de ácido fólico en 0.01 M NaOH (0.5 mM) los cuales se colocaron 30 min antes de la adición del radiofármaco.

6.5.5 Estudios *in vivo*

Modelo animal. La captación en el tumor, los estudios de biodistribución y de imagen se realizaron en ratones de acuerdo a las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Se utilizaron ratonas atómicas hembras con un peso entre 18 y 20 g. Las ratonas se mantuvieron en cajas de acrílico estériles, con aserrín, temperatura constante, humedad, ruido y periodos de oscuridad (12/12 horas de luz/oscuridad). Las ratonas se mantuvieron en una dieta libre de folato por tres semanas antes de los estudios de biodistribución e imagen.

Inducción del tumor. La inducción de tumores en la región dorsal superior de las ratonas de 6 a 7 semanas de edad, se realizó mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células T47D suspendidas en 0.1 ml de PBS. Los sitios de inyección se observaron regularmente para verificar la formación y progresión del tumor.

Estudios de Biodistribución. Los ratones atómicos con tumores inducidos T47D fueron inyectados intravenosamente con ^{177}Lu -Folato-Bombesina (100 μL , 74 MBq) y se sacrificaron a 2, 4, 24, 48 y 120 h (n=3 para cada tiempo) después de la administración del radiofármaco. El corazón, bazo, páncreas, hígado, pulmones, riñones, el tumor y muestras de sangre, intestino, hueso y músculo fueron retirados y colocados en tubos de ensayo de plástico previamente pesados. La actividad contenida en cada órgano se determinó con un detector de centelleo tipo-pozo (Canberra) junto con dos alícuotas de la dilución estándar de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina (solución original) que representa el 100 % de la dosis inyectada, para obtener la actividad corregida por decaimiento. Las actividades medidas se usaron para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) y/o por órgano (% ID)

Para los estudios de Bloqueo, los ratones con tumores T47D inducidos se inyectaron en la vena de la cola con Lys^3 -Bombesina (1-14) (50 μL , 0.5 mM) o ácido fólico (50 μL in 0.01 M NaOH, 0.5 mM) 10 minutos antes de la inyección intravenosa de ^{177}Lu -Folato-Bombesina (100 μL , 74 MBq), Los ratones se sacrificaron dos horas después de la administración del radiofármaco siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Con fines de comparación, se administraron 100 μL de ^{177}Lu -Bombesina (74 MBq) o ^{177}Lu -Folato (74 MBq) en ratones atómicos con tumores T47D y se sacrificaron a las 2 h después de la administración del radiofármaco (n=3 para cada grupo) como se describe anteriormente.

Modelo biocinético y estimación de la dosis absorbida. El porcentaje de dosis inyectada a diferentes tiempos en el bazo, hígado, riñones y tumores (con masa promedio de 0.1g) se utilizaron para obtener las curvas de actividad contra tiempo corregidas por decaimiento [$q_h(t) = A_h(t)e^{\lambda_R t}$], los resultados obtenidos representan el comportamiento biológico de

^{177}Lu -Folato-Bombesina en cada órgano. La función $A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_{Lu-177}t}$ se integró en el tiempo para obtener el número total de desintegraciones (N) del radionúclido en la región fuente normalizada por unidad de actividad administrada (MBq), mediante la siguiente ecuación:

$$N_{fuente} = \int_{t=0}^{t=\infty} A_h(t) dt$$

La dosis absorbida en los órganos se estimó con la ecuación siguiente:

$$\bar{D}_{blanco\leftarrow fuente} = \sum_{fuente} N_{fuente} \times DF_{blanco\leftarrow fuente}$$

Dónde:

$\bar{D}_{blanco\leftarrow fuente}$ es la dosis absorbida promedio para el órgano blanco dada por el órgano fuente y $DF_{blanco\leftarrow fuente}$ es el factor de dosis y es determinado por la ecuación siguiente:

$$DF_{blanco\leftarrow fuente} = \sum_i \Delta_i \Phi_i (\text{blanco}\leftarrow\text{fuente})$$

Donde el término Δ_i es la energía promedio emitida por desintegración, para varios i-tipos de radiación (emisiones i-tipos, $\sum n_i E_i$). El término Φ_i representa a la fracción absorbida que es dependiente de las propiedades de las emisiones del i-tipo y del tamaño, forma y separación entre el órgano fuente y el blanco. Los valores de DF se obtuvieron con base a los datos reportados por Miller y col. [103] donde la fracción de dosis absorbida dada por las partículas β se calculó con Monte Carlo usando los códigos de transporte de radiación MCNP4 y PEREGRINE (BASE-boxel) en un modelo de ratón.

Con fines de comparación, se calculó la dosis absorbida dada por el ^{177}Lu -Bombesina y ^{177}Lu -Folato en el bazo, hígado, riñones y tumor, siguiendo el método descrito anteriormente.

Estudios de imagen. Las imágenes de SPECT/CT se adquirieron 2 y 4 h después de la administración de ^{177}Lu -Folato-Bombesina usando un micro-SPECT/CT (Albira, ONCOVISION; Gem Imaging S. A., Valencia, Spain) para verificar la captación en el tumor. Los ratones se mantuvieron anestesiados por inhalación con isoflurano al 2% en conjunto con aire y oxígeno puro. Se colocaron en posición prona y se adquirió la imagen a cuerpo entero. Para la adquisición de la imagen SPECT en 3D se consideró un campo de visión (FOV) de 60 mm con una ventana simétrica al 20% centrada a 140 keV, se usó un colimador tipo pinole y se tomaron un total de 64 proyecciones de 30 segundos cada una hasta cubrir 360°. El conjunto de imágenes se reconstruyó usando un algoritmo con parámetros en modo estándar proporcionados por el fabricante. La adquisición de la imagen CT se realizó con un voltaje de 35 kV, con una corriente de 700 μA y con un total de 64 proyecciones micro-CT.

6.6 Variables de estudio

Independientes: Radioconjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$

Dependientes: dosis de radiación y valor de captación estándar (SUV).

Intervinientes: retención, afinidad a los receptores, eliminación, proliferación celular, pureza radioquímica.

Tabla 6.2. Variables de estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Radiofármaco	Toda aquella sustancia que contiene un átomo radiactivo en su estructura y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada en humanos para fines de diagnóstico y terapia.	HPLC ITLC	cuantitativa	Razón=Rf/total	ANOVA
Dosis absorbida en ratón	Es la energía depositada por las partículas en una región blanco con masa conocida.	Metodología MIRD	Cuantitativa	[Gy]	Distribución Normal
Valor de captación estándar (SUV)	Es la relación de la concentración de radiactividad derivada de una imagen y la concentración en el cuerpo entero de la radiactividad inyectada	cuantificación de la captación en imagen	cuantitativa	Razón=Rf/total	Distribución Normal

6.7 Recolección de datos

La recolección de los datos para la caracterización de los péptidos por sí solos y de los conjugados heterobivalentes se realizaron con 20 barridos aproximadamente para cada una de las técnicas espectroscópicas.

Para los estudios de afinidad *in vitro*, captación específica en las células de cáncer de mama T47D y estudios de biodistribución en ratones atómicos con tumores inducidos T47D, la recolección de los datos de los conjugados heterobivalentes se realizó al cuantificar la actividad de las muestras con un detector de centelleo tipo-pozo.

Para el cálculo de los modelos biocinéticos y dosis absorbida de radiación de los conjugados heterobivalentes en ratones con tumores T47D, se realizó mediante una aproximación teórica a partir de los datos de biodistribución.

La recolección de los datos para las imágenes SPECT/CT se realizaron a partir de la adquisición de imágenes estáticas a diferentes ángulos y tiempos después de la administración de los conjugados heterobivalentes.

6.8. Análisis de datos

Las diferencias entre los estudios de bloqueo y sin bloqueo, tanto *in vitro* como *in vivo*, se evaluaron con la prueba de *t*-student con un grado de significancia $p < 0.05$.

6.9. Aspecto ético e implicaciones bioéticas

La investigación del presente trabajo se realizó de acuerdo a las normas NOM-012-STPS-1999 para condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, usen, almacenen o transporten fuentes de radiación, NOM-004-NUCL-1994, de clasificación de los desechos radiactivos y NOM-36-NUCL-2001 de los requerimientos para instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de desechos radiactivos.

Los estudios a nivel preclínico como inducción de tumores, biodistribución y adquisición de imágenes SPECT/CT en los ratones atómicos se realizaron de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los desechos biológicos tanto animales como de las células de cáncer T47D, se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Bioseguridad NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

7 Resultados

7.1 Artículo publicado

Improved Radiopharmaceutical Based on ^{99m}Tc -Bombesin-Folate for Breast Tumour Imaging

Liliana Aranda-Lara^{a,b}, Guillermina Ferro-Flores^{a*}, Flor de María Ramírez^a, Blanca Ocampo-García^a,
Clara Santos-Cuevas^a, Lorenza Díaz-Nieto^c, Keila Isaac-Olivé^b

^aInstituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750, Ocoyoacac, Estado de México, MEXICO.

^bUniversidad Autónoma del Estado de México, 50180, Toluca, Estado de México, MEXICO.

^cInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000, Tlalpan, Mexico City, MEXICO.

*Corresponding author:

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.
Departamento de Materiales Radiactivos,
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa,
Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México.
Tel. + (52) (55)-53297200 ext. 13871,
e-mail: ferro_flores@yahoo.com.mx
guillermina.ferro@inin.gob.mx

*This study was supported by the Mexican National Council of Science and
Technology (CONACyT-SEP-CB-2014-01-242443).*

7.1.1 Carta de aceptación

● **Guillermina Ferro** <ferro_flores@yahoo.com.mx>

09/11/15 at 6:05 PM ★

To: Flor de Maria Ramirez de la Cr, Keila Isaac-Olive, Lily Ar, Blanca Elí Ocampo García, Clara Santos, Lorenza Diaz

El Lunes, 9 de noviembre, 2015 16:02:02, Nuclear Medicine Communications <em@editorialmanager.com> escribió:

Nov 09, 2015

RE: NMC-11-1874R1, entitled "Improved Radiopharmaceutical Based on 99mTc-Bombesin-Folate for Breast Tumour Imaging"

Dear Dr. Ferro-Flores,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Nuclear Medicine Communications. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue. You will receive an email from the typesetters within 3 weeks to inform you when the proofs will be ready for your approval.

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

With Kind Regards,

Dr. Domenico Rubello
Editor
Nuclear Medicine Communications
<http://nmc.edmgr.com/>

7.1.2 Resumen

Introducción Estudios clínicos en mujeres con ^{99m}Tc -Bombesina han mostrado imágenes adecuadas de tumores de cáncer de mama que sobre-expresan receptores del péptido liberador de gastrina (GRPR). Recientes estudios han demostrado que la mayoría de los tumores de mama sobre-expresan receptores de folato ($\text{FR}\alpha$).

Objetivo El objetivo del trabajo fue sintetizar el conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{-Lys}^3(^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ (^{99m}Tc -Bombesina-Folato), así como también, evaluar *in vitro* e *in vivo* el potencial del radiofármaco para la detección de $\text{FR}\alpha$ y GRPR.

Métodos el péptido $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ se conjugó al ácido fólico y producto se purificó por HPLC de exclusión molecular. Estudios espectroscópicos de UV-vis, FT-IR y MALDI-TOF fueron usados para caracterización química. El radiomarcado con ^{99m}Tc se realizó usando EDDA/Tricina como coligantes. Los estudios *in vitro* se llevaron en las células de cáncer de mama T47D (positivas a GRPR y $\text{FR}\alpha$). Estudios de biodistribución e imágenes micro-SPECT-CT se obtuvieron usando ratones atómicos con tumores inducidos T47D.

Resultados Los análisis de HPLC indicaron que el radioconjugado se obtuvo con alta pureza radioquímica ($96 \pm 2.1\%$). Los resultados *in vitro* e *in vivo* mostraron una importante captación del radiofármaco en las células T47D y tumores (5.43% ID/g), la cual fue significativamente inhibida por la pre-incubación con ácido fólico y bombesina.

Conclusión el radiofármaco heterobivalente significativamente mejoró la captación del tumor *in vivo* debido a la interacción concomitante con $\text{FR}\alpha$ y GRPR.

7.1.3 Abstract

Background Clinical studies in women using ^{99m}Tc -Bombesin have shown successful radionuclide imaging of breast tumours overexpressing gastrin-releasing peptide receptors (GRPR). Recent studies have demonstrated that most breast tumours overexpress folate receptors ($\text{FR}\alpha$).

Aim The aim of this work was to synthesize the $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ conjugate (^{99m}Tc -Bombesin-Folate), as well as to assess the *in vitro* and *in vivo* radiopharmaceutical potential to target $\text{FR}\alpha$ and GRPR.

Methods $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ was conjugated to folic acid and the product purified by size-exclusion HPLC. UV-vis, FT-IR and MALDI-TOF spectroscopic studies were used for chemical characterization. ^{99m}Tc labelling was performed using EDDA/tricine as coligands. *In vitro* binding studies were carried out in T47D breast cancer cells (positive to $\text{FR}\alpha$ and GRPR). Biodistribution studies and micro-SPECT/CT images were obtained using athymic mice with T47D-induced tumours.

Results HPLC analyses indicated that the radioconjugate was obtained with high radiochemical purity ($96 \pm 2.1\%$). The *in vitro* and *in vivo* results showed an important uptake of the radiopharmaceutical in the T47D cells and tumours (5.43% ID/g), which was significantly inhibited by pre-incubation with cold folic acid or cold bombesin.

Conclusion The ^{99m}Tc -Bombesin-Folate heterobivalent radiopharmaceutical significantly enhances the *in vivo* tumour uptake due to the concomitant interaction with $\text{FR}\alpha$ and GRPR.

Keywords: $\text{Lys}^3\text{-Bombesin (1-14)}$; technetium-99m; heterobivalent radiopharmaceuticals; breast cancer; radiolabelled $\text{Lys}^3\text{-bombesin}$.

7.1.4 Introduction

Methods for visualizing breast cancer include mammography, magnetic resonance imaging, ultrasound, and nuclear medicine-based methods such as ^{99m}Tc -sestamibi and ^{18}F -fluorodeoxy-glucose, unfortunately all lacking specificity [1].

Over the last two decades, several experimental evidences have suggested that the gastrin-releasing peptide (GRP) and other bombesin-like peptides act as growth factors in many types of cancer [2]. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is present in 96% of breast cancer tissues [1]. Different bombesin analogues with high affinity for GRPR have been evaluated in preclinical studies for receptor-specific imaging and therapy [2]. ^{99m}Tc -Bombesin takes advantage of the optimal imaging characteristics of technetium (half-life of 6 h and 140-keV photon) for single photon emission computed tomography (SPECT), and it has also been successfully used in clinical studies to diagnose breast tumours [3-6].

In particular, the GRPR is highly expressed in T47D human breast cells, and that is the reason for which these cells have been used as tumour models to evaluate new bombesin probes [1, 7-9].

Folate receptor- α (FR α) is a membrane-bound protein with high affinity for binding and transporting folate into cells. Folate is a basic component of cell metabolism and DNA synthesis and repair. Cancer cells, which rapidly divide, have an increased requirement for folate to maintain DNA synthesis, an observation supported by the widespread use of antifolates in cancer chemotherapy [10, 11].

The overexpression of FR α protein has been confirmed in all clinical breast cancer subtypes comprised of oestrogen receptor-positive (ER+), progesterone receptor-positive (PR+), human epidermal growth factor receptor-positive (HER2+), and triple negative (ER $^-$, HER2 $^-$,

PR⁺) tumours [12-14]. Recent polymerase chain reaction studies confirmed that FR α is highly expressed in T47D cells [15].

The development of radiolabelled heterobivalent molecules that interact concomitantly with different targets on tumour cells is an important strategy for specific, sensitive, and non-invasive tumour imaging [16]. Therefore, a heterobivalent conjugate of bombesin and folate is expected to improve the recognition of breast cancer cells positive to FR and GRPR.

Recently, ^{99m}Tc-Citrate-Folate and ^{99m}Tc- Glucarate-Folate heterodimers have been reported as radiopharmaceuticals with high-radiochemical purity [17, 18], although citrate and glucarate were used as chelators to bind the ^{99m}Tc metal, not to target a second specific receptor. The availability of simple, efficient and reproducible radiolabelling procedures is essential for developing radiopharmaceuticals for routine clinical use. Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (EDDA) is a hydrophilic molecule that may favour renal excretion when used as a coligand in the ^{99m}Tc labelling of hydrazinonicotinamide (HYNIC)-peptides, and can be formulated easily in a lyophilized kit [19].

The aim of this work was to synthesize the Lys¹(α,γ -Folate)-Lys³(^{99m}Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesin (1-14) heterobivalent radioconjugate (^{99m}Tc-Bombesin-Folate), as well as to assess the *in vitro* and *in vivo* radiopharmaceutical potential to target T47D breast tumours overexpressing folate- and GRP-receptors.

7.1.5 Materials and Methods

7.1.5.1 Synthesis and chemical characterization

Reagents. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA) and were used as received. H₂N-Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14) and

HYNIC-Gly-Gly-Cys (HYNIC-GGC) peptides with a purity of > 90% (HPLC), were obtained from piChem Laboratory (Graz, Austria).

Synthesis of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14) [Bombesin-Folate].

Eighty microliters of folic acid solution [2.25 μ mol; 1 mg in 100 μ L of dimethylformamide (DMF)] was added to a mixture containing 50 μ L of 0.2 M diisopropylethylamine (DIPEA, to provide a basic medium) (9.3 μ mol; 1.2 mg in 50 μ L of DMF) and 50 μ L of the carboxylate activating agent [HATU = (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexa fluoro phosphate); 2.63 μ mol, 1 mg in 50 μ L of DMF]. The reaction mixture was incubated for 15 min at room temperature (20°C). To 80 μ L of the above solution (1 μ mol of activated folate), 20 μ L (0.57 μ mol; 50 mg/mL injectable-grade water) of Lys¹Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14) (Bombesin), was added. The reaction mixture was incubated for 90 min at room temperature (20°C). The mixture was dried under vacuum.

The reaction mixture was reconstituted in 0.5 mL of injectable-grade water and purified using a size exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC, 1 mL loop) system (YMCPack-Diol-60, 8 mm x 500 mm I.D., 0.7 mL/min, HPLC grade water) with a photodiode array UV-vis detector.

The synthesized conjugate was separated by HPLC as a mixture of α - and γ -Lys¹(Folate)Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14) regioisomers, and was characterized and used further without separation of regioisomers. The purified conjugate was dried under vacuum. For comparative studies, HYNIC-GGC was conjugated to folate under the same procedure.

Chemical characterization

UV-vis spectroscopy. UV-vis spectra of folic acid (1 mg dissolved in 0.1 M NaOH), Bombesin and Bombesin-Folate were obtained in the range of 200-700 nm with a Perkin-Elmer Lambda-Bio spectrometer (Waltham, MA, USA) using a 1 cm quartz cuvette.

IR spectroscopy. Spectra of folic acid, Bombesin and Bombesin-Folate, in solid state, were obtained on a Perkin-Elmer System spectrometer (Spectrum 400) (Waltham, MA, USA) with an attenuated total reflection platform (Diamond GLADIATOR, Pike Technologies; Madison, WI, USA) from 500 to 4000 cm^{-1} .

MALDI-TOF mass spectrometry (MS). The Bombesin-Folate mass spectrum was measured with a microflex mass spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA), operating in reflector mode and using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. Data was processed using the Bruker Daltonics flex Analysis software.

Molecular modelling. Based on the experimental results, the Bombesin- α -Folate and Bombesin- γ -Folate regioisomeric molecules were built taking into account valence, bond type, carbonyl group position, charge and hybridization. The minimum energies (Molecular Mechanics calculations by Augmented MM3 procedure) and the lowest energy conformer (CONFLEX procedure) associated to the optimized geometry of their structures, were calculated using the CAChe Pro 5.04 program package for Windows® (Fujitsu Ltd., 2000-2001). $\text{Lys}^1(\alpha\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc-Bombesin-}\alpha\text{-Folate}$) and $\text{Lys}^1(\gamma\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc-Bombesin-}\gamma\text{-Folate}$) were also calculated by the MM3 Augmented and CONFLEX procedures.

7.1.5.2 Preparation of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(^{99m}Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesin (1-14) [^{99m}Tc-Bombesin-Folate]

Radiolabelling was carried out by adding 0.5 mL of EDDA-Tricine solution (30 mg of EDDA in 1.5 mL of 0.1 M NaOH and 60 mg of tricine in 1.5 mL of 0.2 M phosphate buffer, pH=7), 10 μ L of SnCl₂ solution (1 mg/mL, in 0.012M HCl) and 0.5 mL of ^{99m}Tc-pertechnetate (GETEC-ININ, Mexico, 740-925 MBq) to 70 μ L of Bombesin-Folate (0.5 mg/mL), followed by incubation at 92°C for 20 min in a dry block heater. The final radiopharmaceutical solution was diluted with 0.9% NaCl at the radioactive concentration described in the *in vitro* and *in vivo* experiments. For comparative studies, ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ -Folate) (^{99m}Tc-Folate) and Lys¹Lys³(^{99m}Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesin (1-14) (^{99m}Tc-Bombesin) were also prepared using the same labelling procedure.

The radiochemical purity was determined by reversed-phase HPLC on a C-18 column (μ Bondapak C18 column, Waters) using a Waters Empower system with an in-line radioactivity detector and a gradient of water/acetonitrile containing 0.1% TFA from 95/5 (v/v) to 20/80 (v/v) over 35 min at a flow rate of 1 mL/min. Using this system, free ^{99m}TcO₄⁻ exhibits t_R =3-3.5 min and ^{99m}Tc-EDDA/Tricine t_R = 4.0- 4.6 min.

7.1.5.3 *In vitro* studies

Stability in human serum

To determine the stability of ^{99m}Tc-Bombesin-Folate in serum, 200 μ L of radiotracer was diluted at a ratio of 1:10 with fresh human serum and incubated at 37°C. Radiochemical stability was determined by 100 μ L samples taken at different time points from 10 min to 24 h for radio HPLC size exclusion analysis (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, PBS).

Chromatographic profiles were obtained using two different detector systems, the UV-vis detector and a radiometric detector. A shift in the radioactivity profile to larger molecular weight indicates protein binding, while lower molecular weight indicates labelled catabolites or serum cysteine binding.

In vitro affinity studies

A 96-well microplate (Corning, NY, USA) was coated with a 100 μ L/well of poly-L-lysine (0.1 mg/mL) and incubated at room temperature (20°C) for 20 min. The solution was removed and the plate dried at 37°C. Each well was coated with 100 μ L (150 ng) of purified human folate receptor protein (Sigma-Aldrich, SL, USA) or 100 μ L (150 ng) of gastrin-releasing peptide receptor/GRPR recombinant protein (Novus Biologicals, LLC, USA) solution in coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) and was incubated at 4°C for 20 h. The plates were washed twice with binding buffer (0.1% bovine serum albumin (BSA) in coating buffer). The wells were blocked for 2 h with 200 μ L of blocking buffer (1% BSA in coating buffer) and was then discharged. Then, 140 μ L of binding buffer containing 70 kBq of ^{99m}Tc-Bombesin-Folate, and appropriate dilutions (from 10000 nM to 0.01 nM) of Bombesin-Folate, were incubated in the wells at 25°C for 1 h. After incubation, the plates were washed three times with binding buffer. The wells were cut out and counted in a gamma counter. IC₅₀ values (the concentration of Bombesin-Folate inhibiting 50% of radioligand binding) were calculated by non-linear regression analysis. Each data point was the average of six wells (n=6).

Expression of GRPR and FR in T47D cells

T47D human breast cancer cell line (obtained from the ATCC, USA) was grown at 37°C with 5% CO₂ and 85% humidity in folate-free RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and penicillin).

In order to corroborate the GRPR and FR expression in T47D cells, the reverse transcriptase-qPCR assay was performed. Total RNA was extracted from cancer cells using trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, USA). The concentration of RNA was estimated spectrophotometrically at 260/280 nm and a constant amount of RNA (2 µg) was reverse transcribed using a commercial assay (Roche Applied Science, IN, USA). Probes and primers for qPCR amplification were designed with the Universal Probe Library Assay Design Center from Roche. Real-time PCR was carried out using the LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95 °C for 10 min, 45 amplification cycles of 10 s at 95 °C, 30 sec at 60 °C, and 1 s at 72 °C.). Three microliters cDNA were used for qPCR amplifications with the specific primers: GRPR: forward 5'-CCCGTGGAAGGGAATATACA-3' and reverse 5'-GCGGTACAGGTAGATGACATGAT-3'. Folate receptor: forward 5'-GAGCAGAGCAGAAGCCTGA-3' and reverse 5'-GGTGATCCTTTGGGTTTCAGTT-3'. The gene expression of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' and reverse 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' was used as an internal control. Data obtained from qPCR were analyzed using the $\Delta\Delta$ CT method. Finally, results were expressed as a relative fold expression between FR- α and GRPR in T47D cells.

In vitro uptake studies

T47D cancer cells suspended in fresh medium were diluted to 1×10^6 cells/tube with PBS and incubated with 20 μ L (0.9 MBq) of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate or ^{99m}Tc -Bombesin or ^{99m}Tc -Folate in triplicate at 37 °C for 1 h. The test tubes were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and washed with phosphate-buffered saline. Radioactivity in the cell pellet represents both membrane-bound and internalized radiopharmaceutical and was measured in a crystal scintillation well-type detector (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). The membrane-bound activity was removed with 1 mL of 0.2 M acetic acid/ 0.5 M NaCl solution added to the cell pellet. The test tubes were centrifuged and the pellet activity, which was considered as internalization, was measured. Blocking studies were carried out in parallel, the cells were preincubated with 50 μ L of folic acid in 0.01 M NaOH (0.5 mM) or 50 μ L of Lys³-bombesin (0.5 mM) for 30 min before addition of the radiopharmaceutical.

7.1.5.4 *In vivo* studies

Tumour uptake studies in mice were carried out according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. Athymic mice, 6-7 weeks old and 18-20 g weight, were kept in sterile cages with sterile wood-shaving beds, constant temperature, humidity, noise and 12:12 light periods. Athymic mice were maintained on a folate-free diet for 3 weeks before biodistribution and imaging studies.

Tumour induction

Athymic female mice (6-7 wk) were inoculated subcutaneously in upper back with 2×10^6 T47D cancer cells suspended in 0.1 mL of phosphate-buffered saline. Injection sites were observed at regular intervals for tumour formation and progression.

Biodistribution studies

Athymic mice with T47D-induced tumours were injected into the tail vein with ^{99m}Tc -Bombesin-Folate (100 μL , 9 MBq). Mice were sacrificed at 0.5, 2 and 24 h (n=3 for each mice) after radiopharmaceutical administration. Whole heart, lungs, liver, spleen, kidneys and samples of tumour, blood, intestines, bone and muscle were placed into pre-weighted plastic test tubes. The activity was determined in a well-type scintillation detector along with two aliquots of a diluted standard representing 100% of the injected dose. Mean activities were used to obtain the percentage of injected activity per gram of tissue (%ID/g).

For the blocking studies, T47D tumour-bearing mice were injected with unlabelled Lys³-Bombesin (1-14) (50 μL , 0.5 mM) or folic acid (50 μL in 0.01 M NaOH, 0.5 mM) via tail vein ten minutes before intravenous injection of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate (100 μL , 9 MBq) and complete dissection was carried out at 2 h after radiopharmaceutical administration as described above.

For comparison with the ^{99m}Tc -Bombesin-Folate biodistribution, 100 μL with 9 MBq of ^{99m}Tc -Bombesin or ^{99m}Tc -Folate was intravenously injected into the T47D tumour-bearing mice (n=3 for each group) and were also dissected at 2 h after radiopharmaceutical administration as described above.

Imaging studies

Single photon emission computed tomography (SPECT) and X-ray computed tomography (CT) images were acquired 2 h after radiopharmaceutical injection using a micro-SPECT/CT scanner (Albira, ONCOVISION, Spain) to verify the tumour uptake of ^{99m}Tc -Folate, ^{99m}Tc -Bombesin or ^{99m}Tc -Bombesin-Folate. Mice under 2% isoflurane anaesthesia were placed in the prone position and whole body imaging was performed. The micro-SPECT field of view was 60 mm, a symmetric 20% window was set at 140 keV and pinhole collimators

were used to acquire a 3D SPECT image with a total of 64 projections of 30 s each, over 360°. The image dataset was then reconstructed using the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm with standard mode parameter, as provided by the manufacturer. CT parameters were 35 kV sure voltage, 700 μ A current and 600 micro-CT projections.

From the ^{99m}Tc -Folate, ^{99m}Tc -Bombesin or ^{99m}Tc -Bombesin-Folate injected dose and weight of each mouse, the mean tumour-standardized uptake value (n=3) [mean SUV = (Bq/g)/(injected activity, Bq/body weight, g)] was calculated using the PMOD Data Analysis Software (PMOD technologies).

Statistical analysis

Differences between the blocked and unblocked studies, in both *in vitro* and *in vivo* data, were evaluated with the Student's t-test (significance was defined as $p < 0.05$).

7.1.6 Results and discussion

7.1.6.1 Synthesis. The overall reaction yield for Bombesin-Folate was 28% (Fig. 1).

Separation of regioisomers was not carried out, since it has been reported that both α -Folate and γ -Folate conjugates recognize FR α [20].

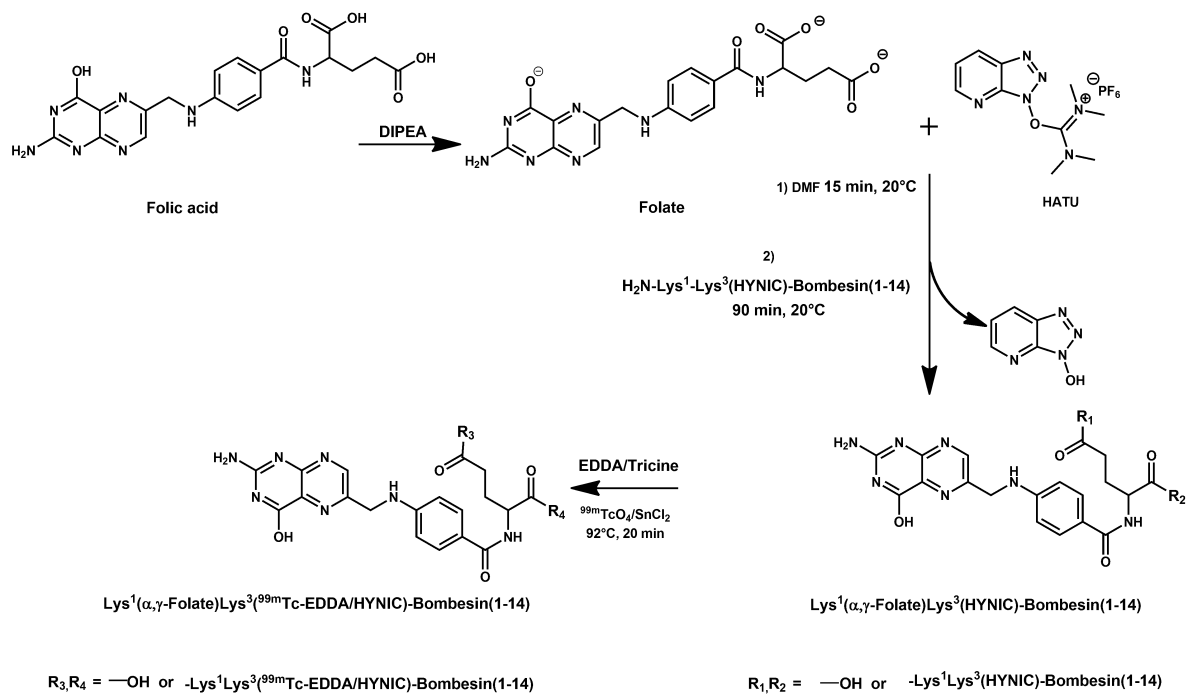


Figure 1. Overall reaction scheme of the $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{Lys}^3(^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesin (1-14)}$ synthesis.

7.1.6.2 Chemical characterization

UV-vis spectroscopy. The UV-vis spectra of folic acid, Bombesin and Bombesin-Folate are presented in Figure 2. The spectrum of the Bombesin reveals a strong asymmetric band centred at 205 nm which corresponds to the $n \rightarrow \sigma^*$ transition from Lys^1 , and a shoulder at 227 nm from $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the peptide bond ($-\text{NH-CO}-$). The strong bands at 267 nm, 290 nm and 318 nm are associated to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions ($-\text{C}=\text{C}-$ and $-\text{C}=\text{N}-$ groups) of the aromatic rings of the tryptophan and histidine residues in the Bombesin peptide. In the spectrum of Bombesin-Folate conjugate, the band centred at 205 nm (primary amine from Lys^1 of Bombesin) is not observed, nor the carboxylate of the folate (shoulder at 217 nm). Instead, a very strong and semi-sharp band centred at 225 nm, corresponding to the formation of a new peptide bond is revealed, which comes from the reaction between the $\text{NH}_2\text{-Lys}^1$ and

the activated folate. The band centred at 280 nm and the shoulder at 340 nm are associated to the aromatic rings from the pterate moiety of the folate.

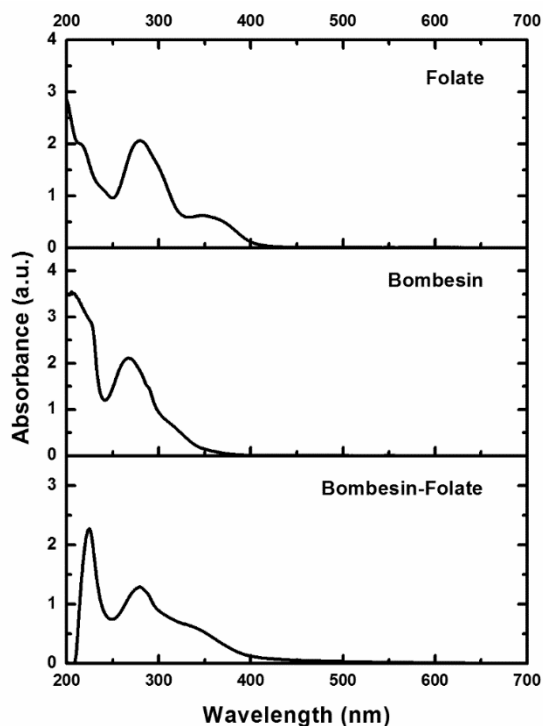


Figure 2. UV-vis spectra of the Folate, Bombesin and Bombesin-Folate.

FT-IR spectroscopy. The IR spectra of folic acid, Bombesin and Bombesin-Folate are presented in Figure 3. The appearance of the new Bombesin-Folate conjugate reveals a significant change in the molecular symmetry of the bombesin and the folic acid after conjugation. The bonding of bombesin and folate through a new amide bond forbids the vibrational frequencies of the primary amides and constrains those of the secondary amides, since a semi-weak and complex band in the main amide region ($1630\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$) is observed. A semi-broad band ($3360\text{-}3160\text{ cm}^{-1}$) in the bombesin spectrum can be associated to N-H stretching vibrations from the primary amine of the Lys¹-functional group as well as primary and secondary amides. Because of its disappearance in the Bombesin-Folate spectrum, it is

considered to correspond mainly to the bombesin-amine group involved in the reaction between the $\text{NH}_2\text{-Lys}^1$ and the activated folate.

In the new conjugate, the alkyl substituents on the C-NH from the lysine sidechain and the alkyl substituents on the carbonyl of the new amide, define a particular band position [21].

In consequence, a very strong band centred at 1075 cm^{-1} with a shoulder at 1095 cm^{-1} from C-N- stretching vibrations from amide III (Folate-C(O)-NH-bombesin), appears in the Bombesin-Folate conjugate spectrum.

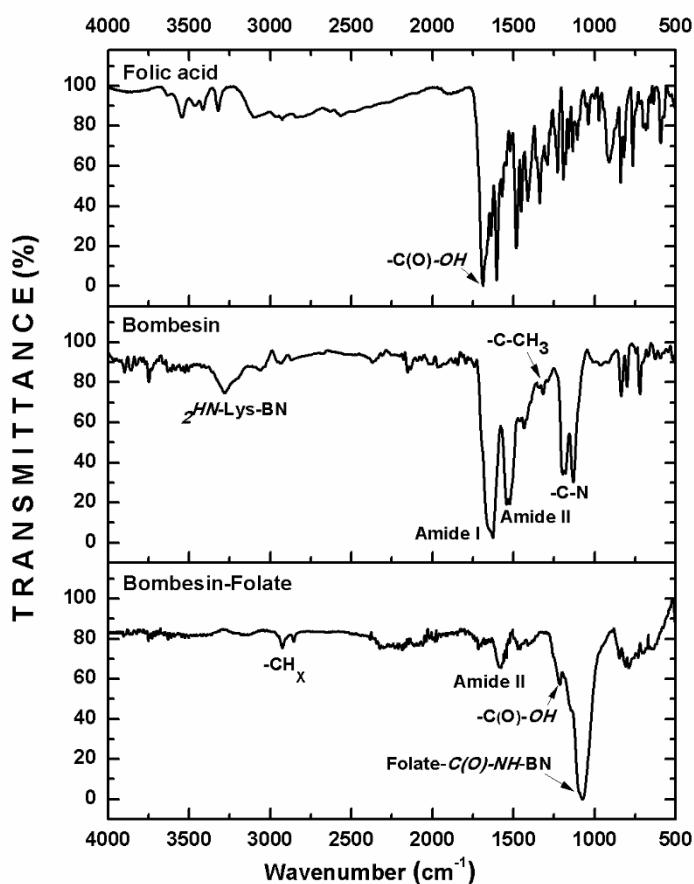


Figure 3. FT-IR spectra of the Folic acid, Bombesin and Bombesin-Folate.

MALDI-TOF mass spectrometry (MS). The pterin moiety of folic acid exists in tautomeric forms that are not very stable to photolysis [22,23]. In the Bombesin-Folate conjugate, the pterin moiety is photolyzed. Nevertheless, the main m/z found, indicated that the compound was chemically pure and corresponds to the Lys¹(α,γ -Folate)-Lys³(HYNIC)-Bombesin (1-14) (Bombesin-Folate) ($m/z=2168$).

Molecular modelling. The most stable conformers of the Bombesin- γ -Folate and Bombesin- α -Folate revealed energy values of 112 kcal·mol⁻¹ and 81 kcal·mol⁻¹, respectively. The coordination of technetium to the HYNIC moiety resulted in highly stable complex molecules with negative energy values for their most stable conformers. The ^{99m}Tc-Bombesin- γ -Folate energy was -260 kcal·mol⁻¹, and for ^{99m}Tc-Bombesin- α -Folate, it was -294 kcal·mol⁻¹. The distance between the pterate of folate and methionine of bombesin was 4.1 nm for the γ -regioisomer and 3.8 nm for the α -regioisomer.

It is known that the linker structure used is not only responsible for linking two peptides together and providing a site for the radionuclide, but also orients the peptides spatially and therefore influences the binding properties of the heterobivalent construct. Poethko et al. [24] reported that the minimum linker length is approximately 3.5 nm for the simultaneous binding of two peptide motifs to the receptors. As mentioned above, the longest distance between the biologically active sites (folate pterin moiety and the methionine residue of bombesin) was calculated to be from 3.8 to 4.1 nm, which are sufficiently long for the motifs to bind to adjacent GRPR and FR simultaneously. This result suggests that the ^{99m}Tc-Bombesin-Folate heterobivalent radiopharmaceutical can improve the *in vivo* tumour uptake due to the concomitant interaction with FRs and GRPRs.

7.1.6.3 Radiochemical purity (RP). The RP of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate was $96.05 \pm 2.12\%$, as obtained by HPLC analyses without post-labelling purification (n=12). The radioconjugate showed a protein binding of less than 1% at 2 h without ^{99m}Tc transchelation to cysteine, indicating an adequate radiopharmaceutical stability towards cysteine present in blood.

7.1.6.4 In vitro studies

The *in vitro* binding studies demonstrated that ^{99m}Tc -Bombesin-Folate displays high recognition by the GRPR and human folate receptor protein, with adequate IC_{50} values (less than 10 nM) (Fig. 4). A similar IC_{50} nanomolar scale has previously been reported for other bombesin analogues and folate derivatives considered as high affinity radiopharmaceuticals [25,26]. The ^{99m}Tc -Bombesin-Folate recognition by GRPRs and FRs, in agreement with the molecular modelling, indicated that the biological recognition sites of bombesin (eight C-terminal amino acids) and Folate (pterin moiety) in the conjugate are exposed to the medium without a significant effect on their conformational arrangement.

PCR studies demonstrated that the GRPR expression level in T47D cells is approximately six fold in comparison with FR expression (Fig. 5). Nevertheless, the GRPR and FR expression makes of T47D a suitable model for evaluating the heterobivalent radiopharmaceutical specificity.

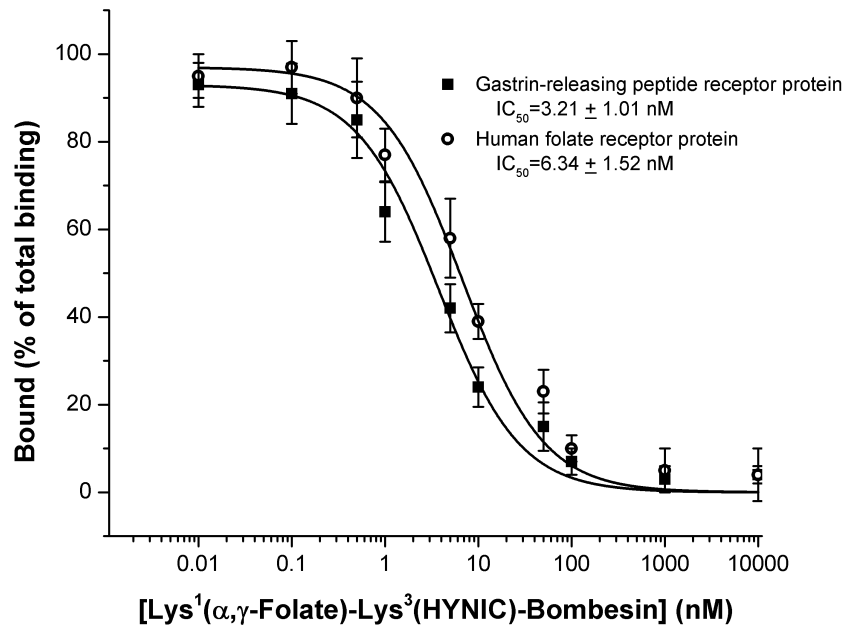


Figure 4. Inhibition of $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-EDDA/HYNIC})\text{-Bombesin}(1\text{-}14)$ binding to the GRP receptor recombinant protein or the human folate receptor protein by competition with the cold heterobivalent conjugate.

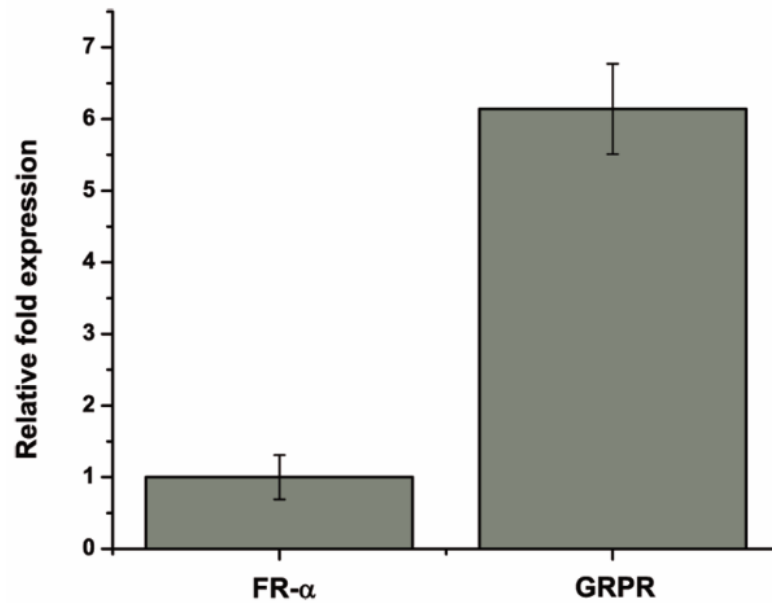


Figure 5. Relative expression of FR-α and GRPR in T47D cells evaluated by qPCR.

Cell studies showed an important uptake of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate in T47D cancer cells, which was significantly inhibited by pre-incubation with cold Lys³-bombesin peptide or folic acid alone ($p < 0.05$) (Table 1), indicating that the heterobivalent conjugate has specific recognition for GRPRs and FRs. ^{99m}Tc -Bombesin uptake was higher than that of the ^{99m}Tc -Folate in cancer cells (Table 1), which correlates with the higher GRPR expression with respect to FR found in T47D by PCR. These results suggest that the specific targeting of the heterobivalent ^{99m}Tc -Bombesin-Folate conjugate in T47D breast cancer cells is mainly dominated by the specific recognition of the bombesin moiety through GRP receptors. This behaviour was corroborated with the blocking experiments, in which pre-incubation with cold Lys³-bombesin showed greater blocking effect on the heterobivalent radiopharmaceutical (69.7% less uptake) compared with that of the cold folic acid (20.1% less uptake). Nevertheless, the *in vitro* T47D cell uptake was significantly higher for ^{99m}Tc -Bombesin-Folate than that of ^{99m}Tc -Folate or ^{99m}Tc -Bombesin (Table 1).

Table 1. ^{99m}Tc -Folate, ^{99m}Tc -Bombesin and ^{99m}Tc -Bombesin-Folate cell uptake and internalization (% of total activity \pm SD, n=9) in unblocked and blocked T47D cancer cells at 1h.

Radiopharmaceutical	Unblocked		Blocked with Folic acid ^a		Blocked with Lys ³ -bombesin ^a	
	Uptake	Internalization	Uptake	Internalization	Uptake	Internalization
^{99m}Tc -Folate	14.29 \pm 1.22*	7.31 \pm 0.96*	4.11 \pm 1.01*	2.89 \pm 1.21*	13.82 \pm 0.93	7.84 \pm 0.88
^{99m}Tc -Bombesin	33.03 \pm 1.52*	19.32 \pm 1.81*	32.87 \pm 1.47	20.01 \pm 1.22	3.98 \pm 0.84*	2.74 \pm 0.59*
^{99m}Tc -Bombesin-Folate	38.27 \pm 0.91*	23.63 \pm 1.48*	30.55 \pm 2.14*	18.62 \pm 1.03*	11.61 \pm 1.18*	6.89 \pm 0.76*
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (control)	3.41 \pm 0.74	1.54 \pm 0.85	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^aBlocked cells were incubated with an additional receptor blocking dose of Folic acid or Lys³-bombesin in order to determine the non-specific binding of radioactivity.

N.D.= not determined

*Significant statistical difference ($p < 0.05$) between blocked and unblocked

7.16.5 *In vivo* studies

Biodistribution studies. Biodistribution results of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate in T47D tumour-bearing mice showed a rapid renal excretion with $68.6 \pm 8.3\%$ of the administered activity eliminated by urine at 2 h. The kidney uptake was 15.65, 11.16 and 4.70% ID/g at 0.5, 2 and 24 h post-injection. High pancreas uptake was also found, due to the high natural expression of GRP receptors in this organ. Hepatobiliary elimination was very low ($< 2\%$ ID/g in liver at 30 min p.i.). Tumour uptake was 5.43% ID/g at 2 h (Table 2). ^{99m}Tc -Bombesin-Folate was rapidly cleared from blood, resulting in high tumour-to-blood ratios at 0.5, 2 and 24 h after injection. These results are in agreement with the low protein binding ($< 2\%$) in human serum at 2 h. Blocking studies with pre-injection of Lys³-bombesin or folic acid at 2 h showed a significant decrease in the T47D-tumor uptake with respect to that of unblocked mice ($p < 0.05$) (Table 2). These correlate with the *in vitro* results, since pre-injection of cold Lys³-bombesin also showed greater blocking effect on the heterobivalent radiopharmaceutical tumour uptake (68% less uptake) compared with that of the cold folic acid (30% less uptake) (Table 2). It is important to mention, that a significant decrease of renal uptake in folate-blocking studies should occur because of its natural FR expression. However, peptides such as bombesin are also highly retained in kidneys [3-6], and therefore makes observing the folate-blocking effect in this organ difficult after ^{99m}Tc -Bombesin-Folate administration.

Table 2. Biodistribution data of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate (1-14) in mice with T47D-induced tumours at 0.5, 2 and 24 h p.i. Results are shown as % ID/g (mean \pm SD, n=3).

Tissue	0.5 h	2 h	24 h	Blocked with Folic acid ^a 2 h	Blocked with Lys ³ -bombesin ^a 2 h
Blood	1.79 \pm 0.52	0.23 \pm 0.03	0.02 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	0.18 \pm 0.06
Heart	0.97 \pm 0.26	0.08 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03
Lungs	1.41 \pm 0.13	0.13 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.14 \pm 0.05
Liver	1.23 \pm 0.30	0.44 \pm 0.07	0.04 \pm 0.01	1.17 \pm 0.19	0.65 \pm 0.09
Pancreas	7.32 \pm 2.66	2.71 \pm 0.65*	1.84 \pm 0.56	1.97 \pm 0.81	0.25 \pm 0.16*
Spleen	1.16 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.12 \pm 0.03	0.19 \pm 0.05
Kidneys	15.65 \pm 1.45	11.16 \pm 1.38	4.70 \pm 0.93	10.38 \pm 0.51	11.56 \pm 0.80
Stomach	1.05 \pm 0.18	0.79 \pm 0.08	0.01 \pm 0.01	0.84 \pm 0.61	0.95 \pm 0.12
Intestine	0.84 \pm 0.13	0.37 \pm 0.06	0.01 \pm 0.01	0.39 \pm 0.02	0.51 \pm 0.09
Muscle	0.23 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Bone	0.22 \pm 0.05	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02
T47D Tumour	7.73 \pm 1.31	5.43 \pm 0.97*	2.47 \pm 0.63	3.78 \pm 0.67*	1.74 \pm 0.49*

^aBlocked mice were i.p. injected with an additional receptor-blocking dose of Folic acid or Lys³-bombesin.

*Significant statistical difference (p<0.05) between blocked and unblocked.

Figure 6 shows the biodistribution of ^{99m}Tc -Bombesin-Folate, ^{99m}Tc -Folate and ^{99m}Tc -Bombesin in T47D tumour-bearing mice at 2 h after radiopharmaceutical administration. The ^{99m}Tc -Bombesin-Folate heterobivalent molecule showed fast blood clearance and a significantly higher tumour uptake than that of ^{99m}Tc -Folate or ^{99m}Tc -Bombesin (p<0.05) (Fig. 6).

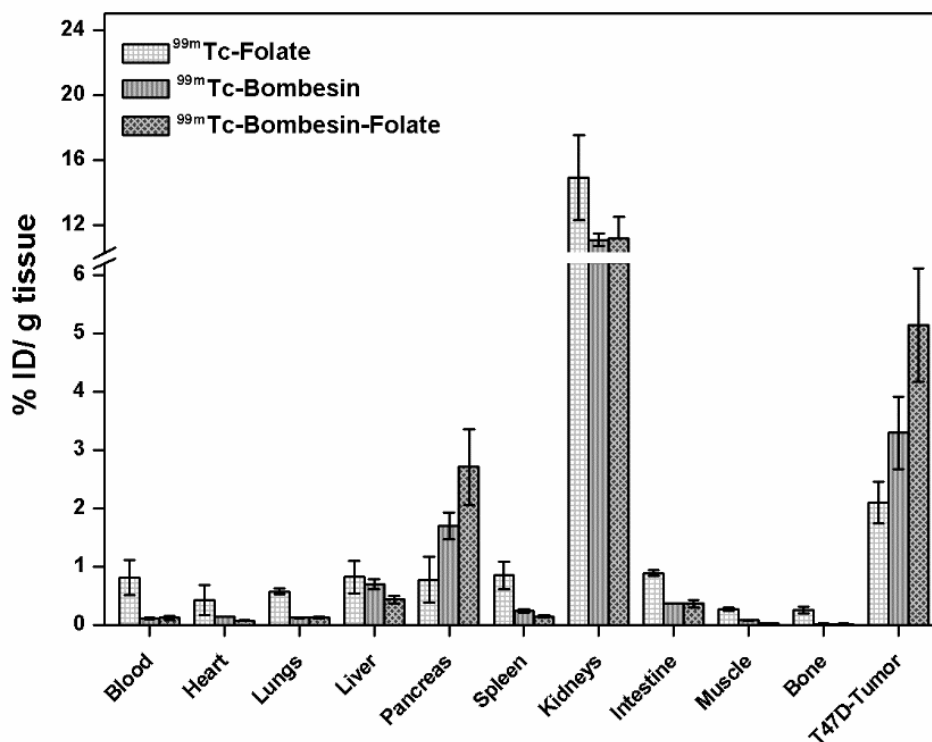


Figure 6. Biodistribution data of $^{99m}\text{Tc-Folate}$, $^{99m}\text{Tc-Bombesin}$ and $^{99m}\text{Tc-Bombesin-Folate}$ in T47D tumour-bearing mice at 2 h after radiopharmaceutical administration.

Peptide heterobivalent systems, such as the radiolabelled c(RGDyK)-Bombesin (7-14) or PSMA (prostate specific membrane antigen)-Bombesin, have been reported with a significantly increased tumour uptake and imaging signals compared to their corresponding monomeric agents [27-29]. Besides the improvement of tumour uptake and sensitivity by synergistic targeting, heterodimers should exhibit similar or better tumour retention than their respective monospecific tracer. A similar result was obtained in this study, $^{99m}\text{Tc-Bombesin-Folate}$ showed an enhanced tumour uptake and retention compared to $^{99m}\text{Tc-Bombesin}$ and $^{99m}\text{Tc-Folate}$, and thus, an improved contrast of T47D tumour imaging.

Representative micro-SPECT/CT images of ^{99m}Tc -Folate, ^{99m}Tc -Bombesin and ^{99m}Tc -Bombesin-Folate are shown in Figure 7. In general, tumours were clearly visible with high contrast at 2 h after radiopharmaceutical administration. Therefore, SUV data (Table 3) and micro-SPECT/CT images (Fig. 7) confirm that the use of heterobivalent radiopharmaceuticals improves tumour imaging.

Table 3. Standardized uptake value (SUV) of ^{99m}Tc -Folate, ^{99m}Tc -Bombesin, and ^{99m}Tc -Bombesin-Folate, in T47D tumour-bearing mice (n=3).

Radiopharmaceutical	SUV
^{99m}Tc -Folate	0.53 ± 0.11
^{99m}Tc -Bombesin	0.86 ± 0.17
^{99m}Tc -Bombesin-Folate	1.38 ± 0.33

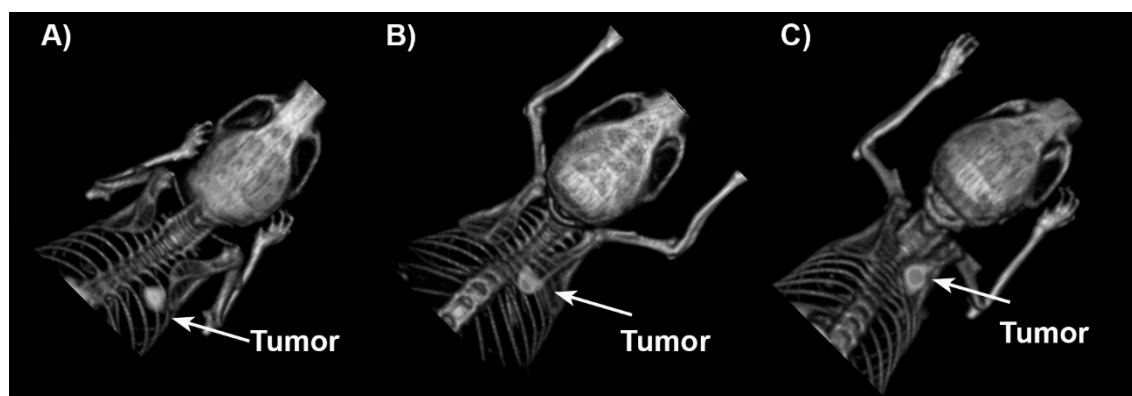


Figure 7. micro-SPECT/CT image of A) ^{99m}Tc -Folate, B) ^{99m}Tc -Bombesin and C) ^{99m}Tc -Bombesin-Folate, in T47D tumour-bearing mice.

7.1.7 Conclusions

Lys¹(α,γ -Folate)-Lys³(^{99m}Tc-EDDA/HYNIC)-Bombesin (^{99m}Tc-Bombesin-Folate) was prepared with high radiochemical purity. The *in vitro* and *in vivo* studies showed high radiopharmaceutical stability in human serum, high affinity for FR and GRPR, adequate tumour uptake with rapid blood clearance, and negligible hepatobiliary excretion. The tumour uptake of this heterobivalent radiopharmaceutical was higher than that of its respective monomers (^{99m}Tc-Folate and ^{99m}Tc-Bombesin). These results support that ^{99m}Tc-Bombesin-Folate improves the imaging of breast tumours overexpressing folate- and GRP-receptors.

Acknowledgment

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443).

We are grateful to Mario Romero Piña from the “Instituto Nacional de Cancerología (INCan)” for the microSPECT/CT imaging processing.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest

7.1.8 References

- 1 Dalm SU, Martens JW, Sieuwerts AM, van Deurzen CH, Koelewijn SJ, de Blois E, *et al.* In vitro and in vivo application of radiolabeled gastrin-releasing peptide receptor ligands in breast cancer. *J Nucl Med.* 2015; **56**: 752-7.
- 2 Sancho V, Di Florio A, Moody TW, Jensen RT. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr Drug Deliv.* 2011; **8**: 79-134.

- 3 Van de Wiele C, Phonteyne P, Pauwels P, Goethals I, Van den Broecke R, Cocquyt V, *et al.* Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J Nucl Med.* 2008; **49**: 260-64.
- 4 Santos-Cuevas CL, Ferro-Flores G, de Murphy CA, Pichardo-Romero PA. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women. *Nucl Med Commun.* 2008; **29**: 741-47.
- 5 Scopinaro F, Varvarigou A, Ussof W, De Vincentis G, Sourlingas T, Evangelatos G, *et al.* Technetium labeled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients. *Cancer Biother Radiopharm.* 2002; **17**: 327-35.
- 6 Shariati F, Aryana K, Fattahi A, Forghani MN, Azarian A, Zakavi SR, *et al.* Diagnostic value of ^{99m}Tc-bombesin scintigraphy for differentiation of malignant from benign breast lesions. *Nucl Med Commun.* 2014; **35**: 620-25.
- 7 Parry JJ, Andrews R, Rogers BE. MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; **101**: 175-83.
- 8 Prasanphanich AF, Retzliff L, Lane SR, Nanda PK, Sieckman GL, Rold TL, *et al.* In vitro and in vivo analysis of [⁶⁴Cu-NO₂A-8-Aoc-BBN (7-14) NH₂]: a site-directed radiopharmaceutical for positron-emission tomography imaging of T-47D human breast cancer tumors. *Nucl Med Biol.* 2009; **36**: 171-81.
- 9 Ait-Mohand S, Fournier P, Dumulon-Perreault V, Kiefer GE, Jurek P, Ferreira CL, *et al.* Evaluation of ⁶⁴Cu-labeled bifunctional chelate-bombesin conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2011; **22**: 1729-35.
- 10 Kelemen LE. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer.* 2006; **119**: 243-50.
- 11 Teng L, Xie J, Teng L, Lee RJ. Clinical translation of folate receptor-targeted therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012; **9**: 901-08.
- 12 Zhang Z, Li P, Chen H, Wei B, Xiao X, Da J, *et al.* Folate Receptor [alpha] Associated with Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; **138**: 890-5.

- 13 O'Shannessy DJ, Somers EB, Maltzman J, Smale R, Fu Y-S. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *SpringerPlus*. 2012; **1**: 1-9.
- 14 Necela BM, Crozier JA, Andorfer CA, Lewis-Tuffin L, Kachergus JM, Geiger XJ, *et al*. Folate Receptor- α (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors. *PLoS one*. 2015; **10**: e0122209.
- 15 Renukuntla J, Shah S, Boddu S, Vadlapudi A, Vadlapatla R, Pal D, *et al*. Functional characterization and expression of folate receptor- α in T47D human breast cancer cells. *Drug Dev Ther*. 2015; **6**: 52-61.
- 16 Fischer G, Schirmacher R, Wängler B, Wängler C. Radiolabeled heterobivalent peptidic ligands: an approach with high future potential for in vivo imaging and therapy of malignant diseases. *Chem Med Chem* 2013; **8**: 883-90.
- 17 Altiparmak B, Lambrecht FY, Bayrak E, Durkan K. Design and synthesis of ^{99m}Tc -citro-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical. *Int J Pharm*. 2010; **400**: 8-14.
- 18 Onursal M, Lambrecht FY, Ozgur A. Synthesis and biological evaluation of receptor-based tumor imaging agent: (^{99m}Tc)-folate-glucuric acid. *Int J Pharm*. 2011; **416**: 288-92.
- 19 Guggenberg EV, Mikolajczak R, Janota B, Riccabona G, Decristoforo C. Radiopharmaceutical development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe1, Tyr3]-octreotide, a somatostatin analog for tumor diagnosis. *J Pharm Sci*. 2004; **93**: 2497-506.
- 20 Dong Q, Xie Z-X, Xie C, Lu W-Y, Zhang Q, Li X, *et al*. Isomeric folate-conjugated polymeric micelles bind to folate receptors and display anticancer effects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; **15**: 7363-69.
- 21 Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*: Wiley 2004.
- 22 Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, *et al*. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2005; **80**: 47-55.
- 23 Thomas AH, Suárez G, Cabrerizo FM, Martino R, Capparelli AL. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2000; **135**: 147-54.

- 24 Poethko T, Thumshirn G, Hersel U, Rau F, Haubner R, Schwaiger M, *et al.* Improved tumor uptake, tumor retention and tumor/background ratios of pegylated RGD-multimers. *J Nucl Med.* 2003; **44**: 46P.
- 25 Baidoo KE, Lin K-S, Zhan Y, Finley P, Scheffel U, Wagner HN. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconjugate Chem.* 1998; **9**: 218-25.
- 26 Betzel T, Müller C, Groehn V, Müller A, Reber J, Fischer CR, *et al.* Radiosynthesis and preclinical evaluation of 3'-Aza-2'-[18F] fluorofolic acid: a novel PET radiotracer for folate receptor targeting. *Bioconjugate Chem.* 2013; **24**: 205-14.
- 27 Liu Z, Yan Y, Chin FT, Wang F, Chen X. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using 18F-labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer 18F-FB-PEG3-Glu-RGD-BBN. *J Med Chem.* 2008; **52**: 425-32.
- 28 Liu Z, Li Z-B, Cao Q, Liu S, Wang F, Chen X. Small-animal PET of tumors with 64Cu-labeled RGD-bombesin heterodimer. *J Nucl Med.* 2009; **50**: 1168-77.
- 29 Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K. Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate.* 2014; **74**: 659-68.

7.2 Artículo publicado

Synthesis and evaluation of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer

Liliana Aranda-Lara^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores^{1*}, Erika Azorín-Vega¹, Flor de María Ramírez¹, Blanca Ocampo-García¹, Clara Santos-Cuevas¹, Nallely Jiménez-Mancilla³, Keila Isaac-Olivé².

¹Departamento de Materiales Radiactivos. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, MEXICO.

²Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, MEXICO.

³Catedrática CONACyT. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, MEXICO.

*Corresponding author:

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.

Departamento de Materiales Radiactivos,

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa,

Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México.

Tel. + (52) (55)-53297200 ext. 13871,

e-mail: ferro_flores@yahoo.com.mx

guillermina.ferro@inin.gob.mx

7.2.1 Carta de aceptación del artículo

● **Guillermina Ferro Flores** <guillermina.ferro@inin.gob.mx>

26/10/15 at 2:51 PM ★

To: Erika Patricia Azorin Vega, Flor de María Ramírez de la Cr, Blanca EliGarcía, keilacanada1@yahoo.com, lilyar27@yahoo.com.mx, and 3 more...

-----Original Message-----

From: "Juan Azorin Nieto" <ees.ari.e31.34df4d.10ebc184@eesmail.elsevier.com>

To: ferro_flores@yahoo.com.mx, guillermina.ferro@inin.gob.mx

Date: 26 Oct 2015 20:21:54 +0000

Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: ARI-D-15-00769R1

Title: Synthesis and evaluation of Lys1(<alpha>,<gamma>-Folate)Lys3(177Lu-DOTA) Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer

Applied Radiation and Isotopes

Dear Dr. GUILLERMINA FERRO-FLORES,

I am pleased to confirm that your paper "Synthesis and evaluation of Lys1(<alpha>,<gamma>-Folate)Lys3(177Lu-DOTA) Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer" has been accepted for publication in Applied Radiation and Isotopes.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Juan Azorin Nieto, Dr.

Managing Guest Editor

Applied Radiation and Isotopes

7.2.2 Resumen

El objetivo del trabajo fue sintetizar Lys¹(α,γ -Folato)-Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesina (1-14) (¹⁷⁷Lu-Folato-BN), así como también evaluar su potencial para imagen molecular y radioterapia dirigida en tumores de mama que sobre-expresan receptores de folato (FR) y receptores del péptido liberador de gastrina (GRPR). La dosis absorbida de radicación de ¹⁷⁷Lu-Folato-BN (74 MBq, i.v.) estimada en ratones atómicos con tumores inducidos T47D (positivos a FR y GRPR), mostraron dosis al tumor de 23.9 ± 2.1 Gy. Los tumores T47D fueron claramente visibles (Micro-SPECT/CT images). ¹⁷⁷Lu-Folato-BN demostró propiedades adecuadas como radiofármaco teranóstico.

7.2.3 Abstract

The aim of this work was to synthesize $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOXA})\text{-Bombesin}$ (1-14) ($^{177}\text{Lu-Folate-BN}$), as well as to assess its potential for molecular imaging and targeted radiotherapy of breast tumors expressing folate receptors (FR) and gastrin-releasing peptide receptors (GRPR). Radiation absorbed doses of $^{177}\text{Lu-Folate-BN}$ (74 MBq, i.v.) estimated in athymic mice with T47D-induced breast tumors (positive to FR and GRPR), showed tumor doses of 23.9 ± 2.1 Gy. T47D-tumors were clearly visible (Micro-SPECT/CT images). $^{177}\text{Lu-Folate-BN}$ demonstrated properties suitable as a theranostic radiopharmaceutical.

Keywords: Lutetium-177; theranostic radiopharmaceuticals; heterobivalent molecules; breast cancer

Highlights

- $^{177}\text{Lu-Folate-BN}$ improves recognition of breast cancer cells positive to FR and GRPR.
- $^{177}\text{Lu-Folate-BN}$ shows theranostic (imaging and radiation therapy) properties.
- The heterobivalent $^{177}\text{Lu-Folate-BN}$ tracer interacts with different targets on tumors.

7.2.4 Introduction

^{177}Lu -labeled molecules with target-specific recognition, have been proposed as a new class of theranostic radiopharmaceuticals because of ^{177}Lu therapeutic (β^-_{max} emission of 497 keV) and diagnostic (γ -emission of 113 and 208 keV) properties (Barnerjee et al., 2015; Ferro-Flores et al., 2015). ^{177}Lu -radiopharmaceuticals offer an ideal opportunity for theranostics since the diagnostic dose can be increased to obtain therapeutic effect ((Barnerjee et al., 2015). Over the last two decades, several experimental evidences have suggested that the gastrin-releasing peptide (GRP) and other bombesin-like peptides act as growth factors in many types of cancer (Sancho et al., 2011). A significant overexpression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) is present in breast cancer (Gugger and Reubi, 1999). Different bombesin analogs with high affinity for GRPR have been evaluated in preclinical studies for imaging and therapy (Sancho et al., 2011). Clinical studies in women using radio-bombesin derivatives have shown successful radionuclide imaging of breast tumors (Santos-Cuevas et al., 2008; Scopirano et al., 2002; Van de Wiele et al., 2008).

In particular, the GRPR is highly expressed in T47D human breast cancer cells, and that is the reason for which these cells have been used as tumoral models to evaluate new bombesin probes (Parry et al., 2007; Prashanphanich et al., 2009).

Folate receptor- α (FR α) is a membrane-bound protein with high affinity for binding and transporting folate into cells. Folate is a basic component of cell metabolism and DNA synthesis and repair. Cancer cells, which rapidly divide, have an increased requirement for folate to maintain DNA synthesis, an observation supported by the widespread use of antifolates in cancer chemotherapy (Kelemen 2006; Teng et al., 2012).

The overexpression of the FR α protein has been confirmed in all clinical breast cancer subtypes comprised of estrogen receptor-positive (ER+), progesterone receptor-positive (PR+), human epidermal growth factor receptor-positive (HER2+), and triple negative (ER $^-$, HER2 $^-$, PR $^-$) tumors (Necela et al., 2015; O'Shannessy et al., 2012; Zhang et al., 2012). Recent polymerase chain reaction studies confirmed that FR α is highly expressed in T47D cells (Renukuntla et al., 2015).

The development of radiolabeled heterobivalent molecules that interact concomitantly with different targets on tumor cells is an important strategy employed for specific, sensitive, and non-invasive tumor imaging and therapy (Fisher et al., 2013). Therefore, a heterobivalent conjugate of bombesin and folate is expected to improve both the recognition of breast cancer cells positive to FR and GRPR, and its theranostic (imaging and radiation therapy) properties when labeling with ^{177}Lu .

The aim of this work was to synthesize the Lys $^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{-Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOXA})\text{-Bombesin (1-14)}$ ($^{177}\text{Lu-Folate-BN}$) heterobivalent conjugate, as well as to assess its *in vitro* and *in vivo* potential for molecular imaging and targeted radiotherapy of breast tumors expressing folate receptors (FR) and gastrin releasing peptide receptors (GRPR).

7.2.5 Experimental methods

7.2.5.1 Synthesis of Lys $^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{Lys}^3(\text{DOXA})\text{-Bombesin (1-14)}$ [Folate-BN]

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA) and were used as received. H $_2$ N-Lys $^1\text{Lys}^3(\text{DOXA})\text{-Bombesin (1-14)}$ (DOXA-BN) peptide with a purity of > 90% (MALDI+, m/z=1745), was obtained from piChem Laboratory (Graz, Austria). The synthesis and chemical characterization of DOXA-Gly-Gly-Cys-NH $_2$ (DOXA-

GGC) was carried out according to the detailed procedure previously reported with a purity of >95% (MALDI+) $m/z=621.12$ $[M+H]^+$ (calculated 621.68) (Luna-Gutierrez et al., 2012).

Activation of the folic acid carboxylate group. Eighty microliters of folic acid solution [2.25 μmol ; 1 mg in 80 μL of dimethylformamide (DMF)] was added to a mixture containing 50 μL of 0.2 M diisopropylethylamine (DIPEA, to provide a basic medium) (9.3 μmol ; 1.2 mg in 50 μL of DMF) and 50 μL of the carboxylate activating agent [HATU = (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluoro phosphate); 2.63 μmol , 1 mg in 50 μL of DMF]. The reaction mixture was incubated for 15 min at room temperature (20°C).

Conjugation. To 80 μL of the above solution (1 μmol of activated folate), 0.5 mg (1.16 μmol) of DOTA-BN, previously dissolved in 20 μL of DMF, was added. The reaction mixture was incubated for 90 min at room temperature (20°C). DMF was removed under vacuum. The reaction mixture was reconstituted in 0.5 mL of PBS and purified using a size exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC, 1 mL loop) system (YMC-Pack-Diol-60, 8 mm x 500 mm I.D., 1 mL/min, PBS/acetonitrile 70/30) with a photodiode array UV-Vis detector. The retention time (t_R) for the DOTA-Folate-BN was 13.6 min. For the DOTA-GGC and Folate, it was 16.6 min and 16.2 min, respectively. The collected fraction, with a t_R of 13.6 min, was dried under high vacuum, obtaining a slightly yellowish solid. The solid was dissolved with 0.5 mL of PBS to obtain a conjugate concentration of approximately 1 mg/mL. For comparative studies, DOTA-GGC was conjugated to folate under the same procedure.

7.2.5.2 *Labeling of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(DOTA)-Bombesin (1-14) with ¹⁷⁷Lu [¹⁷⁷Lu-Folate-BN]*

Radiolabeling was carried out by adding ¹⁷⁷LuCl₃ (50 μ l, 1850 MBq, n.c.a., ITG, Germany) to the Folate-BN conjugate (100 μ g in 150 μ L of 1 M sodium acetate buffer, pH 5) and incubated at 92°C during 20 min. The final solution was diluted with 2 mL of 0.9% NaCl solution containing 20 mg of ascorbic acid. For comparative studies, ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-Folate (¹⁷⁷Lu-Folate) and ¹⁷⁷Lu-Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesin (¹⁷⁷Lu-BN) were also prepared under the same procedure .

7.2.5.3 *Radiochemical purity*

The RP was determined by reversed-phase HPLC on a C-18 column (μ Bondapak C18 column, Waters) using a Waters Empower system with an in-line radioactivity detector and a gradient of water/acetonitrile containing 0.1% TFA from 95/5 (v/v) to 20/80 (v/v) over 35 min at a flow rate of 1 mL/min. Using this system, free ¹⁷⁷LuCl₃ shows a $t_R=3-3.5$ min and the radioconjugate, 13-14 min.

7.2.5.4 *Stability in human serum*

To determine the stability of ¹⁷⁷Lu-Folate-BN in serum, 200 μ L of radiotracer was diluted at a ratio of 1:10 with fresh human serum and incubated at 37°C. Radiochemical stability was determined by 100 μ L samples taken at different time points from 10 min to 24 h for radio HPLC size exclusion analysis (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, PBS). A shift in the radioactivity profile to larger molecular weight indicates protein binding, while lower molecular weight indicates labeled catabolites or serum cysteine binding.

7.2.5.5 *In vitro affinity studies*

A 96-well microplate (Corning, NY, USA) was coated with a 100 μ L/well of poly-L-lysine (0.1 mg/mL) and incubated at room temperature (20°C) for 20 min. The solution was removed and the plate dried at 37°C. Each well was coated with 100 μ L (150 ng) of purified human folate receptor protein (Sigma-Aldrich, SL, USA) or 100 μ L (150 ng) of gastrin-releasing peptide receptor/GRPR recombinant protein (Novus Biologicals, LLC, USA) solution in coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) and was incubated at 4°C for 20 h. The plates were washed twice with binding buffer (0.1% bovine serum albumin (BSA) in coating buffer). The wells were blocked for 2 h with 200 μ L of blocking buffer (1% BSA in coating buffer), which was then discharged. Then, 140 μ L of binding buffer containing 70 kBq of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesin (1-14), and appropriate dilutions (from 10000 nM to 0.01 nM) of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(DOTA)-Bombesin, were incubated in the wells at 25°C for 1 h. After incubation, the plates were washed three times with binding buffer. The wells were cut out and counted in a gamma counter. IC₅₀ values (the concentration of folic acid inhibiting 50% of radioligand binding) were calculated by non-linear regression analysis. Each data point was the average of six wells (n=6).

7.2.5.6 *In vitro uptake studies*

The T47D human breast cancer cell line (obtained from the ATCC, USA) was grown at 37°C with 5% CO₂ and 85% humidity in folate-free RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and penicillin). The cell lines suspended in fresh medium were diluted to 1x10⁶ cells/tube with PBS and incubated with 20

μL (0.9 MBq) of ^{177}Lu -Folate-BN, ^{177}Lu -BN or ^{177}Lu -Folate in triplicate at 37 °C for 1 h. The test tubes were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and washed with phosphate-buffered saline. Radioactivity in the cell pellet represents both membrane-bound and internalized radiopharmaceutical and was measured in a crystal scintillation well-type detector (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). The membrane-bound activity was removed with 1 mL of 0.2 M acetic acid/ 0.5 M NaCl solution added to the cell pellet. The test tubes were centrifuged and the pellet activity, which was considered as internalization, was measured. Blocking studies were carried out in parallel. The cells were pre-incubated with 50 μL of folic acid in 0.01 M NaOH (0.5 mM) or 50 μL of Lys³-Bombesin (0.5 mM) for 30 min before addition of the radiopharmaceutical.

7.2.5.7 *In vivo studies*

Tumor uptake studies in mice were carried out according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. Athymic mice, 6-7 weeks old and 18-20 g in weight, were kept in sterile cages with sterile wood-shaving beds, constant temperature, humidity, noise and 12:12 light periods. Athymic mice were maintained on a folate-free diet for 3 weeks before biodistribution and imaging studies.

Tumor induction in athymic mice

T47D tumors were induced by subcutaneous injection of cells (2×10^6) suspended in 0.1 mL of phosphate-buffered saline into the upper back of 6-7 week-old nude mice. Injection sites were observed at regular intervals for tumor formation and progression.

Biodistribution studies

Athymic mice with T47D-induced tumors were injected in the tail vein with ^{177}Lu -Folate-BN (100 μL , 74 MBq). Mice were sacrificed at 2, 4, 24, 48 and 120 h (n=3 for each mouse)

after radiopharmaceutical administration. Whole heart, lungs, liver, spleen, kidneys and samples of tumor, blood, intestines, bone and muscle were placed into pre-weighted plastic test tubes. The activity was determined in a well-type scintillation detector along with two aliquots of a diluted standard representing 100% of the injected dose. Mean activities were used to obtain the percentage of injected activity per gram of tissue (%ID/g) and/or per organ (%ID).

For the blocking studies, T47D tumor-bearing mice were injected with unlabeled Lys³-Bombesin (1-14) (50 μL, 0.5 mM) or folic acid (50 μL in 0.01 M NaOH, 0.5 mM) via tail vein ten minutes before intravenous injection of ¹⁷⁷Lu-Folate-BN (100 μL, 74 MBq) and complete dissection was carried out at 2 h after radiopharmaceutical administration as described above.

For comparison with the ¹⁷⁷Lu-Folate-BN biodistribution, 100 μL of ¹⁷⁷Lu-BN (74 MBq) or ¹⁷⁷Lu-GGC-Folate (74 MBq) was intravenously injected into the T47D tumor-bearing mice (n=3 for each group) which were dissected at 2, 4, 24, 48 and 120 h (n=3 for each mouse) after radiopharmaceutical administration as described above.

Biokinetic model and radiation absorbed dose estimation

The percentages of injected dose at different times in spleen, liver, kidneys and tumors (average 0.1 g) were used to derive the ¹⁷⁷Lu-Folate-BN, ¹⁷⁷Lu-BN or ¹⁷⁷Lu-Folate time-activity curves corrected by decay [$q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}$], which represent the biological behavior in each organ. The $A_h(t)$ functions were then obtained [$A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_{Lu-177} t}$] so that, integrated over time, they give the total number of disintegrations (N) of each radionuclide in the source regions normalized to unit-administered activity (MBq), as follows:

$$N_{\text{source}} = \int_{t=0}^{t=\infty} A_h(t) dt \quad (1)$$

The absorbed dose to organs was evaluated according to the general equation 2:

$$\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_{\text{sources}} N_{\text{source}} \times DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}} \quad (2)$$

where $\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is the mean absorbed dose to a target organ from a source organ and

$DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is a dose factor (equation 3).

$$DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_i \Delta_i \Phi_i (\text{target} \leftarrow \text{source}) \quad (3)$$

The Δ_i terms are the mean energy emitted per disintegration for the various i-type radiations (i-type emissions, $\sum n_i E_i$). The Φ_i terms are the absorbed fractions that depend on the properties of the i-type emission and the size, shape, and distance of the source and target organs. DF values were calculated according to Miller et al. (Miller et al. 2005) using the beta-absorbed fractions in a mouse model calculated by two Monte Carlo radiation transport codes, MCNP4C and PEREGRINE (voxel-based).

7.2.5.8 *Imaging*

Single photon emission computed tomography (SPECT) and X-ray computed tomography (CT) images were acquired at 4 h and 24 h after radiopharmaceutical injection using a micro-SPECT/CT scanner (Albira, ONCOVISION, Spain) to verify the tumor uptake. Mice under 2% isoflurane anesthesia were placed in the prone position and whole body imaging was performed. The micro-SPECT field of view was 60 mm, a symmetric 20% window was set at 208 keV and pinhole collimators were used to acquire a 3D SPECT image with a total of 64 projections of 30 s, over 360°. The image dataset was then reconstructed using the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm with a standard mode parameter, as

provided by the manufacturer. CT parameters were 35 kV sure voltage, 700 μ A current and 600 micro-CT projections.

7.2.5.9 Statistical Analysis

Comparisons between groups in the blocking assay and for tumor uptake were made using the Student's t-test (significance was defined as $p < 0.05$).

7.2.6 Results and discussion

The overall reaction yield to obtain (α,γ) -Folate-BN was 28%. Regioisomer separation was not carried out, since it has been reported that both α -Folate and γ -Folate conjugates recognize FR α (Dong et al., 2014).

7.2.6.1 Chemical characterization

UV-vis spectroscopy. The UV-vis spectra of BN and (α,γ) -Folate-BN are presented in Figure 1. The main differences between the spectrum of the Lys¹ (α,γ) -Folate)-Lys³(DOTA)-BN conjugate and the folate lie in the spectrum itself, where all bands from the folate are seen, and those from the BN-peptide at 230 nm ($n \rightarrow \pi^*$ transition) and 204 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) disappear.

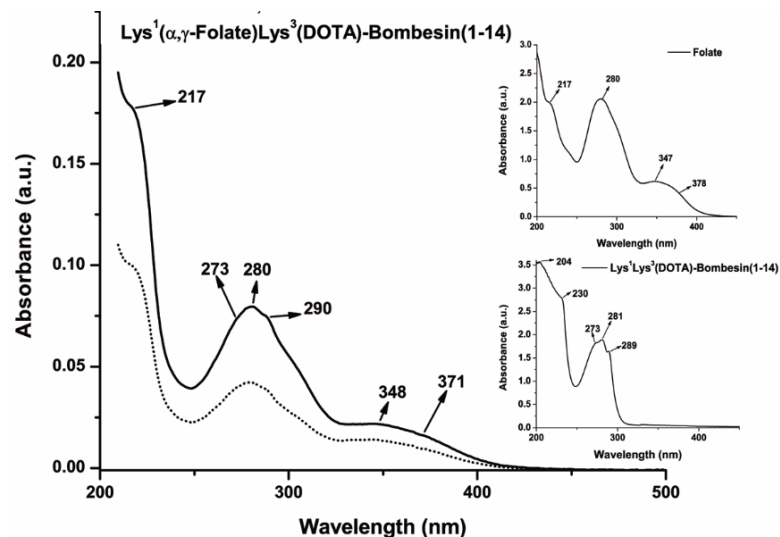


Figure 1. UV-Vis spectra of Folate, Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesin (1-14) and Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(DOTA)-Bombesin (1-14).

FT-IR spectroscopy. The IR spectra of BN and (α,γ)-Folate-BN are presented in Figure 2. The appearance of the new (α,γ)-Folate-BN conjugate reveals a significant change in the molecular symmetry of the BN and the folic acid after conjugation. The Lys¹-Lys³(DOTA)-BN spectrum shows very strong bands from its amide I and amide II in the 1665-1585 cm⁻¹ region and strong bands in the 1570-1480 cm⁻¹ region associated to the C=O stretching and N-H bending vibration, respectively. The conjugation of the peptide to the folate resulted in a conjugate where these amide bands disappeared or were the weakest in the spectrum (1659 and 1543 cm⁻¹). The strongest band observed in the conjugate spectrum is that centered at 1064 cm⁻¹, which is associated to the formation of the new amide bond. Its position corresponds to an amide III in the peptide chain.

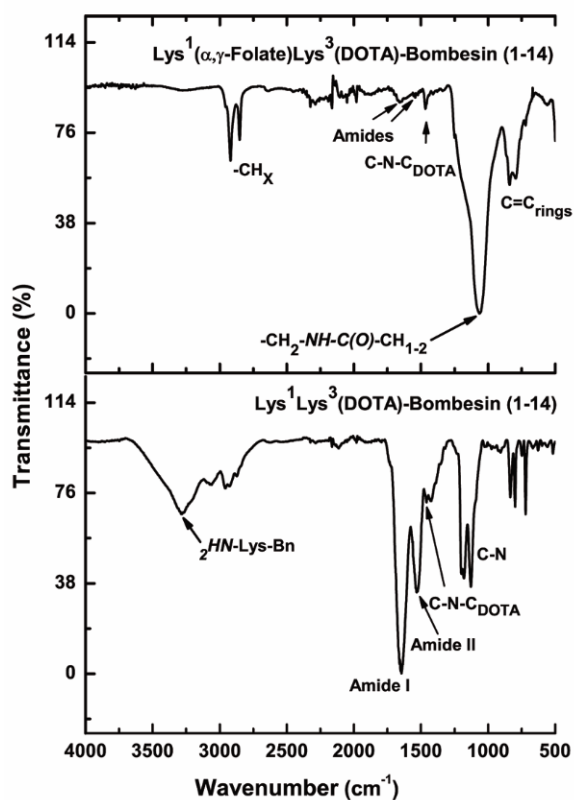


Figure 2. FT-IR spectra of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(DOTA)-Bombesin (1-14) (top) and Lys¹Lys³(DOTA)-Bombesin (1-14) (bottom).

MALDI-TOF mass spectrometry (MS). In the Folate-BN conjugate, the pterin moiety is photolyzed. Nevertheless, the main m/z found indicated that the compound was chemically pure and corresponds to the Lys¹(α,γ -Folate)-Lys³(DOTA)-BN (m/z =2419).

Radiochemical purity (RP). The RP of ¹⁷⁷Lu-Folate-BN was 96.05 \pm 2.12%, as obtained by HPLC analyses without post-labeling purification (n=12). The radioconjugate showed a protein binding of less than 2% at 2 h.

7.2.6.2 *In vitro studies*

In vitro binding studies. The binding study demonstrated that ¹⁷⁷Lu-Folate-BN displays high recognition by the GRPR and human folate receptor protein with adequate IC₅₀ values (less than 10 nM) (Fig. 3). A similar IC₅₀ nanomolar scale has previously been reported for other bombesin analogues and folate derivatives as high affinity radiopharmaceuticals (Baidoo et al., 1998; Betzel et al., 2013).

The ¹⁷⁷Lu-Folate-BN recognition by GRPRs and FRs indicated that the biological recognition sites of BN (eight C-terminal amino acids) and Folate (pterin moiety) in the conjugate are exposed to the medium without a significant effect on their conformational arrangement.

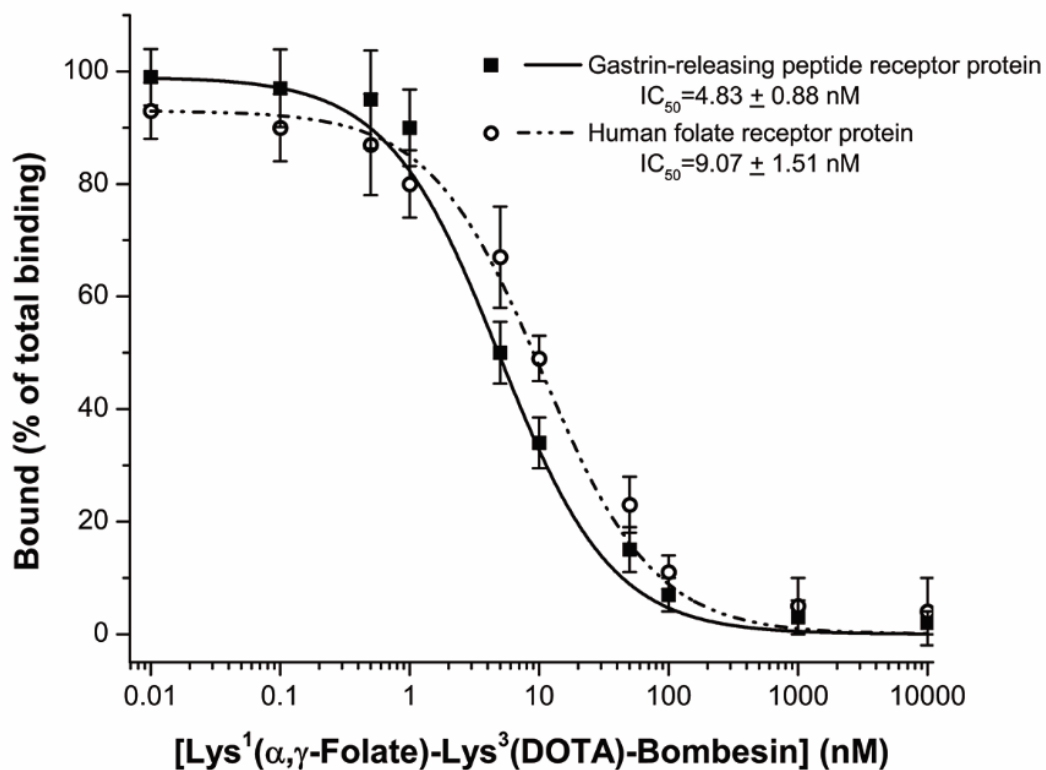


Figure 3. Inhibition of Lys¹(α,γ-Folate)-Lys³(¹⁷⁷Lu-DOТА)-Bombesin(1-14) binding to the GRP receptor recombinant protein or the human folate receptor protein by competition with the cold heterobivalent conjugate.

The *in vitro* uptake studies showed an important uptake of ¹⁷⁷Lu-Folate-BN in T47D cancer cells (33.27 ± 2.52%), which was significantly inhibited (p<0.05) by pre-incubation with cold Lys³-Bombesin peptide (9.23 ± 1.22%) or folic acid alone (19.45 ± 1.22%), indicating that the heterobivalent conjugate has specific recognition for GRPRs and folate receptors.

7.2.6.3 *In vivo* studies

Biodistribution studies. Biodistribution results of ¹⁷⁷Lu-Folate-BN in T47D tumor-bearing mice showed a rapid renal excretion with 70.1 ± 6.9% of the administered activity eliminated by urine at 2 h. Biodistribution studies at different times are shown in Table 1. Hepatobiliary elimination was very low. ¹⁷⁷Lu-Folate-BN was rapidly cleared from blood. These results are

in agreement with the low protein binding (< 2%) in human serum at 2 h. Blocking studies with pre-injection of folic acid or Lys³-Bombesin at 2 h showed a T47D-tumor uptake of $3.98 \pm 0.74\%$ and $1.89 \pm 0.51\%$ respectively, which were significantly lower than that observed in unblocked mice ($5.71 \pm 0.58\%$) ($p < 0.05$).

Table 1. Biodistribution data of Lys¹(α,γ -Folate)Lys³(¹⁷⁷Lu-DOTA)-Bombesin (1-14) in mice with T47D-induced tumor at 2, 4, 24, 48 and 120 h p.i. Results are shown as % ID/g (mean \pm SD, n=3). % ID/organ is indicated in brackets.

Tissue	2 h	4 h	24 h	48 h	120 h
Blood	0.19 ± 0.06	0.09 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Heart	0.15 ± 0.09	0.08 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Lungs	0.27 ± 0.07 [0.04 ± 0.01]	0.12 ± 0.01 [0.02 ± 0.00]	0.08 ± 0.01 [0.01 ± 0.00]	0.03 ± 0.02 [0.00 ± 0.00]	0.02 ± 0.01 [0.00 ± 0.00]
Liver	0.42 ± 0.11 [0.47 ± 0.12]	0.26 ± 0.12 [0.29 ± 0.13]	0.18 ± 0.04 [0.20 ± 0.04]	0.11 ± 0.01 [0.12 ± 0.01]	0.03 ± 0.01 [0.03 ± 0.01]
Pancreas	2.11 ± 0.30 [0.22 ± 0.03]	1.93 ± 0.14 [0.20 ± 0.01]	0.53 ± 0.06 [0.06 ± 0.01]	0.37 ± 0.08 [0.04 ± 0.01]	0.25 ± 0.03 [0.03 ± 0.00]
Spleen	0.27 ± 0.05 [0.03 ± 0.01]	0.19 ± 0.05 [0.02 ± 0.01]	0.05 ± 0.02 [0.01 ± 0.00]	0.04 ± 0.02 [0.01 ± 0.00]	0.01 ± 0.01 [0.00 ± 0.00]
Kidneys	14.56 ± 1.3 [4.78 ± 0.41]	13.95 ± 1.01 [4.29 ± 0.32]	5.19 ± 2.28 [1.75 ± 0.73]	3.12 ± 1.43 [0.92 ± 0.46]	1.37 ± 0.09 [0.32 ± 0.03]
Intestine	0.34 ± 0.08	0.24 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.05 ± 0.01
Muscle	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Stomach	0.21 ± 0.12	0.18 ± 0.08	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
T47D Tumor	6.27 ± 0.71	5.71 ± 0.58	2.62 ± 0.06	1.71 ± 0.05	1.57 ± 0.26

Radiation absorbed doses for ¹⁷⁷Lu-Folate-BN, ¹⁷⁷Lu-BN and ¹⁷⁷Lu-Folate are shown in Figure 4 and Table 2. It is evident that the ¹⁷⁷Lu-Folate-BN heterobivalent radiopharmaceutical enhanced the tumor radiation absorbed dose (23.9 ± 2.1 Gy with the

administration of 74 MBq) with respect to that of ^{177}Lu -BN (12.8 ± 0.59 Gy/74 MBq) and ^{177}Lu -Folate (7.84 ± 0.37 Gy/74 MBq). However, in all cases, kidney radiation absorbed doses were higher than in the tumors. It is known that peptides (e.g. bombesin) and folic acid are highly retained in kidneys, and that is the reason for which cold L-lysine and/or L-arginine must be administered in patients before radiopharmaceutical administration to significantly reduce renal retention during the peptide radionuclide therapy (Zaknun et al., 2013). The co-injection of anti-folate drugs such as pemetrexed to inhibit kidney retention due to the presence of folate in the heterobivalent radiopharmaceutical, is also proposed (Reber et al., 2013). Under these considerations, ^{177}Lu -Folate-BN demonstrated properties suitable as a radiopharmaceutical for targeted radiotherapy of breast tumors.

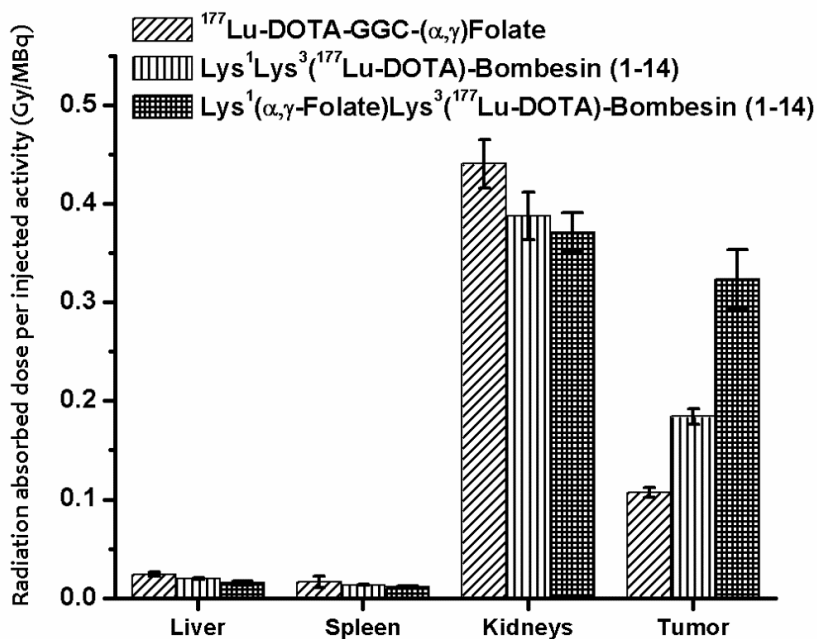


Figure 4. Radiation-absorbed doses normalized to unit-administered activity (Gy/MBq) of ^{177}Lu -DOTA-GGC-(α,γ)Folate, $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesin (1-14)}$ and $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOTA})\text{-Bombesin(1-14)}$ to liver, spleen, kidney and T47D tumors induced in mice.

Table 2. Radiation absorbed doses. The ^{177}Lu -absorbed dose delivered to tumors was 23.9 ± 2.1 Gy (74 MBq, intravenously administered) for the $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu}\text{-DOTA})\text{-Bombesin}$ (1-14) conjugate.

Radioconjugate	Biokinetic model	$\int_{t=0}^{t=\infty} q_h(t) dt$ Biological residence time (h)	$\int_{t=0}^{t=\infty} A_h(t) dt$ (Total desintegrations) (h)	Absorbed dose (Gy/MBq)
^{177}Lu -Folate	$q_h(t) = 1.82e^{-5.37E-2t} + 0.48e^{-8.90E-5t}$ $A_h(t) = 1.82e^{-5.80E-2t} + 0.48e^{-4.39E-3t}$	55.058	1.422	0.106 ± 0.005
^{177}Lu -BN	$q_h(t) = 2.8e^{-3.66E-2t} + 0.71e^{-6.90E-5t}$ $A_h(t) = 2.8e^{-4.09E-2t} + 0.71e^{-4.37E-3t}$	104.098	2.314	0.173 ± 0.008
^{177}Lu -Folate-BN	$q_h(t) = 5.42e^{-6.82E-2t} + 1.56e^{-6.20E-5t}$ $A_h(t) = 5.42e^{-7.25E-2t} + 1.56e^{-4.36E-3t}$	252.407	4.337	0.323 ± 0.030

Imaging. Representative micro-SPECT/CT images of ^{177}Lu -Folate-BN at 4h and 24 h are shown in Figure 5. In general, tumors were clearly visible with high contrast and high retention after 24 h.

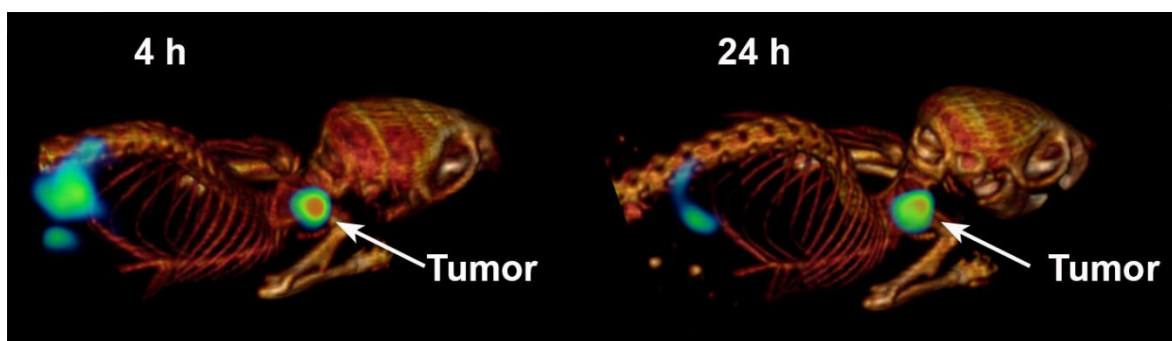


Figure 5. Micro-SPECT/CT image of $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folate})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu}\text{-DOTA})\text{-Bombesin}$ (1-14) in T47D tumor-bearing mice A) 4 h and B) 24 h after radiopharmaceutical administration.

7.2.7 Conclusions

The ^{177}Lu -Folate-BN theranostic radiopharmaceutical has potential application in medical diagnosis and targeted radiotherapy of breast cancer due to the concomitant recognition of GRPR and FR α . The results obtained warrant a further clinical study to determine the in vivo tumor uptake, radiation dose and therapeutic potential.

Acknowledgment

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443).

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest

7.2.8 References

- Baidoo, K.E., Lin, K.-S., Zhan, Y., Finley, P., Scheffel, U., Wagner, H.N., 1998. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconjug. Chem.* 9, 218-225.
- Banerjee, S., Pillai, M., Knapp, F., 2015. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem. Rev.* 115, 2934-2974.
- Betzel, T., Müller, C., Groehn, V., Müller, A., Reber, J., Fischer, C.R., Krämer, S.D., Schibli, R., Ametamey, S.M., 2013. Radiosynthesis and preclinical evaluation of 3'-Aza-2'-[18F] fluorofolic acid: a novel PET radiotracer for folate receptor targeting. *Bioconjugate Chem.* 24, 205-214.
- Dong, Q., Xie, Z.-X., Xie, C., Lu, W.-Y., Zhang, Q., Li, X., Liu, M., 2014. Isomeric folate-conjugated polymeric micelles bind to folate receptors and display anticancer effects. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 7363-7369.

Ferro-Flores, G., Ocampo-Garcia, B.E., Santos-Cuevas, C.L., Maria Ramirez, F., Azorin-Vega, E.P., Melendez-Alafort, L., 2015. Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (177)Lu and Conjugated to Peptides. *Curr. Radiopharm.* 8, 150-159.

Fischer, G., Schirmmacher, R., Wängler, B., Wängler, C., 2013. Radiolabeled heterobivalent peptidic ligands: an approach with high future potential for in vivo imaging and therapy of malignant diseases. *Chem. Med. Chem.* 8, 883-890.

Gugger, M., Reubi, J.C., 1999. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.* 155, 2067-2076.

Kelemen, L.E., 2006. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int. J. Cancer* 119, 243-250.

Luna- Gutiérrez, M., Ferro- Flores, G., Ocampo- García, B., Jiménez- Mancilla, N., Morales- Avila, E., León- Rodríguez, D., Isaac- Olivé, K., 2012. 177Lu- labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing α (v) β (3) integrins. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 55, 140-148.

Miller, W.H., Hartmann-Siantar, C., Fisher, D., Descalle, M.-A., Daly, T., Lehmann, J., Lewis, M.R., Hoffman, T., Smith, J., Situ, P.D., 2005. Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for 90Y, 188Re, 166Ho, 149Pm, 64Cu, and 177Lu radionuclides. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20, 436-449.

Necela, B.M., Crozier, J.A., Andorfer, C.A., Lewis-Tuffin, L., Kachergus, J.M., Geiger, X.J., Kalari, K.R., Serie, D.J., Sun, Z., Aspita, A.M., 2015. Folate Receptor- α (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors. *PLoS One* 10, e0122209.

O'Shannessy, D.J., Somers, E.B., Maltzman, J., Smale, R., Fu, Y.-S., 2012. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *SpringerPlus* 1, 1-9.

Parry, J.J., Andrews, R., Rogers, B.E., 2007. MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast Cancer Res. Treat.* 101, 175-183.

Prasanphanich, A.F., Retzliff, L., Lane, S.R., Nanda, P.K., Sieckman, G.L., Rold, T.L., Ma, L., Figueroa, S.D., Sublett, S.V., Hoffman, T.J., 2009. In vitro and in vivo analysis of [64Cu-NO2A-8-Aoc-BBN (7-14) NH 2]: a site-directed radiopharmaceutical for positron-

emission tomography imaging of T-47D human breast cancer tumors. *Nucl. Med. Biol.* 36, 171-181.

Reber, J., Haller, S., Leamon, C.P., Müller, C., 2013. ¹⁷⁷Lu-EC0800 combined with the antifolate pemetrexed: preclinical pilot study of folate receptor targeted radionuclide tumor therapy. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2436-2445.

Renukuntla, J., Shah, S., Boddu, S., Vadlapudi, A., Vadlapatla, R., Pal, D., Mitra, A.K., 2015. Functional characterization and expression of folate receptor- α in T47D human breast cancer cells. *Drug Develop. Therapeutics* 6, 52-61.

Sancho, V., Di Florio, A., Moody, T.W., Jensen, R.T., 2011. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr. Drug Deliv.* 8, 79-134.

Santos-Cuevas, C.L., Ferro-Flores, G., de Murphy, C.A., Pichardo-Romero, P.A., 2008. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women. *Nucl. Med. Commun.* 29, 741-747.

Scopinaro, F., Varvarigou, A., Ussof, W., De Vincentis, G., Sourlingas, T., Evangelatos, G., Datsteris, J., Archimandritis, S., 2002. Technetium labeled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients. *Cancer Biother. Radiopharm.* 17, 327-335.

Teng, L., Xie, J., Teng, L., Lee, R.J., 2012. Clinical translation of folate receptor-targeted therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 901-908.

Van de Wiele, C., Phonteyne, P., Pauwels, P., Goethals, I., Van den Broecke, R., Cocquyt, V., Dierckx, R.A., 2008. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J. Nucl. Med.* 49, 260-264.

Zaknun, J.J., Bodei, L., Mueller-Brand, J., Pavel, M., Baum, R., Hörsch, D., O'Dorisio, M., O'Dorisio, T., Howe, J., Cremonesi, M., 2013. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40, 800-816.

Zhang, Z., Li, P., Chen, H., Wei, B., Xiao, X., Da, J., Skinner, K., Hicks, D.G., 2014. Folate Receptor [alpha] Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 890-895.

7.3. Artículo publicado

Trabajo científico

Synthesis and evaluation of the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate radiopharmaceutical.

Síntesis y evaluación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folato.

Liliana Aranda-Lara^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores^{1,*}, Flor de María Ramírez¹, Blanca Ocampo-García¹, Clara Santos-Cuevas¹, Erika Azorín-Vega¹, Keila Isaac-Olivé²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750, Ocoyoacac, Estado de México, MEXICO.

² Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México, 50180, Toluca, Estado de México, MEXICO.

* Guillermina Ferro-Flores, Ph.D. Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares Carretera México-Toluca S/N. La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750, México. Tel. + (52) (55)-53297200, e-mail: guillermina.ferro@inin.gob.mx

7.3.1 Carta de aceptación del artículo



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2060
www.afmac.org.mx

Expediente: 552

México, D.F. a 03 de marzo de 2016

Dra. Guillermina Ferro Flores
Departamento de Materiales Radiactivos
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Presente

Estimada doctora Ferro:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Trabajo Científico** intitulado:

"Synthesis and evaluation of the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(a,y)-Folate radiopharmaceutical "

de los autores *Liliana Aranda-Lara, Guillermina Ferro-Flores, Flor de María Ramírez, Blanca Ocampo-García, Clara Santos-Cuevas, Erika Azorín-Vega, Keila Isaac-Olivé*, ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 46, No. 3 julio-septiembre 2015.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica


Dr. Francisco Hernández Luis
Coeditor


Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Editor

c.c.p. Dr. Vicente Jesús Hernández Abad Editor RMCF
c.c.p. Archivo AFMAC

F-ER-AFM-018

7.3.2 Resumen

El ácido fólico reconoce específicamente al receptor folato (RF) sobreexpresado en carcinomas. Los radiofármacos de folato tienen afinidad por RF pero alta absorción renal. La secuencia Gly-Gly-Cys mejora la eliminación renal. El objetivo fue sintetizar el ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys(α,γ)-Folato y evaluar su potencial *in vitro* e *in vivo* para reconocer RF. El conjugado se caracterizó químicamente (UV-Vis, FT-IR, MALDI-TOF) y se radiomarcó con ^{99m}Tc . La afinidad *in vitro* y la biodistribución se evaluaron en células T47D (FR+) y en ratones atímicos con tumores inducidos. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys(α,γ)-Folato mostró alta pureza radioquímica (> 94%), afinidad por los RF ($\text{IC}_{50}=0,3\text{nM}$), rápida eliminación sanguínea, captación tumoral adecuada (2,4% ID/g a 2h), y retención renal baja (1,6% ID/g a 24 h). ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys(α,γ)-Folato es útil como un agente de imagen para reconocer RF.

Palabras clave: receptor folato, ^{99m}Tc -HYNIC, HYNIC-GGC, folato radiomarcado, imágenes de folato.

Abstract

Folic acid is specifically recognized by folate receptors (FRs) overexpressed in carcinomas. Folate radiopharmaceuticals have FR affinity but high kidney uptake. The Gly-Gly-Cys peptide sequence improves the molecule's renal clearance. The aim of this work was to synthesize the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys(α,γ)-Folate radiopharmaceutical and to evaluate the *in vitro* and *in vivo* potential to target FRs. The conjugate was chemically characterized (UV-Vis, FT-IR, MALDI-TOF) and labeled with ^{99m}Tc . *In vitro* binding and biodistribution studies were carried out in T47D breast cancer cells (FR+) and athymic mice

with T47D-induced tumors respectively. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate showed high radiochemical purity (>94%), affinity for the FRs (IC_{50} =0.3 nM), rapid blood clearance, adequate tumor uptake (2.4% ID/g at 2 h), and low kidney retention (1.6% ID/g at 24 h). ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate is useful as an imaging agent to target FRs.

Keywords: folate receptor, ^{99m}Tc -HYNIC, HYNIC-GGC, radiolabeled folate, folate imaging

7.3.3 Introduction

The folate (F) molecule is an essential vitamin (B9) required by all living cells for the synthesis of DNA and aminoacid metabolism¹. The F uptake in cells is mainly carried out by three transport systems². The most studied are (i) folate receptors (FRs), a family of glycoproteins rich in cysteine that bind with high affinity to F through its pterate moiety, which is the basis of F-FR specific recognition³. Previous studies have suggested that FRs recognize Folate- γ -carboxylate but not α -carboxylate derivatives⁴⁻⁷. In contrast, it was recently demonstrated that both α - and γ -folate derivatives are able to bind to FR positive cells at virtually identical levels, provided that steric disruption on pteric acid does not occur⁸⁻¹⁰. As F is an essential molecule for cellular proliferation, FRs are not the only pathway to F cellular uptake. It is also incorporated through (ii) the reduced folate carrier (RFC), an anionic antiporter and the major transport system for reduced folates in mammalian cells and tissues at physiologic pH, and (iii) the proton-coupled folate transporter (PCFT), a proton-folate symporter that functions optimally at acidic pH by coupling the downhill flow of protons to the uphill flow of folates into the cell².

Folate receptors are expressed in normal tissues, but are overexpressed to a different extent in carcinomas². FR overexpression is the main reason for the various SPECT and PET folate derivative radiopharmaceuticals reported over the past two decades. In the case of SPECT radiopharmaceuticals, ^{99m}Tc is still the radionuclide of choice because of the well-known chemical and physical advantages¹¹.

Several ^{99m}Tc chelating agents have been used to label folic acid, such as ethylenedicysteine (EC)^{12,13}, diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)^{14,15}, hydrazinonicotinamide

(HYNIC)^{6,11,16-18}, mercapto-acetyl-N-Gly-Gly-Gly (MAG₃)¹⁹, and tricarbonyl (CO)₃²⁰, as well as other different coordination systems²¹⁻²³.

Most of the above conjugates have adequate FR affinity, but high kidney uptake because the proximal tubule cells absorb and retain folate as a normal physiological process to prevent the vitamin loss¹. However, in the case of ^{99m}Tc-MAG₃-Folate¹⁹, the kidney uptake is low due to the presence of MAG₃, which is excreted by the tubular cells without renal retention²⁴, but with hepatobiliary elimination. Additionally, previous studies suggest that the Gly-Gly-Gly (GGG) or Gly-Gly-Cys (GGC) peptide sequence improves the renal clearance of small molecules²⁵.

Moreover, the reported HYNIC-Folate derivatives are prepared using trisodium triphenylphosphine 3-3'-3''-trisulphonate (TPPTS) as coligand^{6,11,17,18}. Recently, Ortiz-Arzate et al. ²⁶ showed that ^{99m}Tc-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (EDDA)/HYNIC has better hydrophilicity and therefore, higher renal clearance than that of ^{99m}Tc-TPPTS/HYNIC²⁷.

A ^{99m}Tc-Folate radiopharmaceutical without hepatobiliary excretion, with fast renal clearance, and negligible reabsorption could be useful not only to improve tumor detection. The aim of this work was to synthesize the ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate and to evaluate the chemical, *in vitro* and *in vivo* radiopharmaceutical properties to target tumors overexpressing folate receptors.

7.3.4 Materials and Methods

7.3.4.1 Synthesis of the ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-Gly-Gly-Cys-(α,γ)-Folate conjugate

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA) and were used as received. The synthesis and chemical characterization of HYNIC-Gly-Gly-

Cys-NH₂ (HYNIC-GGC) was carried out accordingly to the detailed procedure previously reported, (MALDI⁺) *m/z* = 370.29 (calc. 370.40)²⁸. **Figure 1** shows the overall scheme of the conjugate preparation.

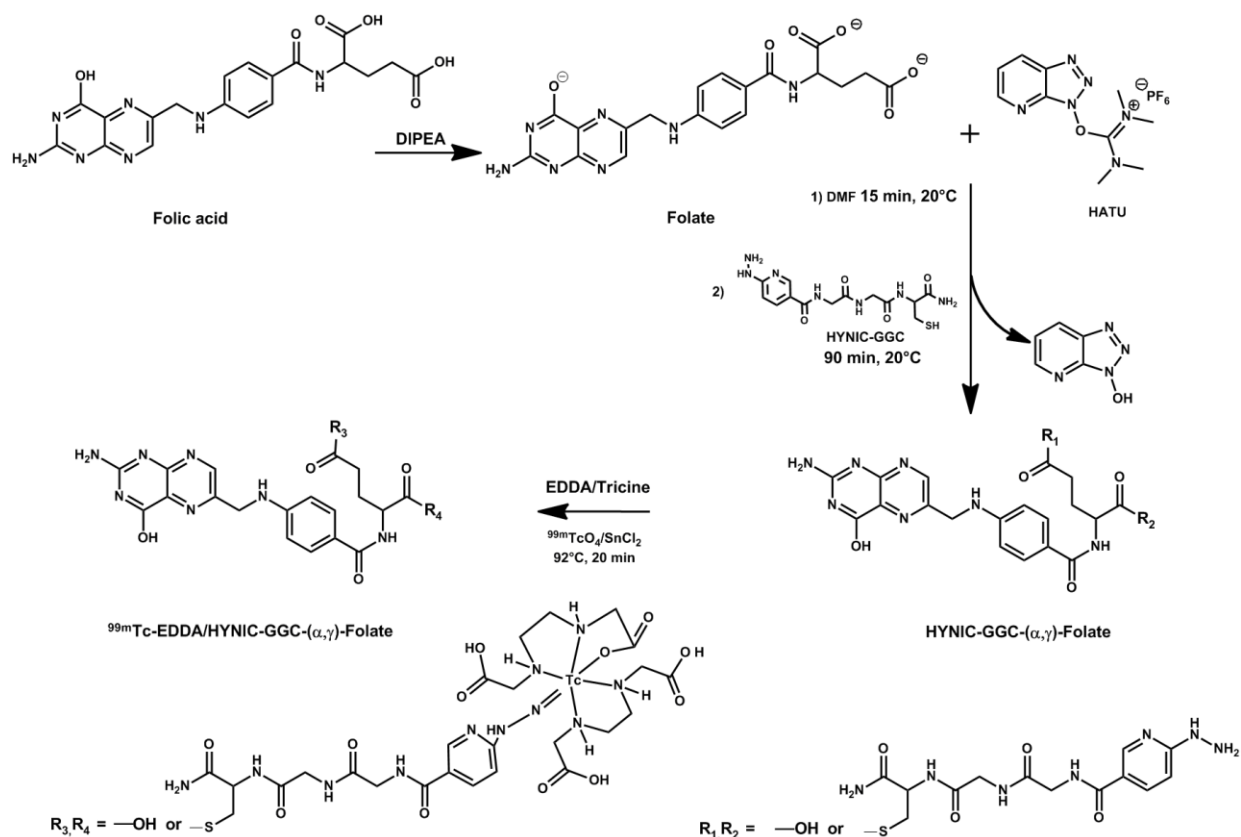


Figure 1. Overall scheme of the ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate synthesis.

Activation of the folic acid carboxylate group. 80 μ L of folic acid solution [2.25 μ mol; 1 mg in 80 μ L of dimethylformamide (DMF)] was added to a mixture containing 50 μ L of 0.2 M diisopropylethylamine (DIPEA, to provide a basic medium) (9.3 μ mol; 1.2 mg in 50 μ L of DMF) and 50 μ L of the carboxylate activating agent [HATU = (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluoro phosphate); 2.63 μ mol, 1 mg in 50 μ L of DMF]. The reaction mixture was incubated for 15 min at room temperature (20°C).

Conjugation. To 80 μL of the above solution (1 μmol of activated folate), 0.5 mg (1.16 μmol) of HYNIC-GGC, previously dissolved in 20 μL of DMF, was added. The reaction mixture was incubated for 90 min at room temperature (20°C). DMF was removed under vacuum. The reaction mixture was reconstituted in 0.5 mL of PBS and purified using a size exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC, 1 mL loop) system (YMC-Pack-Diol-60, 8 mm x 500 mm I.D., 1 mL/min, PBS/acetonitrile 70/30) with a photodiode array UV-Vis detector. The retention time (t_R) for the HYNIC-GGC-Folate was 13.55 min., with a shoulder approx. at 13.87 min, and for the HYNIC-GGC and Folate, it was 16.6 min. and 16.2 min, respectively. The collected fraction with a t_R of 13.55 min was dried under high vacuum, obtaining a slightly yellowish solid. The solid was dissolved with 0.5 mL of PBS to obtain a conjugate concentration of approximately 1 mg/mL.

In order to find out the exact t_R of the shoulder, the chromatogram from size exclusion HPLC was fitted to a Lorentzian function using the multiple peaks model. The best fit was for three peaks at $t_R = 13.47, 13.65$ and 13.92 min with a $R^2 = 0.994$.

7.3.4.2 Chemical characterization

The HYNIC-GGC-Folate conjugate was separated by HPLC as a mixture of α - and γ -HYNIC-GGC-Folate regioisomers, and was characterized and used without further regioisomer separation.

UV-Vis spectroscopy. UV-Vis Spectra of folic acid (1 mg dissolved in 0.1 M NaOH), HYNIC-GGC, and the HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate derivative were obtained in the range of 200-700 nm with a Perkin-Elmer Lambda-Bio spectrometer using a 1 cm quartz cuvette.

FT-IR spectroscopy. Spectra of folic acid, HYNIC-GGC, and HYNIC-GGC-(α,γ)-Folic acid, in solid form, were obtained on a Perkin Elmer System spectrometer (Spectrum 400)

(Waltham, MA, USA) with an attenuated total reflection platform (Diamond GLADIATOR, Pike Technologies; Madison, WI, USA) from 500 to 4000 cm^{-1} .

Mass spectrometry. MALDI-TOF mass spectrum of HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate was measured with a microflex mass spectrometer (Bruker, USA), operating in reflector mode and using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. Data was processed using the Bruker Daltonics flex Analysis software.

Molecular modeling. Based on the experimental results, the HYNIC-GGC-(α)-Folate and HYNIC-GGC-(γ)-Folate regioisomeric molecules were built taking into account valence, bond type, carbonyl group position, charge, hybridization, and minimum energies (Molecular Mechanics calculations by Augmented MM3 procedure). The lowest energy conformer (CONFLEX procedure) and heats of formation (Quantum-mechanical calculations by MOPAC/PM5 and MOPAC/PM5/COSMO procedures) associated to the optimized geometry of their structures were calculated using the CAChe Pro 5.04 program package for Windows® (Fujitsu Ltd., 2000-2001). Sequential application of Augmented MM3/CONFLEX procedures yielded the most stable conformers for the HYNIC-GGC-Folate structures while MOPAC/PM5/COSMO procedures evaluated the solvent effect (water) on their stabilization, which is reflected in the heat of formation.

7.3.4.3 Radiolabeling of HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate with $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Radiolabeling was carried out by adding 0.5 mL of EDDA-Tricine solution (30 mg of EDDA in 1.5 mL of 0.1 M NaOH and 60 mg of tricine in 1.5 mL of 0.2 M phosphate buffer, pH=7), 10 μL of SnCl_2 solution (1 mg/mL, in 0.012M HCl), and 0.5 mL of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetate

(GETEC-ININ, Mexico, 740-925 MBq) to 50 μL of HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (1 mg/mL), followed by incubation at 92°C for 20 min. in a dry block heater.

Radiochemical purity was determined by ITLC-SG and HPLC. For the ITLC-SG analysis, three different mobile phases were used: 2-butanone (MECK) to determine the amount of free $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$); 0.1 M sodium citrate (pH 5) to determine the amount of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/Tricine and $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1$); and methanol: 1 M ammonium acetate (1:1 v/v) for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -colloid ($^{99\text{m}}\text{Tc-O}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ $R_f = 0$). R_f values of the radiolabelled GGC-Folate in each system were 0.0, 0.0 and 0.7-1.0, respectively.

Reversed-phase HPLC was performed using a Waters Empower system with an in-line radioactivity detector on a C-18 column ($\mu\text{Bondapak C}_{18}$ column, Waters) and a gradient of water/acetonitrile containing 0.1% TFA from 95/5 (v/v) to 20/80 (v/v) over 35 min. at a flow rate of 1 mL/min. Using this system, free $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ showed a retention time $t_R = 3.0$ - 3.5 min, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/Tricine $t_R = 4.0$ - 4.6 min; and $t_R = 12.48$, 12.85, and 13.45 min for the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate. In order to find out the exact t_R of the shoulder, the radiochromatogram from reversed-phase HPLC was fitted to a Lorentzian function using the multiple peaks model. The best fit was for three peaks at $t_R = 12.28$, 12.82 and 13.55 min with a $R^2 = 0.987$.

7.3.4.4 *In vitro* evaluation

Stability in human serum. To determine the stability of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate in serum, 200 μL of radiotracer was diluted at a ratio of 1:10 with fresh human serum and incubated at 37°C. Radiochemical stability was determined by 100 μL samples taken at different time points from 10 min to 24 h for radio-HPLC size exclusion analysis (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, PBS). Chromatographic profiles were obtained using two

different detector systems, the UV-Vis detector and a radiometric detector. The sample first passes through the UV detector and then through the radioactive one. A shift in the radioactivity profile to larger molecular weight indicated protein binding, while lower molecular weight indicated labeled catabolites or serum cysteine binding.

Solid-phase binding assay. A 96-well microplate (Corning, NY, USA) was coated with a 100 μ L/well of poly-L-lysine (0.1 mg/mL) and incubated at room temperature (20°C) for 20 min. The solution was removed and the plate dried at 37°C. Each well was coated with 100 μ L (150 ng) of purified human FR protein (Sigma-Aldrich, SL, USA) solution in coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂), and was incubated at 4°C for 20 h. The plates were washed twice with binding buffer (0.1% bovine serum albumin (BSA) in coating buffer). The wells were blocked for 2 h with 200 μ L of blocking buffer (1% BSA in coating buffer). Then, 140 μ L of binding buffer containing 70 kBq of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate and appropriate dilutions (from 10000 nM to 0.01 nM of HYNIC-GGC-Folate) were incubated in the wells at 25°C for 1 h. After incubation, the plates were washed three times with binding buffer. The wells were cut out and counted in a gamma counter. IC₅₀ values (the concentration of folic acid inhibiting 50% of the radioligand binding) were calculated by nonlinear regression analysis. Each data point was the average of six wells (n=6).

In vitro assays. The T47D (human breast cancer, FR+), obtained from ATCC (USA) were grown at 37°C with 5% CO₂ and 85% humidity in RPMI-1640 culture medium. For comparison purposes T47D cells were also cultured in folate free RPMI-1640 medium. Both culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (streptomycin and penicillin). The cell lines suspended in fresh medium were diluted to

1×10^6 cells/tube with PBS and incubated with 20 μL (0.6 MBq) of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (n=6) at 37°C for 1 h. The test tubes were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and washed with phosphate-buffered saline. Radioactivity in the cell pellet represents both membrane-bound and internalized $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate, and was measured in a crystal scintillation well-type detector (Auto In-v-tron 4010, NML, Inc.). Blocking studies were carried out in parallel. The cells were pre-incubated with 4.5 mM folic acid in 0.01 M NaOH for 30 min before addition of the radiopharmaceutical.

7.3.4.5 *In vivo* evaluation

Animal model. Tumor uptake studies in mice were carried out according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. Athymic female mice, 6-7 weeks old, and 18-20 g weight, were kept in sterile cages with sterile wood-shaving beds, constant temperature, humidity, noise, and 12:12 light periods. Water and food (standard PMI 5001 feed) were given *ad libitum*.

Tumor induction in athymic mice. T47D tumors were induced by subcutaneous injection of cells (1.5×10^6) suspended in 0.1 mL of phosphate-buffered saline into the upper back of 6-7 week-old athymic mice. Injection sites were observed at regular intervals for tumor formation and progression.

Biodistribution studies in T47D. Athymic mice with T47D induced tumors were injected into the tail vein with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (100 μL , 3-4 MBq). Mice were sacrificed at 0.25 h (n=3), 2 h (n=3), and 24 h (n=3) after radiopharmaceutical administration. Whole heart, lungs, liver, spleen, kidneys, and samples of tumor, blood, intestines, bone, and muscle were placed into pre-weighted plastic test tubes. The activity was determined in a well-type scintillation detector along with two aliquots of a diluted standard representing

100% of the injected dose. Mean activities were used to obtain the percentage of injected activity per gram of tissue (%ID/g) or %ID/organ. For the blocking studies, T47D tumor-bearing mice were injected with unlabeled folic acid (50 μ L in 0.01 M NaOH, 1mg/ml) via tail vein 5 minutes before intravenous injection of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (100 μ L, 4 MBq) and complete dissection was carried out at 2 h after radiopharmaceutical administration as described above.

Imaging studies. Athymic mice with T47D tumors were intravenously injected with ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (100 μ L, 7.4 MBq) and anesthetized with 2% isoflurane. Static radioisotopic and X-ray images were obtained with the preclinical imaging system (*In-vivo Xtreme*, Bruker) using a 10 x 6 cm parallel-hole collimator at 0.25, 2, and 24 h after radiopharmaceutical administration.

7.3.4.6 Statistical analysis

Differences between the *in vitro* cell data were evaluated with the Student's t-test (significance was defined as $p < 0.05$).

7.3.5 Results and discussion

7.3.5.1 Synthesis of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate

The overall reaction scheme for the synthesis and radiolabeling of the ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate is shown in **Figure 1**. The final product was purified using a size-exclusion high-performance liquid (HPLC) system and PBS/acetonitrile 70/30 as eluent. The retention time (t_R) for the HYNIC-GGC-Folate was 13.55 min., with a shoulder approx. at 13.87 min, and for the HYNIC-GGC and Folate, it was 16.6 min. and 16.2 min, respectively. The collected fraction with a t_R of 13.55 min was dried under high vacuum,

obtaining a slightly yellowish solid. The solid was dissolved with 0.5 mL of PBS to obtain a conjugate concentration of approximately 1 mg/mL.

The size-exclusion HPLC chromatogram of the purified conjugate (**Figure 2**), showed a peak and a shoulder, which could be due to the presence of the α - and γ - HYNIC-GGC-Folate regioisomer mixture, since the α - and γ -carboxylic of folic acid are both susceptible to activation and conjugation by the HYNIC-GGC. Previous studies have shown that by size exclusion and reversed-phase HPLC, the retention time for the γ -Folate derivative is slightly shorter than that of the α -Folate derivative regioisomer and the intensity is usually higher for the γ -Folate^{6,8,10}. The same tendency was observed in the HPLC chromatogram of the HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate. A statistical analysis of the chromatogram (see experimental) revealed three peaks at $t_R = 13.47, 13.65$ and 13.92 min. The two former could be associated to two conformers of the HYNIC-GGC-(γ)-Folate isomer, and the latter to the HYNIC-GGC-(α)-Folate.

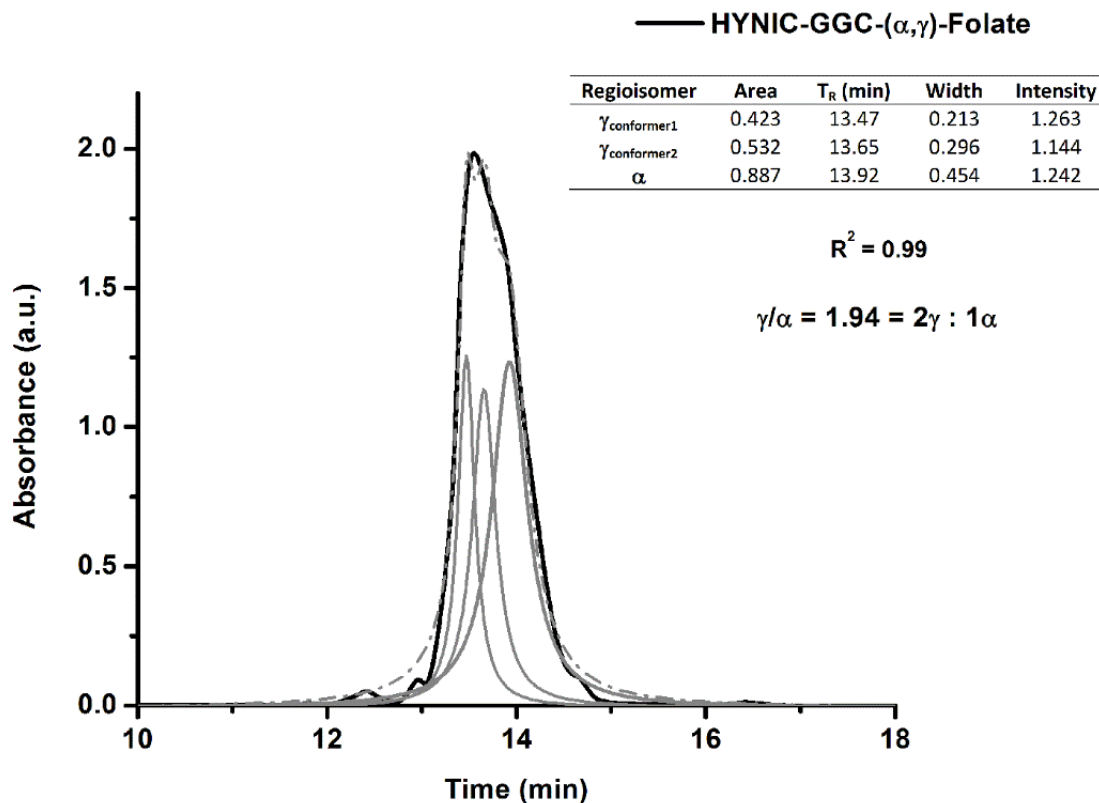


Figure 2. Size-exclusion HPLC chromatogram (YMC-Pack-Diol-60, 1 mL/min, PBS/acetonitrile 70/30) of the HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate.

7.3.5.2 Chemical characterization

UV-vis spectroscopy. In **Figure 3** the folate, HYNIC-GGC and HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate spectra are shown. It has been reported that the absorption spectrum of folic acid is very sensitive to the pH and photolysis²⁹⁻³¹. This is revealed in the folate spectrum (pH=13, basic aqueous medium), where an unresolved band at 217 nm due to the carboxylate $n \rightarrow \pi^*$ transition is observed. The strongest band at 280 nm, due to the *para* bi-substituted phenyl group $\pi \rightarrow \pi^*$ transition, is defined. At 347 nm, the imine ($-C=N-$) $n \rightarrow \pi^*$ transition from the pterin group is seen with the lowest absorbance. The HYNIC-GGC spectrum at pH 7 (neutral aqueous medium) is weak and not well-resolved, although three main maxima were located

at 255, 287, and 330 nm, which correspond to the peptide amide chain, and to the -C=C- and imine (C=N-) groups from the HYNIC ring, respectively. The conjugation of folate to HYNIC-GGC notably affects the absorption spectrum. As it was mentioned above, the new HYNIC-GGC-Folate conjugate is a mixture of its α - and γ -isomers; therefore, its spectrum has a broad un-symmetric feature which reveals two maxima, at 228 nm due to the thio-carbonyl group $n \rightarrow \pi^*$ transitions, and at 252 nm due to amide chain $n \rightarrow \pi^*$ transitions. At 327 nm, the C=N group $n \rightarrow \pi^*$ transition is also observed. The blue shift of the band located at about 347 nm in the free folate results from the pH change in the reaction medium and the effect of the conjugation. The band has contribution from the C=N group $n \rightarrow \pi^*$ transitions of the HYNIC-GGC peptide; thus, it is not well-resolved and is seen as a shoulder. The electronic transitions from the substituted phenyl groups are masked by those from the amide chain. In order to locate the maximum wavelenghts with more accuracy, the spectrum was treated with a multi-peaks model using Lorentzian peak functions from the Origin software. The best fit ($R^2 = 0.99$) was with 5 peaks for five bands at 223, 233, 252, 283, and 325 nm (see inset of Figure 3), that confirms that the HYNIC-GGC-Folate conjugate was obtained as a mixture of its α - and γ - isomers.

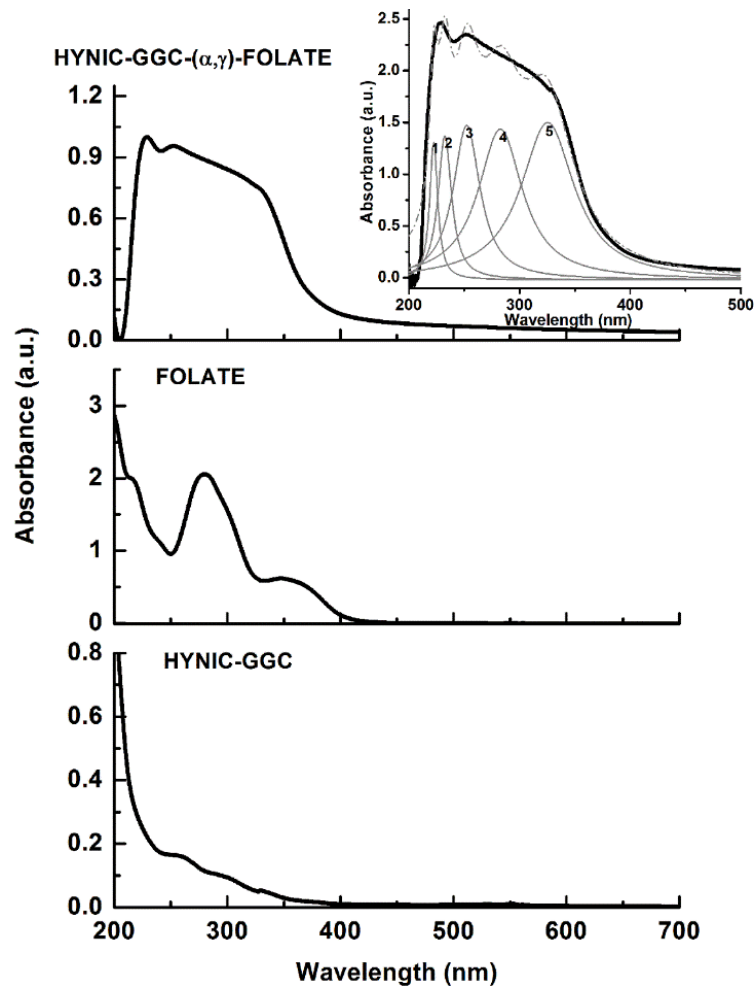


Figure 3. UV-vis spectra of the peptide (at the bottom), vitamin (in the middle), and the conjugate (at the top). Inset in the conjugate spectrum [(1, 223 nm), (2, 233 nm), (3, 253 nm), (4, 283 nm), (5, 325 nm)].

FT-IR spectroscopy. The IR spectra of folic acid (vitamin), HYNIC-GGC (peptide), and HYNIC-GGC-Folic acid (conjugate) are shown in Figure 4. The conjugate spectrum shows two bands at 3278 and 3064 cm^{-1} that are assigned to NH stretching vibrations of the amide groups from peptide, which in the peptide are observed at 3266 and 3073 cm^{-1} spectrum. The C=O stretching vibration of amide I at 1645 cm^{-1} , and H-N bending vibration of amide II at 1531 cm^{-1} , are 9-12 cm^{-1} blue-shifted in the conjugate. The strongest stretching band located

at 1688 cm^{-1} in the vitamin spectrum is absent in the conjugate. This corresponds to the stretching vibration of the carboxylic acid, which indicates that the conjugation to the peptide was through this functional group. In the folic acid spectrum, a medium broad band at 910 cm^{-1} due to the out-of plane deformation of the carboxylic acid also disappeared, confirming the conjugation process.

In the conjugate spectrum, the band at 1602 cm^{-1} corresponds to the imine groups of the pterin that is observed in the folic acid at 1603 cm^{-1} . Some medium C-H and C-N vibration bands, between $1290\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, observed in the vitamin and peptide appeared as weak bands in the conjugate and the C-N-C vibrations band is observed at 839 cm^{-1} . The structural change of folic acid by its conjugation to the peptide is revealed in the C-H band bending vibrations at 1480 cm^{-1} , which are not observed in the conjugate. A strong broad band centered at 1095 cm^{-1} in the conjugate is due to the -C(O)-S-stretching vibration of the thio- carbonyl group (thio-ester) that resulted from the reaction between the carboxylic groups of the vitamin and the HS-cystein of the peptide. The -C-SH stretching vibration at 718 cm^{-1} due to the -C-SH functional group is absent in the conjugate spectrum. The spectrum of the conjugate revealed the structural composition of a pure compound. As it is known, the presence of α/γ Folate-GGC-HYNIC regioisomers in the conjugate sample cannot be distinguished.

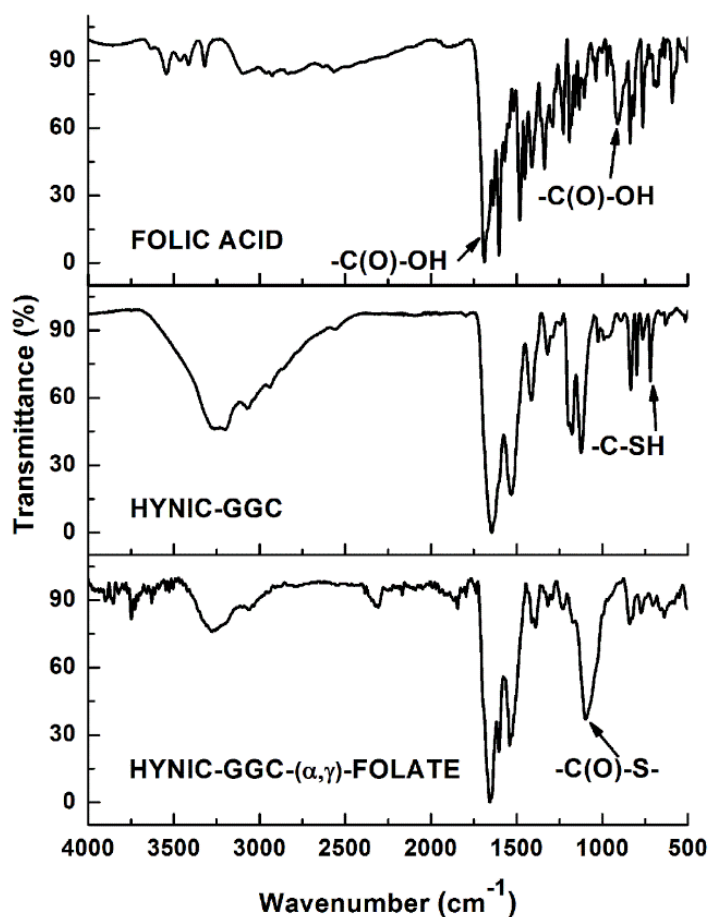


Figure 4. FT-IR spectra of the vitamin (at the top), peptide (in the middle), and the conjugate (at the bottom).

MALDI-MS. The mass spectrum showed molecular masses larger than that expected for the conjugate (calculated PM= 793.69 g/mol) in its deprotonated (792.69) or protonated form (794.69) due to the folic acid photosensitivity to UV light (at 337 nm wavelength) and the molecule ionization (matrix + sample) during the MALDI process. It seems that ionized fractions from the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix ($\bullet\text{CH}_2$ -fenol radical or the acid cyano radical) reacted with the pterin group of the folic acid in one of its tautomeric intermediate forms (the 2-imino-2,3-dihydropteridin-4(1H)-ona, probably), favoring the formation of the two main species observed in the spectrum with the lowest masses m/z of

902.83 and 880.81. The former results from the reaction between the bi-protonated HYNIC-GGC-Folic acid and the H₂C-fenol radical ($m/z = 795.81 + 107.13 = 902.94$), and the latter from the reaction between the bi-protonated HYNIC-GGC-Folic acid and the acid cyano radical anion ($-\bullet\text{N}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$), ($795.81 + 85.06 = 880.77$). It seems that the peptide somehow stabilizes the conjugated vitamin since the vitamin did not undergo fragmentation by photolysis, as has already been reported³². The mass spectrum reveals peaks up to $m/z=1047$. This suggested the formation of an adducto between a bi-protonated HYNIC-GGC-Folate and two α -cyano-4-hydroxycinnamic acid molecules which is fragmented very fast rendering the largest mass observed in the spectrum as a molecular fragment at 1047, and the others at 1015, 929, 960, 883 and 932.854 as well as the main ones already discussed. The complexity of the fragmentation process which conducted to the two main peaks with the lowest masses does not allow us to distinguish which one corresponds to the HYNIC-GGC-(γ)-Folate or HYNIC-GGC-(α)-Folate.

Molecular Modeling In **Figure 5**, the modeled HYNIC-GGC-(γ)-Folate and HYNIC-GGC-(α)-Folate regioisomers, by the Quantum-mechanical calculations MOPAC/PM5/COSMO, are given. The most stable molecules calculated under the influence of water revealed a formation heat of $-342.71 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the γ -Folate isomer, and $-332.11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the α -Folate isomer in different conformational arrangements. The difference of $-13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ between them favored a geometrical arrangement of the HYNIC-GGC-(γ)-Folate conjugate where its biological recognition site (folate-pterolate moiety) is free for binding to FRs and its free α -carboxyl-glutamate moiety is quite shielded from the medium, whereas the HYNIC-GGC-(α)-Folate conjugate has a geometrical arrangement where intramolecular interactions like hydrogen bonding (2.5-3.5 Å) and less-strong short interactions (4-6 Å),

occur between the -GGC-HYNIC and the -Folate moieties. As a result, the (HYNIC)-NH and HN-(pterin) are at 3.75 Å distance and aligned in the same direction. Thus, in the molecule, the pterate moiety is in a constrained arrangement and its free γ -carboxyl-glutamate moiety is exposed to the medium. In the HYNIC-GGC-(γ)-Folate molecule, the main geometrical parameters of the thio-carbonyl groups are bond distances 1.765 and 1.799 Å for -C(O)-S- and -S-C-, respectively; bond angle 105.49°, for -C(O)-S-CH₂- and a dihedral angle 173.40° for -CH₂-C(O)-S-CH₂-. For the α -Folate-GGC-HYNIC molecules, the bond distances are 1.746 and 1.798 Å for -C(O)-S- and -S-C-, respectively; bond angle 105.35°, for -C(O)-S-CH₂- and a dihedral angle 173.83° for -CH₂-C(O)-S-CH₂-. Computational calculations of the activation energies of α -Folate and γ -Folate derivatives formed with H₂N-CD (cyclodextrine), previously reported, rendered a lower activation energy for the γ -Folate derivative than that of the α -Folate derivative: 2729.26 and 2736.52 kJ mol⁻¹, respectively³³. In the present work, the same tendency was found for the heat of formation of the regioisomers, as can be seen above.

The binding ability for α - and γ -folate regioisomers to FRs is still a controversial point in the use of folate conjugates. Previous studies have suggested that FRs recognize folate derivatives by the γ -carboxylate, but not α -carboxylate⁴⁻⁷. In contrast, it was recently demonstrated that both α - and γ -folate derivatives are able to bind to FR-positive cells at virtually identical levels⁸⁻¹⁰. This controversy and our results suggest that it is not absolutely necessary to prepare pure γ -folate regioisomers for target tumors overexpressing FRs.

Recently, Chen et al.³, reported the crystal structure of human FR α bound to folic acid. The structure reveals that the folate pterate moiety is buried inside the FR and its glutamate moiety is exposed to the solvent and sticks out of the pocket entrance of the globular structure

of FR α ; therefore, glutamate is ready to be conjugated to another molecule without negatively affecting the FR α 's binding affinity. According to our molecular modeling, two aspects are relevant: 1) the HYNIC-GGC-(γ)-Folate isomer is more stable than the HYNIC-GGC-(α)-Folate isomer, which suggests that the regioisomeric mixtures from the HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate conjugate synthesis would contain more γ -Folate derivative than α -Folate derivative, 2) the binding of the HYNIC-GGC-(γ)-Folate conjugate to FR could be stronger than that of the HYNIC-GGC-(α)-Folate conjugate in water medium, but both regioisomers can be recognized by the FRs.

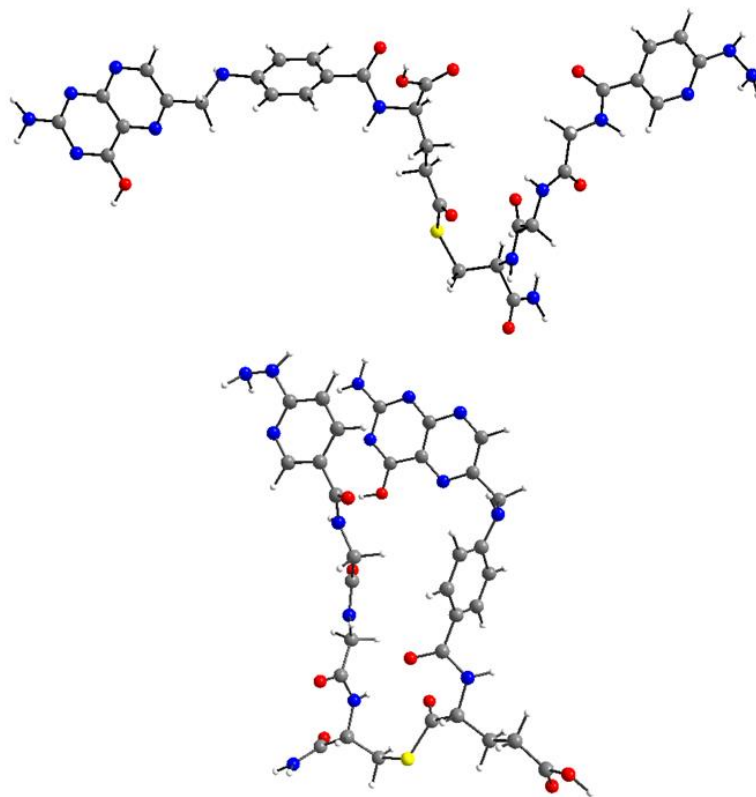


Figure 5. The most stable molecules of the HYNIC-GGC-(γ)-Folate isomer (top) and HYNIC-GGC-(α)-Folate isomer (bottom), modeled by Quantum-mechanical calculations using MOPAC/PM5/COSMO (solvent effect) procedures.

7.3.5.3 Radiochemical purity and in vitro studies

The radiochemical purity of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate was $96.48 \pm 2.15\%$, as obtained by ITLC and HPLC analyses without post-labeling purification ($n=12$). Stability studies of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate in human serum showed protein binding of $2.01 \pm 0.30\%$, $2.67 \pm 0.28\%$, and $7.57 \pm 0.64\%$ at 10 min, 2.0, and 24 h, respectively, without ^{99m}Tc transchelation to cysteine, indicating adequate radiopharmaceutical stability towards cysteine groups such as glutathione present in blood (**Figure 6**).

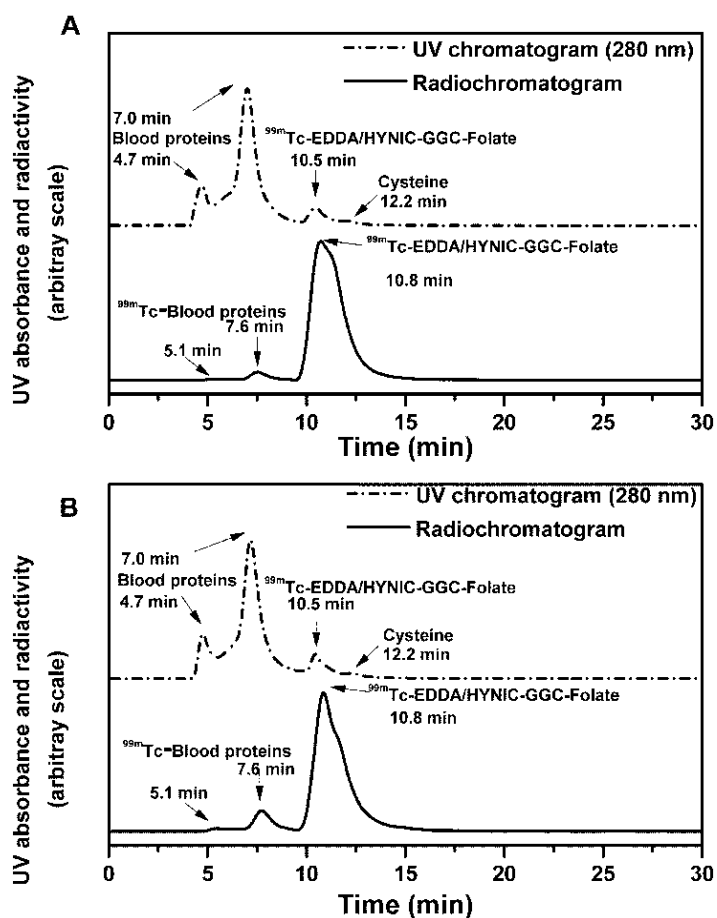


Figure 6. Size-exclusion HPLC (ProteinPak 300SW, 1 mL/min, PBS). The dotted line represents the UV-chromatogram (280 nm) of human serum proteins and the solid line represents the radiochromatogram of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate at 10 min (A) and 24 h (B) after incubation in human serum at 37 °C.

Affinity studies demonstrated high ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate recognition by the human FR protein as the IC_{50} value was 0.30 ± 0.06 nM, determined by the competitive assay. This affinity is near to that reported for the monomeric folic acid, which is very high ($K_d < 1$ nM)^{34,35}, indicating that the labeling procedure and HYNIC-GGC conjugation do not interfere with the folate biological recognition.

The *in vitro* results showed important uptake of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate in T47D (breast cancer cells, FR+) (**Table 1**). The most probable radiopharmaceutical incorporation is by the overexpressed FRs and, to a lesser degree, through the PCFT and RFC³⁶, due to the fact that binding between F and FR α is greater (100-200 times) than to RFC³⁷. This was confirmed with the reduction in the radiopharmaceutical cell uptake, which was about 26% ($\frac{\% \text{ Unblocked} - \% \text{ Blocked}}{\% \text{ Unblocked}} * 100$) after pre-incubation with cold folic acid, due to continual radiofolate uptake through the FRs, PCFT, and RFC transporters. Nevertheless, differences between unblocked and blocked cells were statistically significant ($p < 0.05$). These results were corroborated with the higher blocking effect observed when the free-folate RPMI-1640 medium was used.

Table 1. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate cellular uptake (% of total added activity \pm SD, n=6) in unblocked and blocked T47D cancer cells at 1h cultured in RPMI-1640 and folate-free RPMI-1640 media.

Medium with folate		Folate free medium	
Unblocked	Blocked ^a	Unblocked	Blocked ^a
13.86 \pm 1.15*	10.25 \pm 0.64*	15.13 \pm 0.79*	3.36 \pm 1.04*
^a Blocked cells were incubated with a folate-receptor blocking dose of folic acid to determine the non-specific radioactivity binding. *Significant statistical difference ($p < 0.05$) between blocked and unblocked.			

7.3.5.4 *In vivo* studies

Biodistribution studies of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate showed a very fast renal excretion. 78.2% and 93.8% of the administered activity was eliminated mainly by urine at 2 and 24 h, respectively. The average kidney uptake was 53, 14, and 1.6% ID/g at 0.25, 2, and 24 h, correspondingly. No renal reabsorption and negligible hepatobiliary excretion was observed (**Figure 7**). Tumor uptake was 2.4 % ID/g at 2 h despite that the mice were not maintained on a folate-free diet as occurred in most of the reported radiofolate studies^{6, 11-22}. This means that in a folate-free diet, the radiopharmaceutical tumor uptake would have been as high as 11.8 % (4.9 times higher), in agreement with results reported by Leamon et al.³⁷, where the impact of high and low folate diets on the uptake of folate-drugs in FRs-positive tissues was studied in detail in mice. The *in vivo* blocking studies using cold folic acid showed a statistically significant decrease in tumor uptake ($p < 0.05$).

The biodistribution studies at different times indicated that 98.65 % of the radiopharmaceutical was cleared from blood with a half-life of 44 min. In the case of tumor, the biological half-life was 17 h. The biodistribution profile (**Figure. 7**) correlate with the *in vivo* images obtained at 0.25, 2, and 24 h (**Figure. 8**), where the tumor and kidneys are visible. At 0.25 h, the radiopharmaceutical accumulation in the thoracic region is related with the activity in heart, lungs and liver. The high concentration in bladder, at 0.5 and 2 h, confirm the urinary excretion.

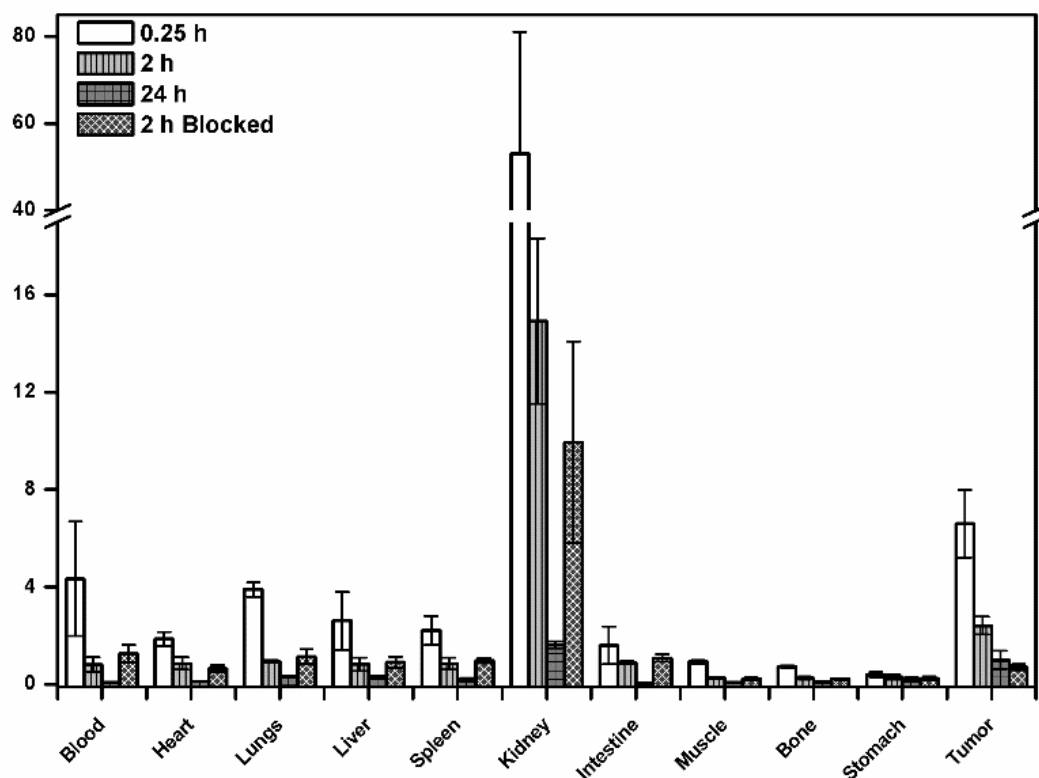


Figure 7. Biodistribution data of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate in mice with T47D induced tumors at 0.25, 2 and 24 h p.i. Results are shown as %ID/g (mean \pm SD).

Despite that kidney uptake was not negligible, due to the natural expression of folate transporters in proximal tubule cells³⁸, it is significantly lower than that reported for other ^{99m}Tc -Folate derivatives. For example, ^{99m}Tc -EC-Folate¹³ showed 138 % ID/g in kidney at 4 h, while for ^{99m}Tc -TPPTS/HYNIC-Folate⁶, the kidney retention was 61.38 and 30.3 % ID/g at 4 and 24 h, respectively. Similar results were reported by Guo et al.¹⁶ and Xie et al.¹⁸. The relatively low kidney uptake of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate with respect to other radiofolate derivatives mentioned above, can be explained by the presence of Gly-Gly-Cys sequence in the radiopharmaceutical molecule, which has been reported to improve the renal clearance of small molecules²⁵.

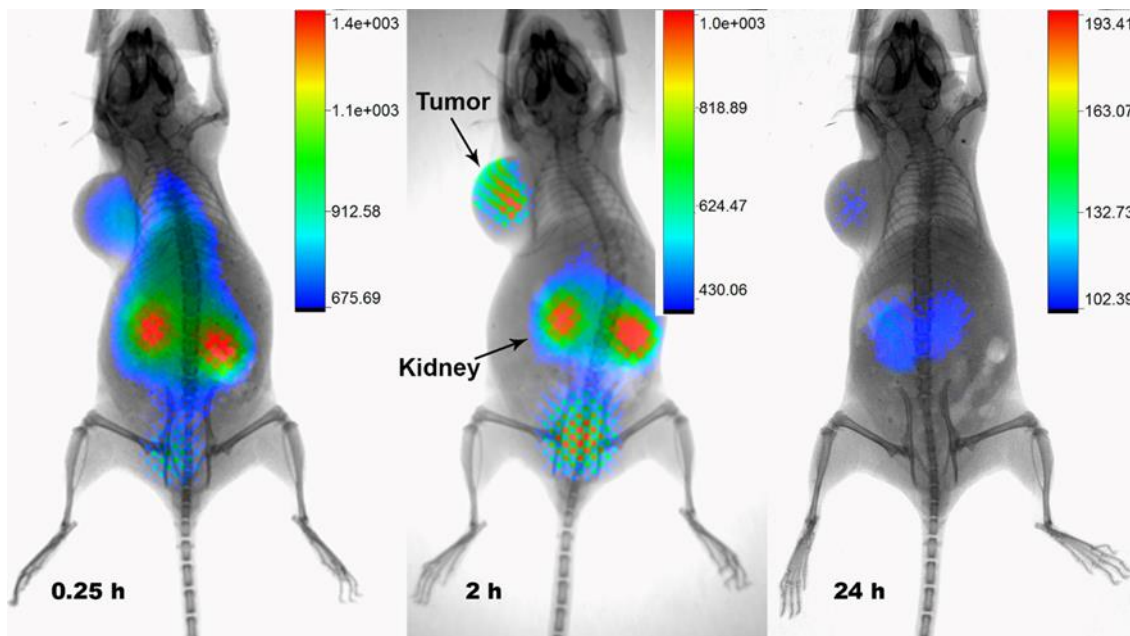


Figure 8. Molecular images (radioisotopic/X-ray imaging system, *In vivo* Xtreme, Bruker) in athymic mice with T47D-induced tumors at 0.25, 2, and 24 h after intravenous administration of ^{99m}Tc -EDDA /HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate (7.4 MBq in 100 μL). The acquisition time was 5 min for each static image.

Müller et al.²⁰ reported several ^{99m}Tc -(CO)₃-Folate derivatives with relative low kidney uptake (18.4 and 6.9 % ID/g at 4 and 24 h, respectively), but with significant hepatobiliary excretion (2.37 % ID/g in liver and 38.5 % in intestine content at 4 h). ^{99m}Tc -MAG₃-Folate showed the lowest kidney uptake (1.7 % ID/g at 2.5 h), but also hepatobiliary clearance (4.89 % ID/g in liver and 14.4 % in intestine content at 2.5 h)¹⁹.

Recently, heterobivalent radiopharmaceuticals have been developed as a strategy for specific, sensitive and non-invasive tumor imaging because they have higher tumor uptake than their respectively monomeric radiopharmaceuticals or the mixture of them³⁹⁻⁴¹. So far none heterobivalent radiopharmaceutical with folate moiety has been reported. The well characterized ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate radiopharmaceutical with fast renal

elimination and negligible hepatobiliary excretion, could be useful as a control in the development of new heterobivalent radiotracers based on biomolecule-Folate systems.

7.3.6. Conclusions

^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate was prepared with high radiochemical purity. The *in vitro* and *in vivo* studies showed high radiopharmaceutical stability in human serum, high affinity for the FRs, adequate tumor uptake with rapid blood clearance, low kidney retention, and negligible hepatobiliary excretion. These results support the proposal that ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-GGC-(α,γ)-Folate can be conveniently used as an imaging agent to target FRs.

Acknowledgments

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443) and the Secretary of Research and Advanced Studies of the Universidad Autónoma de Estado de México (UAEMex 3625/2013SF).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7.3.7 References

1. Stover PJ. One-carbon metabolism–genome interactions in folate-associated pathologies. *J Nutr.* 2009;139(12):2402-2405.
2. Desmoulin SK, Wang L, Hales E, Polin L, White K, Kushner J, et al. Therapeutic targeting of a novel 6-substituted pyrrolo [2, 3-d] pyrimidine thienoyl antifolate to human solid tumors based on selective uptake by the proton-coupled folate transporter. *Mol Pharmacol.* 2011;80(6):1096-1107.
3. Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature.* 2013;500(7463):486-489.
4. Wang S, Lee RJ, Mathias CJ, Green MA, Low PS. Synthesis, purification, and tumor cell uptake of ^{67}Ga -deferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging. *Bioconjugate Chem.* 1996;7(1):56-62.
5. Wang S, Luo J, Lantrip DA, Waters DJ, Mathias CJ, Green MA, et al. Design and synthesis of [^{111}In] DTPA-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* 1997;8(5):673-679.
6. Guo W, Hinkle GH, Lee RJ. ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-HYNIC-folate: A novel receptor-based targeted radiopharmaceutical for tumor imaging. *J Nucl Med.* 1999;40(9):1563-1569.
7. Vortherms AR, Doyle RP, Gao D, Debrah O, Sinko PJ. Synthesis, characterization, and in vitro assay of folic acid conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): toward targeted AZT based anticancer therapeutics. *Nucleos Nucleot Nucl.* 2008;27(2):173-185.
8. Bettio A, Honer M, Müller C, Brühlmeier M, Müller U, Schibli R, et al. Synthesis and Preclinical Evaluation of a Folic Acid Derivative Labeled with ^{18}F for PET Imaging of Folate Receptor–Positive Tumors. *J Nucl Med.* 2006;47(7):1153-1160.
9. Zong H, Thomas TP, Lee K-H, Desai AM, Li M-h, Kotlyar A, et al. Bifunctional PAMAM dendrimer conjugates of folic acid and methotrexate with defined ratio. *Biomacromolecules.* 2012;13(4):982-991.
10. Dong Q, Xie Z-X, Xie C, Lu W-Y, Zhang Q, Li X, et al. Isomeric folate-conjugated polymeric micelles bind to folate receptors and display anticancer effects. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7363-7369.
11. Guo Z, Zhang P, Song M, Wu X, Liu C, Zhao Z, et al. Synthesis and preliminary evaluation of novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled folate derivative via click reaction for SPECT imaging. *Appl Radiat Isot.* 2014;91:24-30.
12. Igan S, Yang DJ, Higuchi T, Zareneyrizi F, Bayhan H, Yu D, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ethylenedicysteine-folate: a new tumor imaging agent. Synthesis, labeling and evaluation in animals. *Cancer Biother Radiopharm.* 1998;13(6):427-435.
13. Leamon CP, Parker MA, Vlahov IR, Xu L-C, Reddy JA, Vetzal M, et al. Synthesis and biological evaluation of EC20: a new folate-derived, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based radiopharmaceutical. *Bioconjug Chem.* 2002;13(6):1200-1210.
14. Mathias CJ, Hubers D, Low PS, Green MA. Synthesis of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] DTPA-folate and its evaluation as a folate-receptor-targeted radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* 2000;11(2):253-257.
15. Liu M, Xu W, Xu L-j, Zhong G-r, Chen S-l, Lu W-y. Synthesis and biological evaluation of diethylenetriamine pentaacetic acid-polyethylene glycol-folate: A new folate-derived, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* 2005;16(5):1126-1132.

16. Guo H, Xie F, Zhu M, Li Y, Yang Z, Wang X, et al. The synthesis of pteroyl-lys conjugates and its application as Technetium-99m labeled radiotracer for folate receptor-positive tumor targeting. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(7):2025-2029.
17. Lu J, Pang Y, Xie F, Guo H, Li Y, Yang Z, et al. Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of ^{99m}Tc-labeled folate conjugates for folate receptor imaging. *Nucl Med Biol*. 2011;38(4):557-565.
18. Xie F, Zhang C, Yu Q, Pang Y, Chen Y, Yang W, et al. Novel ^{99m}Tc radiolabeled folate complexes with PEG linkers for FR-positive tumor imaging: synthesis and biological evaluation. *RSC Advances*. 2014;4(61):32197-32206.
19. Okarvi SM, Jammaz IA. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled folate and methotrexate conjugates as tumor imaging agents. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006;21(1):49-60.
20. Müller C, Hohn A, Schubiger PA, Schibli R. Preclinical evaluation of novel organometallic ^{99m}Tc-folate and ^{99m}Tc-pterolate radiotracers for folate receptor-positive tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33(9):1007-1016.
21. Panwar P, Shrivastava V, Tandon V, Mishra P, Chuttani K, Sharma RK, et al. ^{99m}Tc-tetraethylenepentamine-folate a new 99mTc based folate derivative for the detection of folate receptor positive tumors: Synthesis and biological evaluation. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(10):995-1001.
22. Onursal M, Lambrecht FY, Ozgur A. Synthesis and biological evaluation of receptor-based tumor imaging agent: ^{99m}Tc-folate-glucaric acid. *Int J Pharm*. 2011;416(1):288-292.
23. Vaitilingam B, Chelvam V, Kularatne SA, Poh S, Ayala-Lopez W, Low PS. A Folate Receptor- α -Specific Ligand That Targets Cancer Tissue and Not Sites of Inflammation. *J Nucl Med*. 2012;53(7):1127-1134.
24. Fritzbeg AR, Kasina S, Eshima D, Johnson DL. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG₃ as a hippuran replacement. *J Nucl Med*. 1986;27(1):111-116.
25. Jang B-S, Lee J-S, Rho JK, Park SH. Biodistribution of ^{99m}Tc-Tricarbonyl-Glycine Oligomers. *Toxicological research*. 2012;28(4):235-240.
26. Ortiz-Arzate Z, Santos-Cuevas CL, Ocampo-García BE, Ferro-Flores G, García-Becerra R, Estrada G, et al. Kit preparation and biokinetics in women of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ for breast cancer imaging. *Nucl Med Commun*. 2014;35(4):423-432.
27. Janssen M, Oyen WJ, Massuger LF, Frielink C, Dijkgraaf I, Edwards DS, et al. Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm*. 2002;17(6):641-646.
28. Ocampo-García BE, Ramírez FdM, Ferro-Flores G, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, Morales-Avila E, et al. ^{99m}Tc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl Med Biol*. 2011;38(1):1-11.
29. Thomas AH, Suárez G, Cabrerizo FM, Martino R, Capparelli AL. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2000;135(2):147-154.
30. Thomas AH, Lorente C, Capparelli AL, Pokhrel MR, Braun AM, Oliveros E. Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(6):421-426.
31. Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, et al. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2005;80(1):47-55.

32. Yin J-J, Sharma S, Shumyak SP, Wang Z-X, Zhou Z-W, Zhang Y, et al. Synthesis and biological evaluation of novel folic acid receptor-targeted, β -cyclodextrin-based drug complexes for cancer treatment. *PLoS One*. 2013; e62289.
33. Kamen BA, Caston JD. Properties of a folate binding protein (FBP) isolated from porcine kidney. *Biochem Pharmacol*. 1986;35(14):2323-2329.
34. Elwood PC, Kane M, Portillo R, Kolhouse J. The isolation, characterization, and comparison of the membrane-associated and soluble folate-binding proteins from human KB cells. *J Biol Chem*. 1986;261(33):15416-15423.
35. Hou Z, Matherly LH. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr*. 2013;73:175-204.
36. Kelemen LE. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer*. 2006;119(2):243-250.
37. Leamon CP, Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Emsweller K, Parker N, et al. Impact of high and low folate diets on tissue folate receptor levels and antitumor responses toward folate-drug conjugates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(3):918-925.
38. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e4.
39. Fischer G, Schirmacher R, Wängler B, Wängler C. Radiolabeled heterobivalent peptidic ligands: an approach with high future potential for in vivo imaging and therapy of malignant diseases. *Chem Med Chem* 2013;8(6):883-890.
40. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K. Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate*. 2014;74(6):659-668.
41. Liu Z, Huang J, Dong C, Cui L, Jin X, Jia B, et al. ^{99m}Tc -labeled RGD-BBN peptide for small-animal SPECT/CT of lung carcinoma. *Mol Pharm*. 2012;9(5):1409-1417.

8 Discusión general

La caracterización química de $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ por HPLC de exclusión molecular, espectroscopia UV-Vis e IR, espectrometría de masas MALDI-TOF, comprobó la conjugación del péptido Bombesina con el ácido fólico.

HPLC de exclusión molecular. Para ambos conjugados heterobivalentes, los cromatogramas de HPLC de exclusión molecular mostraron picos asimétricos con diferentes tiempos de retención (t_R), lo que sugirió que, los conjugados heterobivalentes se obtuvieron como una mezcla de regioisómeros. Este resultado se corroboró al ajustar una función Lorentziana a los cromatogramas, cuyos t_R mostraron una diferencia de 0.26 min entre los picos, siendo éste valor, lo suficientemente largo para considerar la presencia de regioisómeros $\text{Lys}^1(\alpha\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$, $\text{Lys}^1(\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ en los conjugados heterobivalentes [104]. De acuerdo a la literatura, los tiempos de retención cortos pueden corresponder al $\gamma\text{-Folato-Bombesina}$ y los tiempos de retención largos $\alpha\text{-Folato-Bombesina}$ [50,104-106].

Espectroscopia de UV-vis. En el espectro del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ no se observó la banda centrada a 205 nm (transición $n \rightarrow \sigma^*$) asociada a la amina primaria de la Lys^1 de la Bombesina ni tampoco se observó la banda centrada a 217 nm del grupo carboxilato del Folato. Pero sí se presentó una banda centrada a 225 nm que corresponde al nuevo enlace amida formado entre el $\text{NH}_2\text{-Lys}^1$ y el folato activado.

En el espectro del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ se observan las bandas que corresponden al folato (217, 280, 348 y 371 nm), mientras que las bandas a

204 nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) y 230 nm (transición $n \rightarrow \pi^*$) asociadas al enlace peptídico del compuesto $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ desaparecen en espectro del conjugado.

Espectroscopia IR-FT. Las bandas características del espectro de los conjugados heterobivalentes revelan un cambio significativo en la simetría molecular del ácido fólico y del péptido $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ o $\text{Lys}^1\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ después de la conjugación. En el espectro de IR del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$, se observa una banda semi-débil en la región de las amidas ($1630\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$), la cual sugiere la formación del enlace amida entre la Bombesina y el folato, dicha característica restringe las vibraciones de las amidas primarias y secundarias. En el conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$, los sustituyentes alquilo sobre el C-NH de la cadena lateral de la lisina y los sustituyentes alquilo del ácido carboxílico sobre el lado carbonilo de la amida definen una banda particular de la nueva amida, en consecuencia la banda centrada a 1075 cm^{-1} con un hombro a 1095 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-N- de la amida III (Folato-C(O)-NH-Bombesina) aparece en el espectro del conjugado.

En el espectro IR del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ la banda centrada a 1064 cm^{-1} se asocia a la formación del nuevo enlace amida, su posición sugiere que corresponde a un amida III en la cadena del péptido [107]. La presencia de una sola banda indica la formación de un enlace amida sugiere que la mezcla de regioisómeros α y γ del conjugado $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$ tiene mayor cantidad de uno regioisómero que de otro.

Espectrometría de masas MALDI-TOF. Los valores $m/z= 2168$ y $m/z= 2419$ indicaron que los conjugados fueron químicamente puros y corresponden a $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-Folato})\text{Lys}^3(\text{DOTA})\text{-Bombesina (1-14)}$, respectivamente.

Radiomarcado de Folato-Bombesina con ^{99m}Tc . El radiofármaco ^{99m}Tc -Folato-Bombesina se obtuvo con una pureza radioquímica de $96.05 \pm 2.12\%$ ($n=12$), determinada por HPLC en fase reversa. El radiocromatograma que se obtuvo por HPLC en fase reversa mostró un pico centrado con $t_R= 14.28$ min y un hombro a 14.34 min. Para definir con mayor precisión el tiempo de retención del hombro, el radiocromatograma se ajustó a una función Lorentziana usando el modelo multipicos. El ajuste del radiocromatograma dio como resultado tiempos de retención definidos a $t_R = 14.20$ y 14.41 min con una $R^2 = 0.9946$. La diferencia de 0.21 min entre los tiempos de retención, indicó que los regioisómeros ^{99m}Tc - γ -Folato-Bombesina y ^{99m}Tc - α -Folato-Bombesina tienen la misma hidrofobicidad, aparentemente debido a presencia de la Bombesina.

^{177}Lu -Folato-Bombesina se obtuvo con una pureza radioquímica de $96.05 \pm 2.12\%$ ($n=12$), determinada por HPLC en fase reversa sin purificación después del marcado. El radiocromatograma que se obtuvo por HPLC en fase reversa se caracteriza por presentar un pico centrado con $t_R= 14.20$ min con un semi-pico a 14.27 min y un hombro a 14.38 min, a la derecha del pico se observan dos inflexiones con $t_R= 14.72$ y 14.97 min. Un cálculo aproximado sugiere que el 5% de la actividad total de 13.3 a 16.5 min provienen de los picos no resueltos y que correspondería a una pequeña cantidad de la molécula donde el macrociclo DOTA adopta otro de sus conformeros, ya que el DOTA presenta tres conformeros estables[108]. Para definir con mayor precisión el tiempo de retención de los picos, el radiocromatograma se ajustó a una función Lorentziana usando el modelo multipicos. El

ajuste del radiocromatograma dio como resultado tiempos de retención definidos a $t_R = 14.13$, 14.29 y 14.42 min con una $R^2 = 0.9952$. La diferencia de 0.29 y 0.13 min entre los tres tiempos de retención con respecto al último, indicó que los regioisómeros $^{177}\text{Lu}-\gamma$ -Folato-Bombesina (confórmero 1 y 2) y $^{177}\text{Lu}-\alpha$ -Folato-Bombesina tienen la misma hidrofobicidad, aparentemente debido al macrociclo DOTA unido a la Bombesina. El radiocromatograma indica que la relación de regioisómeros es $2.95\gamma:1\alpha$ para ^{177}Lu -Folato-Bombesina.

Estabilidad en suero humano. La estabilidad del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina y ^{177}Lu -Folato-Bombesina en suero humano se determinó mediante la obtención de la pureza radioquímica, observando que 2 h después de la incubación con suero humano la pureza radioquímica fue de 98.8% con unión a proteínas cerca del 1% sin transquelación a la cisteína, indicando una adecuada estabilidad de los conjugados heterobivalentes en sangre. Estos resultados se relacionan con los valores reportados para otros derivados radiomarcados de Bombesina [109].

Ensayo de afinidad a la proteína del receptor GRP y de folato. El ensayo de afinidad a la proteína recombinante del GRPR y a la proteína humana del FR demostró que $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina y ^{177}Lu -Folato-Bombesina tienen alto reconocimiento a los receptores GRP y de folato, con valores de IC_{50} menores a 10 nM. Estos valores se encuentran dentro de la escala nanomolar de los valores de IC_{50} reportados para otros análogos de bombesina y derivados de folato [110,111]

Estudios de captación in vitro. Los estudios de captación en las células de T47D mostraron una importante captación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Folato-Bombesina y ^{177}Lu -Folato-Bombesina, la cual se inhibió significativamente con la pre-incubación con el péptido Lys^3 -Bombesina o ácido fólico ($p < 0.05$), indicando que los conjugados heterobivalentes tiene reconocimiento

específico para GRPR y FR. Sin embargo, al comparar los resultados anteriores con la captación de los monómeros en las células T47D, se observó que la captación de ^{99m}Tc -Bombesina y/o ^{177}Lu -Bombesina fue ~2.5 veces mayor que la captación ^{99m}Tc -Folato y/o ^{177}Lu -Folato, la cual se correlaciona con la alta expresión de GRPR en las células T47D en comparación con la expresión del RF. Estos resultados sugieren que el reconocimiento de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina en las células T47D está dominado por la unión específica de la Bombesina a través del receptor GRP. Este comportamiento se corroboró con los experimentos de bloqueo, en los que la incubación con Lys^3 -Bombesina mostró un mayor efecto de bloqueo en la captación del radiofármaco heterobivalente (~70% menos captación) comparada con la del ácido fólico (~20% menos captación). Sin embargo, la captación celular en T47D fue significativamente mayor para los conjugados heterobivalentes ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y/o ^{177}Lu -Folato-Bombesina comparada con la captación de sus respectivos monómeros ^{99m}Tc -Folato y ^{99m}Tc -Bombesina o ^{177}Lu -Folato y ^{177}Lu -Bombesina.

Biodistribución. Los estudios de Biodistribución de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y ^{177}Lu -Folato-Bombesina en ratones atómicos con tumores T47D mostraron adecuada captación en el tumor con rápida eliminación en sangre y excreción hepatobiliar despreciable. La biodistribución mostró una rápida excreción renal, con eliminación a través de la orina del ~69 % de la actividad administrada a las 2 h. Se mostró alta captación en el páncreas debido a la alta expresión GRPR en este órgano. La eliminación de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y/o ^{177}Lu -Folato-Bombesina en sangre dio una relación tumor/sangre alta lo que se relaciona con la baja unión a proteínas en suero humano (< 2%) e indican alta retención en el tumor. Los estudios de bloqueo con la pre-inyección de Lys^3 -Bombesina o ácido fólico a 2 h mostraron una disminución en la captación del tumor de T47D con respecto a los ratones no bloqueados

($P < 0.05$). Estos datos correlacionan con los resultados *in vitro*, dado que la pre-incubación con Lys³-Bombesina generó mayor efecto de bloqueo sobre la captación del radiofármaco heterobivalente en el tumor (~70% menos captación) comparada con el bloqueo generado por el ácido fólico (~20% menos captación). En el caso de los riñones, quienes se caracterizan por expresar altos nivel de FR, se esperaba una disminución significativa en la captación de ^{99m}Tc-Folato-Bombesina, sin embargo, dicho efecto no se observó debido a la alta retención de la Bombesina en los riñones[109,112-114].

Las moléculas heterobivalentes, tales como c(RGDyK)-Bombesina (7-14) y Antígeno prostático específico de membrana-Bombesina, han mostrado ser una estrategia adecuada para obtener imágenes del tumor de manera sensible, específica y no invasiva debido a que incrementan significativamente la captación del tumor y las señales de imagen comparadas con los agentes monoméricos [96,97,115]. Resultados similares se obtuvieron en este estudio, donde ^{99m}Tc-Folato-Bombesina y/o ¹⁷⁷Lu-Folato-Bombesina mostró un incremento en la captación del tumor comparado con sus respectivos monómeros dando como resultado un mejor contraste en la imagen del tumor de T47D. Las imágenes de micro-SPECT/CT de los conjugados heterobivalentes ^{99m}Tc-Folato-Bombesina y/o ¹⁷⁷Lu-Folato-Bombesina mostraron claramente los tumores con alto contraste a las 2 horas después de la administración del radiofármaco.

Dado que el folato es esencial para la síntesis de ADN, los SUVs que se obtienen a partir de las imágenes SPECT o PET pueden directamente correlacionarse con la actividad metabólica, ya que el SUV es una relación normalizada de la captación del tumor por unidad de masa. El incremento del SUV para el [¹⁸F]-FDG en masas tumorales que no tienen necrosis y/o fibrosis indica que el tumor incrementa su actividad metabólica. El mismo

comportamiento se observó con los SUVs del conjugado heterobivalente ^{99m}Tc -Folato-Bombesina, evaluados en el mismo día y en el mismo ratón que se utilizó para las imágenes con ^{18}F -FDG y con ^{99m}Tc -Folato. Las diferencias en los SUVs entre los radiofármacos pueden atribuirse a la contribución por parte de la unión de la Bombesina al receptor GRP, la cual es constante (diferencias entre el SUV de ^{99m}Tc -Folato-Bombesina y ^{99m}Tc -Folato) en el rango de las masas tumorales evaluadas en este estudio (de 0.15 a 0.85 g).

El radiofármaco heterobivalente ^{177}Lu -Folato-Bombesina mejoró la dosis absorbida de radiación (23.9 ± 2.1 Gy con la administración de 74 MBq) con respecto a la dosis absorbida dada por ^{177}Lu -Bombesina (12.8 ± 0.59 Gy/74 MBq) y ^{177}Lu -Folato (7.84 ± 0.37 Gy/74 MBq). Sin embargo, en todos los casos, la dosis absorbida de radiación en los riñones fue mayor que en el tumor. Se sabe que los péptidos (Bombesina) y el ácido fólico se retienen altamente en los riñones debido a la reabsorción tubular mediada por los receptores de megalina y cubulina y por el receptor de folato [116,117]. Se ha demostrado que para reducir significativamente la captación en los riñones de radiofármacos terapéuticos basados en péptidos se administre L-lisina y/o L-arginina previo a la administración del radiofármaco. De igual manera, se ha demostrado que la co-inyección de antifolatos reduce la retención en los riñones de derivados de folato marcados con Lu-177 mientras que la acumulación en el tumor no se ve afectada [80]. Bajo estas condiciones, ^{177}Lu -Folato-Bombesina demuestra propiedades adecuadas como radiofármaco terapéutico en el tratamiento de tumores de mama +GRPR y +FR.

9 Conclusiones Generales

Los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$, se prepararon con alta pureza química y radioquímica. Los estudios *in vitro e in vivo* mostraron alta estabilidad en suero humano, adecuada captación en el tumor con rápida eliminación en sangre y baja retención en riñones.

Estos resultados respaldan el propósito de que $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ pueda ser utilizado como agente de imagen para SPECT con potencial para evaluar actividad metabólica de tumores que sobre-expresan receptores GRP y de Folato.

$\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$ mostró propiedades adecuadas para ser utilizado como agente teranóstico para tumores de mama que sobre-expresan receptores GRP y de folato.

10 Trabajo a futuro

La síntesis y evaluación preclínica de los conjugados heterobivalentes $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC})\text{-Bombesina (1-14)}$ y $\text{Lys}^1(\alpha,\gamma\text{-folato})\text{Lys}^3(^{177}\text{Lu-DOA})\text{-Bombesina (1-14)}$ justifican el inicio de la Fase clínica I basados en el principio de microdosis, para obtener la cinética de captación y el modelo biocinético de regiones de interés en voluntarias sanas con el objetivo de determinar la dosis máxima en estudios de medicina nuclear.

Adicionalmente, estos radiofármacos heterobivalentes pueden acoplarse a nanopartículas de oro con la ventaja de obtener de forma simultánea radioterapia y termoterapia, ya que recientemente se ha demostrado que los sistemas de nanopartículas de oro marcadas con ^{177}Lu y conjugadas a diferentes péptidos de reconocimiento específico tienen potencial para ser utilizados en la obtención de imágenes de blancos moleculares, en terapia fototérmica plasmónica y en radioterapia dirigida en células de glioblastomas y cáncer de mama empleando una sola preparación radiofarmacéutica [118,119]

De igual manera, estos radiofármacos heterobivalentes pueden acoplarse a sistemas de liberación controlada como lipoproteínas de alta densidad (rHDL)[120] para producir nanoplataformas con reconocimiento específico y liberación de agentes terapéuticos como RNA de interferencia pequeño (siRNA) o micro-RNA que medien el silenciamiento de genes involucrados en la radiosensibilidad de la célula de cáncer, con el objetivo de mejorar el efecto terapéutico producido por la emisión de partículas cargadas (β^- y e^- Auger).

11 Referencias Bibliográficas

1. Ocampo-García, B.E. Desarrollo de un radiofármaco específico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con HYNIC-peptido/manosa para detección de ganglio centinela en cáncer de mama. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, 2012.
2. Lindner, J.R.; Sinusas, A. Molecular imaging in cardiovascular disease: Which methods, which diseases? *J Nucl Cardiol* **2013**, *20*, 990-1001.
3. Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Meléndez-Alafort, L. Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. *Current Pharmaceutical Analysis* **2006**, *2*, 339-352.
4. Jürgens, S.; Herrmann, W.A.; Kühn, F.E. Rhenium and Technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances. *Journal of Organometallic Chemistry* **2014**, *751*, 83-89.
5. Pimlott, S.L.; Sutherland, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 149-162.
6. Saha, G. Fundamentals of nuclear pharmacy.: 2010. Springer, NY.
7. Stott Reynolds, T.; P Bandari, R.; Jiang, Z.; J Smith, C. Lutetium-177 labeled bombesin peptides for radionuclide therapy. *Current radiopharmaceuticals* **2016**, *9*, 33-43.
8. Srinivasarao, M.; Galliford, C.V.; Low, P.S. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 203-219.
9. Kassis, A.I. Therapeutic radionuclides: Biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med* **2008**, *38*, 358-366.
10. Pouget, J.-P.; Navarro-Teulon, I.; Bardies, M.; Chouin, N.; Cartron, G.; Pelegrin, A.; Azria, D. Clinical radioimmunotherapy: the role of radiobiology. *Nat Rev Clin Oncol* **2011**, *8*, 720-734.
11. Gudkov, S.V.; Shilyagina, N.Y.; Vodeneev, V.A.; Zvyagin, A.V. Targeted radionuclide therapy of human tumors. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*.

12. Pouget, J.P.; Mather, S.J. General aspects of the cellular response to low- and high-let radiation. *Eur J Nucl Med* **2001**, *28*, 541-561.
13. Ferro-Flores, G.; Ocampo-Garcia, B.E.; Santos-Cuevas, C.L.; de Maria Ramirez, F.; Azorin-Vega, E.P.; Melendez-Alafort, L. Theranostic radiopharmaceuticals based on gold nanoparticles labeled with ^{177}Lu and conjugated to peptides. *Curr Radiopharm* **2015**, *8*, 150-159.
14. Dash, A.; Pillai, M.R.; Knapp, F.F., Jr. Production of ^{177}Lu for targeted radionuclide therapy: Available options. *Nucl Med Mol Imaging* **2015**, *49*, 85-107.
15. Luna-Gutiérrez, M.A. Sistema monomérico, dimérico y multimérico de péptidos de rgd radiomarcados con ^{177}Lu para terapia de tumores que expresan integrinas α,β . Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, 2014.
16. Mendoza-Nava, H.; Ferro-Flores, G.; Ramírez, F.d.M.; Ocampo-García, B.; Santos-Cuevas, C.; Aranda-Lara, L.; Azorín-Vega, E.; Morales-Avila, E.; Isaac-Olivé, K. ^{177}Lu -dendrimer conjugated to folate and bombesin with gold nanoparticles in the dendritic cavity: A potential theranostic radiopharmaceutical. *Journal of Nanomaterials* **2016**, *2016*, 11.
17. Ma, X.; Wang, J.; Cheng, Z. Cerenkov radiation: A multi-functional approach for biological sciences. *Frontiers in Physics* **2014**, *2*.
18. Ramírez-Nava, G.J. Evaluación in vivo de la biodistribución volumétrica de biosensores para medición de la actividad metabólica por correlación de rayos x, fluorescencia, imagen cerenkov y radioisotópica. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, 2016.
19. Weineisen, M.; Schottelius, M.; Simecek, J.; Baum, R.P.; Yildiz, A.; Beykan, S.; Kulkarni, H.R.; Lassmann, M.; Klette, I.; Eiber, M., *et al.* ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-targeted theranostic concept and first proof-of-concept human studies. *J Nucl Med* **2015**, *56*, 1169-1176.
20. Pillai, M.R.; Nanabala, R.; Joy, A.; Sasikumar, A.; Russ Knapp, F.F. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting psma: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. *Nucl Med Biol* **2016**, *43*, 692-720.

21. Pouget, J.P.; Lozza, C.; Deshayes, E.; Boudousq, V.; Navarro-Teulon, I. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. *Front Med (Lausanne)* **2015**, *2*, 1-11.
22. Prithivirajsingh, S.; Story, M.D.; Bergh, S.A.; Geara, F.B.; Ang, K.K.; Ismail, S.M.; Stevens, C.W.; Buchholz, T.A.; Brock, W.A. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* **2004**, *571*, 227-232.
23. Chevalier, F.; Hamdi, D.H.; Saintigny, Y.; Lefaix, J.-L. Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2014**, *763*, 280-293.
24. Prise, K.M.; O'Sullivan, J.M. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 351-360.
25. Karin, M.; Greten, F.R. Nf- κ b: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 749-759.
26. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *cell* **2000**, *100*, 57-70.
27. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *cell* **2011**, *144*, 646-674.
28. Zhu, Y.; Choi, S.H.; Shah, K. Multifunctional receptor-targeting antibodies for cancer therapy. *Lancet Oncol* **2015**, *16*, e543-554.
29. Dorsam, R.T.; Gutkind, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews cancer* **2007**, *7*, 79-94.
30. Weber, H.C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **2009**, *16*, 66-71.
31. Sancho, V.; Di Florio, A.; Moody, T.W.; Jensen, R.T. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: Review and current status. *Curr. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 79-134.
32. Ischia, J.; Patel, O.; Shulkes, A.; Baldwin, G.S. Gastrin-releasing peptide: Different forms, different functions. *Biofactors* **2009**, *35*, 69-75.
33. Cornelio, D.; Roesler, R.; Schwartsmann, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Annals of Oncology* **2007**.

34. Glover, S.; Delaney, M.; Dematte, C.; Kornberg, L.; Frasco, M.; Tran-Son-Tay, R.; Benya, R.V. Phosphorylation of focal adhesion kinase tyrosine 397 critically mediates gastrin-releasing peptide's morphogenic properties. *Journal of cellular physiology* **2004**, *199*, 77-88.
35. Matkowskyj, K.A.; Keller, K.; Glover, S.; Kornberg, L.; Tran-Son-Tay, R.; Benya, R.V. Expression of grp and its receptor in well-differentiated colon cancer cells correlates with the presence of focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosines 397 and 407. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2003**, *51*, 1041-1048.
36. Ni, C.; Zhao, X.; Sun, T.; Liu, Y.; Gu, Q.; Sun, B. Role of gastrin-releasing peptides in breast cancer metastasis. *Human pathology* **2012**, *43*, 2342-2347.
37. Rozengurt, E. Mitogenic signaling pathways induced by g protein-coupled receptors. *Journal of cellular physiology* **2007**, *213*, 589-602.
38. O Laukkanen, M.; Domenica Castellone, M. Gastrin-releasing peptide receptor targeting in cancer treatment: Emerging signaling networks and therapeutic applications. *Current drug targets* **2016**, *17*, 508-514.
39. Hohla, F.; Schally, A.v. Targeting gastrin releasing peptide receptors: New options for the therapy and diagnosis of cancer. *Cell cycle* **2010**, *9*, 1738-1741.
40. Ferro-Flores, G.; de Murphy, C.A.; Rodriguez-Cortes, J.; Pedraza-Lopez, M.; Ramirez-Iglesias, M.T. Preparation and evaluation of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys³]-Bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumours. *Nuclear medicine communications* **2006**, *27*, 371-376.
41. Santos-Cuevas, C.L.; Ferro-Flores, G.; de Murphy, C.A.; Pichardo-Romero, P.A. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys³]-Bombesin: Biokinetics and dosimetry in women. *Nuclear medicine communications* **2008**, *29*, 741-747.
42. Lantry, L.E.; Cappelletti, E.; Maddalena, M.E.; Fox, J.S.; Feng, W.; Chen, J.; Thomas, R.; Eaton, S.M.; Bogdan, N.J.; Arunachalam, T., *et al.* ¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled grp-r agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, *47*, 1144-1152.
43. Däpp, S.; Müller, C.; Garayoa, E.G.; Bläuenstein, P.; Maes, V.; Brans, L.; Tourwé, D.A.; Schibli, R. Pegylation, increasing specific activity and multiple dosing as

- strategies to improve the risk-benefit profile of targeted radionuclide therapy with ^{177}Lu -dota-bombesin analogues. *EJNMMI research* **2012**, *2*, 1.
44. O'Shannessy, D.J.; Somers, E.B.; Maltzman, J.; Smale, R.; Fu, Y.-S. Folate receptor alpha (fra) expression in breast cancer: Identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. *SpringerPlus* **2012**, *1*, 1-9.
 45. Low, P.S.; Henne, W.A.; Doorneweerd, D.D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of chemical research* **2007**, *41*, 120-129.
 46. Wibowo, A.S.; Singh, M.; Reeder, K.M.; Carter, J.J.; Kovach, A.R.; Meng, W.; Ratnam, M.; Zhang, F.; Dann, C.E., 3rd. Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 15180-15188.
 47. Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X.E.; Yi, W.; Brunzelle, J.S.; Li, J.; Yong, E.-L.; Xu, H.E.; Melcher, K. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* **2013**, *500*, 486-489.
 48. Kelemen, L.E. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 243-250.
 49. Maurer, A.H.; Elsinga, P.; Fanti, S.; Nguyen, B.; Oyen, W.J.; Weber, W.A. Imaging the folate receptor on cancer cells with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -etarfolatide: Properties, clinical use, and future potential of folate receptor imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**, *55*, 701-704.
 50. Bettio, A.; Honer, M.; Muller, C.; Bruhlmeier, M.; Muller, U.; Schibli, R.; Groehn, V.; Schubiger, A.P.; Ametamey, S.M. Synthesis and preclinical evaluation of a folic acid derivative labeled with ^{18}F for PET imaging of folate receptor-positive tumors. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1153-1160.
 51. Garcia-Bennett, A.; Nees, M.; Fadeel, B. In search of the holy grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **2011**, *81*, 976-984.
 52. Zhao, R.; Matherly, L.H.; Goldman, I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* **2009**, *11*, e4.

53. Laanpere, M.; Altmäe, S.; Stavreus-Evers, A.; Nilsson, T.K.; Yngve, A.; Salumets, A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutrition reviews* **2010**, *68*, 99-113.
54. Siu, M.K.; Kong, D.S.; Chan, H.Y.; Wong, E.S.; Ip, P.P.; Jiang, L.; Ngan, H.Y.; Le, X.-F.; Cheung, A.N. Paradoxical impact of two folate receptors, *frα* and *rfc*, in ovarian cancer: Effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome. *PloS one* **2012**, *7*, e47201.
55. Wang, T.-P.; Hsu, S.-H.; Feng, H.-C.; Huang, R.-F.S. Folate deprivation enhances invasiveness of human colon cancer cells mediated by activation of sonic hedgehog signaling through promoter hypomethylation and cross action with transcription nuclear factor-kappa b pathway. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1158-1168.
56. Crider, K.S.; Yang, T.P.; Berry, R.J.; Bailey, L.B. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2012**, *3*, 21-38.
57. Müller, C. Folate-based radiotracers for pet imaging—update and perspectives. *Molecules* **2013**, *18*, 5005-5031.
58. Müller, C.; Schibli, R. Folic acid conjugates for nuclear imaging of folate receptor-positive cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2011**, *52*, 1-4.
59. Leamon, C.P.; Parker, M.A.; Vlahov, I.R.; Xu, L.-C.; Reddy, J.A.; Vetzal, M.; Douglas, N. Synthesis and biological evaluation of ec20: A new folate-derived, ^{99m}Tc-based radiopharmaceutical. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1200-1210.
60. Igan, S.; Yang, D.J.; Higuchi, T.; Zareneyrizi, F.; Bayhan, H.; Yu, D.; Kim, E.E.; Podoloff, D.A. ^{99m}Tc-ethylenedicysteine-folate: A new tumor imaging agent. Synthesis, labeling and evaluation in animals. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1998**, *13*, 427-435.
61. Liu, M.; Xu, W.; Xu, L.-j.; Zhong, G.-r.; Chen, S.-l.; Lu, W.-y. Synthesis and biological evaluation of diethylenetriamine pentaacetic acid-polyethylene glycol-folate: A new folate-derived, ^{99m}Tc-based radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1126-1132.

62. Mathias, C.J.; Hubers, D.; Low, P.S.; Green, M.A. Synthesis of [^{99m}Tc] DTPA-folate and its evaluation as a folate-receptor-targeted radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 253-257.
63. Guo, H.; Xie, F.; Zhu, M.; Li, Y.; Yang, Z.; Wang, X.; Lu, J. The synthesis of pteroyllys conjugates and its application as Technetium-99m labeled radiotracer for folate receptor-positive tumor targeting. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2025-2029.
64. Guo, W.; Hinkle, G.H.; Lee, R.J. (^{99m}Tc)-HYNIC-folate: A novel receptor-based targeted radiopharmaceutical for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1563.
65. Guo, Z.; Zhang, P.; Song, M.; Wu, X.; Liu, C.; Zhao, Z.; Lu, J.; Zhang, X. Synthesis and preliminary evaluation of novel ^{99m}Tc-labeled folate derivative via click reaction for spect imaging. *Appl. Radiat. Isot.* **2014**, *91*, 24-30.
66. Lu, J.; Pang, Y.; Xie, F.; Guo, H.; Li, Y.; Yang, Z.; Wang, X. Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of ^{99m}Tc-labeled folate conjugates for folate receptor imaging. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 557-565.
67. Xie, F.; Zhang, C.; Yu, Q.; Pang, Y.; Chen, Y.; Yang, W.; Xue, J.; Liu, Y.; Lu, J. Novel ^{99m}Tc radiolabeled folate complexes with peg linkers for FR-positive tumor imaging: Synthesis and biological evaluation. *RSC Advances* **2014**, *4*, 32197-32206.
68. Okarvi, S.M.; Jammaz, I.A. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of Technetium-99m-labeled folate and methotrexate conjugates as tumor imaging agents. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2006**, *21*, 49-60.
69. Müller, C.; Hohn, A.; Schubiger, P.A.; Schibli, R. Preclinical evaluation of novel organometallic ^{99m}Tc-folate and ^{99m}Tc-pterolate radiotracers for folate receptor-positive tumour targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1007-1016.
70. Onursal, M.; Lambrecht, F.Y.; Ozgur, A. Synthesis and biological evaluation of receptor-based tumor imaging agent: ^{99m}Tc-folate-glucaric acid. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416*, 288-292.
71. Panwar, P.; Shrivastava, V.; Tandon, V.; Mishra, P.; Chuttani, K.; Sharma, R.K.; Chandra, R.; Mishra, A.K. ^{99m}Tc-tetraethylenepentamine-folate a new ^{99m}Tc based folate derivative for the detection of folate receptor positive tumors: Synthesis and biological evaluation. *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 995-1001.

72. Vaitilingam, B.; Chelvam, V.; Kularatne, S.A.; Poh, S.; Ayala-Lopez, W.; Low, P.S. A folate receptor- α -specific ligand that targets cancer tissue and not sites of inflammation. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1127-1134.
73. Stover, P.J. One-carbon metabolism–genome interactions in folate-associated pathologies. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 2402-2405.
74. Fisher, R.E.; Siegel, B.A.; Edell, S.L.; Oyesiku, N.M.; Morgenstern, D.E.; Messmann, R.A.; Amato, R.J. Exploratory study of ^{99m}Tc -ec20 imaging for identifying patients with folate receptor–positive solid tumors. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49*, 899-906.
75. Haller, S.; Reber, J.; Brandt, S.; Bernhardt, P.; Groehn, V.; Schibli, R.; Muller, C. Folate receptor-targeted radionuclide therapy: Preclinical investigation of anti-tumor effects and potential radionephropathy. *Nucl Med Biol* **2015**, *42*, 770-779.
76. Rolleman, E.J.; Melis, M.; Valkema, R.; Boerman, O.C.; Krenning, E.P.; de Jong, M. Kidney protection during peptide receptor radionuclide therapy with somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2010**, *37*, 1018-1031.
77. Vegt, E.; de Jong, M.; Wetzels, J.F.; Masereeuw, R.; Melis, M.; Oyen, W.J.; Gotthardt, M.; Boerman, O.C. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: Mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med* **2010**, *51*, 1049-1058.
78. Hammond, P.J.; Wade, A.F.; Gwilliam, M.E.; Peters, A.M.; Myers, M.J.; Gilbey, S.G.; Bloom, S.R.; Calam, J. Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue. *Br J Cancer* **1993**, *67*, 1437-1439.
79. Muller, C.; Vlahov, I.R.; Santhapuram, H.K.; Leamon, C.P.; Schibli, R. Tumor targeting using ^{67}Ga -DOTA-BZ-Folate--investigations of methods to improve the tissue distribution of radiofolates. *Nucl Med Biol* **2011**, *38*, 715-723.
80. Reber, J.; Haller, S.; Leamon, C.P.; Muller, C. ^{177}Lu -EC0800 combined with the antifolate pemetrexed: Preclinical pilot study of folate receptor targeted radionuclide tumor therapy. *Mol Cancer Ther* **2013**, *12*, 2436-2445.
81. Muller, C.; Struthers, H.; Winiger, C.; Zhernosekov, K.; Schibli, R. DOTA conjugate with an albumin-binding entity enables the first folic acid-targeted ^{177}Lu -radionuclide tumor therapy in mice. *J Nucl Med* **2013**, *54*, 124-131.

82. Di Gialleonardo, V.; Wilson, D.M.; Keshari, K.R. The potential of metabolic imaging. *Semin Nucl Med* **2016**, *46*, 28-39.
83. Hou, Z.; Matherly, L.H. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr* **2014**, *73*, 175-204.
84. Plathow, C.; Weber, W.A. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med* **2008**, *49* Suppl 2, 43S-63S.
85. Croteau, E.; Renaud, J.M.; Richard, M.A.; Ruddy, T.D.; Bénard, F.; deKemp, R.A. Pet metabolic biomarkers for cancer. *Biomark Cancer* **2016**, *8*, 61-69.
86. Kim, M.M.; Parolia, A.; Dunphy, M.P.; Venneti, S. Non-invasive metabolic imaging of brain tumours in the era of precision medicine. *Nat Rev Clin Oncol* **2016**, *advance online publication*.
87. James, M.L.; Gambhir, S.S. A molecular imaging primer: Modalities, imaging agents, and applications. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897-965.
88. Challapalli, A.; Aboagye, E.O. Positron emission tomography imaging of tumor cell metabolism and application to therapy response monitoring. *Front Oncol* **2016**, *6*, 44.
89. Kinahan, P.E.; Fletcher, J.W. PET/CT standardized uptake values (SUVS) in clinical practice and assessing response to therapy. *Semin Ultrasound CT MR* **2010**, *31*, 496-505.
90. Yang, D.J.; Kim, C.G.; Schechter, N.R.; Azhdarinia, A.; Yu, D.F.; Oh, C.S.; Bryant, J.L.; Won, J.J.; Kim, E.E.; Podoloff, D.A. Imaging with ^{99m}Tc ecdg targeted at the multifunctional glucose transport system: Feasibility study with rodents. *Radiology* **2003**, *226*, 465-473.
91. Chen, Y.; Xiong, Q.; Yang, X.; Huang, Z.; Zhao, Y.; He, L. Noninvasive scintigraphic detection of tumor with ^{99m}Tc-DTPA-deoxyglucose: An experimental study. *Cancer Biother Radiopharm* **2007**, *22*, 403-405.
92. Fischer, G.; Schirmacher, R.; Wängler, B.; Wängler, C. Radiolabeled heterobivalent peptidic ligands: An approach with high future potential for in vivo imaging and therapy of malignant diseases. *Chem. Med. Chem.* **2013**, *8*, 883-890.
93. Liu, Z.; Li, Z.B.; Cao, Q.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X. Small-animal pet of tumors with (64)Cu-labeled rgd-bombesin heterodimer. *J Nucl Med* **2009**, *50*, 1168-1177.

94. Li, Z.B.; Wu, Z.; Chen, K.; Ryu, E.K.; Chen, X. 18F-labeled BBN-RGD heterodimer for prostate cancer imaging. *J Nucl Med* **2008**, *49*, 453-461.
95. Shallal, H.M.; Minn, I.; Banerjee, S.R.; Lisok, A.; Mease, R.C.; Pomper, M.G. Heterobivalent agents targeting psma and integrin- α v β 3. *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 393-405.
96. Liu, Z.; Niu, G.; Wang, F.; Chen, X. (68)Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and grpr-targeted tumor imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2009**, *36*, 1483-1494.
97. Liu, Z.; Yan, Y.; Chin, F.T.; Wang, F.; Chen, X. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using 18F-labeled pegylated RGD-Bombesin heterodimer 18F-FB-PEG3-GLU-RGD-BBN. *J. Med. Chem.* **2008**, *52*, 425-432.
98. Jackson, A.B.; Nanda, P.K.; Rold, T.L.; Sieckman, G.L.; Szczodroski, A.F.; Hoffman, T.J.; Chen, X.; Smith, C.J. 64Cu-NO2A-RGD-GLU-6-AHX-BBN(7-14)NH2: A heterodimeric targeting vector for positron emission tomography imaging of prostate cancer. *Nucl Med Biol* **2012**, *39*, 377-387.
99. Durkan, K.; Jiang, Z.; Rold, T.L.; Sieckman, G.L.; Hoffman, T.J.; Bandari, R.P.; Szczodroski, A.F.; Liu, L.; Miao, Y.; Reynolds, T.S., *et al.* A heterodimeric [RGD-Glu-[(64)cu-NO2A]-6-AHX-RM2] α v β 3/GRPR-targeting antagonist radiotracer for pet imaging of prostate tumors. *Nucl Med Biol* **2014**, *41*, 133-139.
100. Liu, Z.; Yan, Y.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X. (18)F, (64)Cu, and (68)Ga labeled RGD-Bombesin heterodimeric peptides for pet imaging of breast cancer. *Bioconjug Chem* **2009**, *20*, 1016-1025.
101. Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Kopka, K. Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved pet imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate* **2014**, *74*, 659-668.
102. Liolios, C.; Schafer, M.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Kopka, K. Novel bispecific PSMA/GRPR targeting radioligands with optimized pharmacokinetics for improved pet imaging of prostate cancer. *Bioconjug Chem* **2016**, *27*, 737-751.

103. Miller, W.H.; Hartmann-Siantar, C.; Fisher, D.; Descalle, M.A.; Daly, T.; Lehmann, J.; Lewis, M.R.; Hoffman, T.; Smith, J.; Situ, P.D., *et al.* Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for ^{90}Y , ^{188}Re , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{64}Cu , and ^{177}Lu radionuclides. *Cancer Biother Radiopharm* **2005**, *20*, 436-449.
104. Dong, Q.; Xie, Z.X.; Xie, C.; Lu, W.Y.; Zhang, Q.; Li, X.; Liu, M. Isomeric folate-conjugated polymeric micelles bind to folate receptors and display anticancer effects. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 7363-7369.
105. Vortherms, A.R.; Doyle, R.P.; Gao, D.; Debrah, O.; Sinko, P.J. Synthesis, characterization, and in vitro assay of folic acid conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (azt): Toward targeted azt based anticancer therapeutics. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 173-185.
106. Yin, J.J.; Sharma, S.; Shumyak, S.P.; Wang, Z.X.; Zhou, Z.W.; Zhang, Y.; Guo, P.; Li, C.Z.; Kanwar, J.R.; Yang, T., *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel folic acid receptor-targeted, beta-cyclodextrin-based drug complexes for cancer treatment. *PLoS One* **2013**, *8*, e62289.
107. Socrates, G. *Infrared and raman characteristic group frequencies: Tables and charts.* Wiley: 2004.
108. Fossheimab, R.; Dahla, S.G. Molecular structure and dynamics of aminopolycarboxylates and their lanthanide ion complexes. *Acta Chemica Scandinavica* **1990**, *44*, 698-706.
109. Santos-Cuevas, C.L.; Ferro-Flores, G.; de Murphy, C.A.; Pichardo-Romero, P.A. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys3]-Bombesin: Biokinetics and dosimetry in women. *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 741-747.
110. Baidoo, K.E.; Lin, K.-S.; Zhan, Y.; Finley, P.; Scheffel, U.; Wagner, H.N. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 218-225.
111. Betzel, T.; Müller, C.; Groehn, V.; Müller, A.; Reber, J.; Fischer, C.R.; Krämer, S.D.; Schibli, R.; Ametamey, S.M. Radiosynthesis and preclinical evaluation of 3'-aza-2'-[^{18}F] fluorofolic acid: A novel pet radiotracer for folate receptor targeting. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 205-214.

112. Scopinaro, F.; Varvarigou, A.; Ussof, W.; De Vincentis, G.; Sourlingas, T.; Evangelatos, G.; Datsteris, J.; Archimandritis, S. Technetium labeled bombesin-like peptide: Preliminary report on breast cancer uptake in patients. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2002**, *17*, 327-335.
113. Shariati, F.; Aryana, K.; Fattahi, A.; Forghani, M.N.; Azarian, A.; Zakavi, S.R.; Sadeghi, R.; Ayati, N.; Sadri, K. Diagnostic value of ^{99m}Tc-bombesin scintigraphy for differentiation of malignant from benign breast lesions. *Nucl. Med. Commun.* **2014**, *35*, 620-625.
114. Van de Wiele, C.; Phonteyne, P.; Pauwels, P.; Goethals, I.; Van den Broecke, R.; Cocquyt, V.; Dierckx, R.A. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 260-264.
115. Eder, M.; Schafer, M.; Bauder-Wust, U.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Kopka, K. Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved pet imaging and therapy of prostate cancer. *Prostate* **2014**, *74*, 659-668.
116. Birn, H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: Characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* **2006**, *291*, F22-36.
117. Melis, M. *Radiopeptides for targeted tumour therapy and the kidney*. Erasmus MC: University Medical Center Rotterdam: 2010.
118. Luna-Gutiérrez, M.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-García, B.; Jiménez-Mancilla, N.; Morales-Avila, E.; León-Rodríguez, D.; Isaac-Olivé, K. ¹⁷⁷Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing α (v) β (3) integrins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2012**, *55*, 140-148.
119. Luna-Gutiérrez, M.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-García, B.E.; Santos-Cuevas, C.L.; Jiménez-Mancilla, N.; León-Rodríguez, D.; Azorín-Vega, E.; Isaac-Olivé, K. A therapeutic system of ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles-RGD internalized in breast cancer cells. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2013**, *57*, 212-219.

120. Almer, G.; Mangge, H.; Zimmer, A.; Prassl, R. Lipoprotein-related and apolipoprotein-mediated delivery systems for drug targeting and imaging. *Current medicinal chemistry* **2015**, 22, 3631-3651.