

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
Departamento de Química e Bioquímica



Complexos de Elementos
Emissores de Radiação Gama e de
Electrões Auger para Diagnóstico
e/ou Terapia do Cancro

Teresa Sofia Araújo Esteves

Tese orientada pela Doutora Isabel Rego dos Santos

Doutoramento em Química
(Química Inorgânica)

2011

O trabalho descrito nesta tese foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas na Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN) sob orientação da Doutora Isabel Rego dos Santos. Este trabalho envolveu ainda colaborações com o Centro de Química Estrutural (CQE) do Instituto Superior Técnico (IST) com o Professor João Costa Pessoa, e com o Departamento de Investigação do Harry S. Truman Memorial Veterans Hospital, Missouri, USA, com o Doutor Charles J. Smith.

Agradecimentos

Quero agradecer à Doutora Isabel Santos por ter aceite ser minha orientadora no decurso do trabalho que originou esta tese.

Agradeço ao Professor João Costa Pessoa (Instituto Superior Técnico) pela disponibilidade para acompanhar parte do trabalho a desenvolver.

I would like to thank Dr. Charles Smith for his friendship and sympathy in the way I was welcomed during my stay in his group in the USA and all the knowledge that was passed to me.

Aos Doutores Gabriel Martins (Instituto Gulbenkian de Ciência) e José Rino (Instituto de Medicina Molecular) pela realização dos estudos de microscopia de fluorescência.

Agradeço também ao Doutor Joaquim Marçalo (ITN) a sua disponibilidade para a discussão de alguns resultados das inúmeras amostras processadas por ESI-MS, e à Doutora Ana Varela Coelho a realização dos espectros de MS-MS no Laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.

Às Doutoras Paula Campelo, Patricia Antunes, Filipa Mendes, Sofia Gama, Fernanda Marques e Catarina Xavier, agradeço o envolvimento directo no meu trabalho e a amizade partilhada.

Às Doutoras Célia Fernandes, Lurdes Gano, Paula Raposinho, e ao Doutor António Paulo e à Elisabete Correia e ao Amadeu Rodrigues, agradeço os ensaios biológicos, o apoio prestado e a capacidade de transmitir conhecimento.

Quero agradecer, sem particularizar, aos colegas do grupo de investigação onde me insiro. À sua maneira, cada um contribuiu para o desenvolvimento do meu trabalho de uma forma directa ou indirecta mas sempre construtivamente quer pela amizade, ajuda e boa disposição quer pelas conversas mais científicas que tiveram lugar ao longo do tortuoso caminho percorrido.

Por último, mas sem sombra de dúvida o mais importante, agradeço ao Hugo pelo carinho imenso, paciência infinita e compreensão inesgotável pela minha falta de disponibilidade e aos meus pais pelo seu apoio incondicional.

Teresa Esteves

Resumo

Novos ligandos do tipo pirazolo-diamina com as unidades intercaladoras alaranjado de acridina (**L1**, **L3**), 9-acridina ácido carboxílico (**L2**, **L4**) e antraceno (**L5**), na posição 4 do anel de pirazolilo, foram sintetizados e caracterizados. A sua coordenação à unidade *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M=Re, ^{99m}Tc) originou complexos do tipo *fac*-[M(CO)₃(κ³-L)]⁺²⁺ em que: L=**L1**: M= Re (**Re1**), ^{99m}Tc (**Tc1**); L=**L2**: M= Re (**Re2**), ^{99m}Tc (**Tc2**); L=**L3**: M= Re (**Re3**), ^{99m}Tc (**Tc3**); L=**L4**: M=Re (**Re4**); L=**L5**: M= Re (**Re5**), ^{99m}Tc (**Tc5**). A interacção de **L1** e **L2** e dos respectivos complexos **Re1** e **Re2** com ADN de timo de vitela foi avaliada por várias técnicas espectroscópicas. Os compostos **L1** e **Re1** demonstraram afinidade para o ADN interagindo com ele por intercalação, enquanto **L2** e **Re2** possuíam uma fraca afinidade. Os resultados de LD mostraram que **L1** e **Re1** se comportavam como intercaladores perfeitos. Por microscopia confocal de fluorescência verificou-se que **L1**, **L3**, **Re1** e **Re3** internalizavam em células B16-F1 e/ou PC-3, localizando-se no núcleo, comportamento confirmado e quantificado com estudos que envolveram as mesmas linhas celulares e o complexo **Tc1**. Estudos com ADN plasmídico puc19 demonstraram que **Tc1** convertia a forma superenrolada do ADN na forma circular, por indução de quebras simples. Para explorar a potencial aplicação terapêutica do ^{99m}Tc como emissor Auger, análogos da bombesina (BBN) do tipo **X-BBN[7-14]** (X=SGS, GGG, NLS) foram ligados a **L3** originando os conjugados peptídicos **L6** (SGS), **L7** (GGG) e **L11** (NLS). Complexos do tipo *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(κ³-L)]²⁺ (L=**L6** (**Tc6**); L=**L7** (**Tc7**); L=**L11** (**Tc11**)) foram seguidamente isolados e caracterizados por comparação do seu perfil cromatográfico com o dos correspondentes complexos de rênio (**Re6**, **Re7**, **Re11**). Estudos com células tumorais confirmaram que **Re6/Tc6** e **Re7/Tc7** eram selectivos para as células PC-3 e que se acumulavam no núcleo. A translocação do complexo **Tc11** do citoplasma para o núcleo aumentou devido à presença da sequência peptídica NLS.

Abstract

Novel pyrazolyl-diamine ligands with the intercalating units acridine orange (**L1**, **L3**), 9-acridine carboxylic acid (**L2**, **L4**) and anthracene (**L5**), at the 4-position of the pyrazolyl ring, were synthesized and characterized. Coordination towards the *fac*-[M(CO)₃]⁺ core (M = Re, ^{99m}Tc) led to complexes of the type *fac*-[M(CO)₃(κ³-L)]⁺²⁺ where: L = **L1**: M = Re (**Re1**), ^{99m}Tc (**Tc1**); L = **L2**: M = Re (**Re2**), ^{99m}Tc (**Tc2**); L = **L3**: M = Re (**Re3**), ^{99m}Tc (**Tc3**); L = **L4**: M = Re (**Re4**); L = **L5**: M = Re (**Re5**), ^{99m}Tc (**Tc5**). The interaction of **L1** and **L2** and complexes **Re1** and **Re2** with calf thymus DNA was investigated by a variety of spectroscopic techniques. Compounds **L1** and **Re1** had moderate affinity to DNA interacting with it by intercalation, while **L2** and **Re2** had poor affinity. LD measurements showed that **L1** and **Re1** acted as perfect intercalators. By confocal fluorescence microscopy we found that **L1**, **L3**, **Re1** and **Re3** internalized in B16-F1 and/or PC-3 cells, localizing in their nucleus, which was confirmed and quantified in studies involving the same cell lines and complex **Tc1**. DNA studies with puc19 plasmid showed that **Tc1** converted supercoiled DNA to the open circular form, by induction of single strand breaks. To explore the potential therapeutic usefulness of ^{99m}Tc as an Auger emitter, bombesin analogues of the type **X-BBN[7-14]** (X=SGS, GGG, NLS) were conjugated to **L3** leading to conjugates **L6** (SGS), **L7** (GGG) and **L11** (NLS). Complexes of the type *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(κ³-L)]²⁺ (L=**L6** (**Tc6**); L=**L7** (**Tc7**); L=**L11** (**Tc11**)) were isolated and characterized by comparison of their chromatographic profiles with the ones of the corresponding rhenium complexes (**Re6**, **Re7**, **Re11**). Studies with tumor cells confirmed that **Re6/Tc6** and **Re7/Tc7** had selectivity for PC-3 cells and that they accumulated in their nucleus. The translocation of complex **Tc11** from cytoplasm to the nucleus was enhanced due to the presence of the NLS sequence.

Palavras Chave

Radiofármacos específicos

Complexos tricarbonilo de $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$

Ligandos trifuncionais

Pirazolo-diamina

Intercalador

ADN

Electrões Auger

Bombesina

Key Words

Specific radiopharmaceuticals

$^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ tricarbonyl complexes

Trifunctional ligands

Pyrazole-diamine

Intercalator

DNA

Auger Electrons

Bombesin

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Palavras Chave / Key Words	ix
Índice Geral	xii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxvii
Abreviaturas	xxix
Preâmbulo	1
Principais Compostos Sintetizados	7
1. Introdução	
1.1. Considerações Gerais	15
1.2. Emissores Auger com Potencial Interesse para Terapia	20
2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN	
2.1. Química de Rénio (I) e de Tecnécio (I) Relevante para Aplicação Médica	31
2.2. Síntese e Caracterização de Unidades Pirazolo-Diamina	36
2.3. Síntese e Caracterização das Unidades Intercaladoras	42

2.4.	Síntese e Caracterização de Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo Unidades Intercaladoras (L1-L5)	45
2.5.	Síntese e Caracterização de Complexos de Rénio (I) (Re1-Re5) Estabilizados pelos Ligandos L1-L5	52
2.6.	Interação de Ligandos e dos Respetivos Complexos de Rénio com ADN	55
2.6.1.	Espectroscopia de UV-Visível	58
2.6.2.	Espectroscopia de Fluorescência	61
2.6.3.	Dicroísmo Circular	64
2.6.4.	Dicroísmo Linear	66
2.6.5.	Determinação das Constantes de Ligação ao ADN	69
2.7.	Conclusões	76

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I)

Contendo Unidades Intercaladoras

3.1.	Introdução	83
3.2.	Síntese e Caracterização de Complexos de ^{99m}Tc (I)	84
3.3.	Estudos <i>in vitro</i> de Complexos de Rénio (I) e de Tecnécio (I) com ADN Plasmídico e com Células Tumorais	86
3.3.1.	Estudos com ADN Plasmídico	86
3.3.2.	Estudos com Células Tumorais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1)	88
3.3.2.1.	Estudos de Citotoxicidade e Radiotoxicidade	88
3.3.2.1.1.	Citotoxicidade de Complexos de Rénio (I)	89
3.3.2.1.2.	Radiotoxicidade de Complexos de Tecnécio (I)	90
3.3.2.2.	Distribuição Celular de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I)	93
3.3.2.2.1.	Microscopia de Fluorescência com Complexos de Rénio (I)	93

3.3.2.2.2.	Estudos Celulares Dinâmicos com Complexos de Rénio (I)	97
3.3.2.2.3.	Captção Celular, Internalização Nuclear e Efluxo de Complexos de Tecnécio (I)	99
3.4.	Conclusões	105

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

4.1.	Considerações Gerais	111
4.1.1.	Bombesina	113
4.1.2.	Análogos da Bombesina Marcados com Radiometais	114
4.2.	Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS)	124
4.2.1.	Síntese de Análogos da Bombesina em Fase Sólida	127
4.3.	Conjugação de Análogos da Bombesina a Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo Unidades Intercaladoras	128
4.4.	Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina	139
4.4.1.	Estudos Celulares Dinâmicos com Complexos de Rénio (I)	143
4.5.	Síntese e Caracterização de Complexos de Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina	145
4.5.1.	Ensaio com Células Tumerais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1)	148
4.5.1.1.	Captção Celular, Internalização Nuclear e Efluxo	149
4.5.1.2.	Radiotoxicidade	153
4.5.2.	Estabilidade <i>in vitro</i> em Soro Humano e Ligação às Proteínas	153
4.5.3.	Comportamento Biológico em Ratinhos Charles River	158

4.5.3.1.	Estabilidade <i>in vivo</i> , Distribuição e Eliminação	158
4.6.	Conclusões	160
5.	Conclusões e Perspectivas	173
6.	Parte Experimental	
6.1.	Materiais e Técnicas de Purificação e de Caracterização Química	191
6.2.	Síntese das Unidades Pirazolo-Diamina	197
6.3.	Síntese das Unidades Intercaladoras	209
6.4.	Síntese dos Ligandos L1-L5	212
6.5.	Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora	228
6.6.	Complexos de Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora	233
6.7.	Síntese das Sequências Peptídicas	235
6.7.1.	Análogos da Bombesina	235
6.7.2.	Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina	238
6.7.3.	Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo- Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina	245
6.7.4.	Complexos de Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo- Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina	248
6.8.	Lipofilia	251
6.9.	Estudos Espectroscópicos de Interação de Ligandos e Complexos de Rénio (I) com ADN	251
6.10.	Ensaio com ADN Plasmídico	252
6.11.	Estudos de Ligandos e Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) com Células Tumorais B16-F1 e PC-3	253

6.11.1.	Viabilidade Celular	254
6.11.1.1.	Citotoxicidade de Ligandos e Complexos de Rénio (I)	254
6.11.1.2.	Radiotoxicidade de Complexos de Tecnécio (I)	255
6.11.2.	Captação Celular e Internalização Nuclear de Ligandos, Complexos de Rénio (I) e Complexos de Tecnécio (I)	255
6.11.2.1.	Estudos de Captação Celular e Nuclear de Ligandos e Complexos de Rénio (I) por Microscopia de Fluorescência	255
6.11.2.1.1.	Microscopia Confocal de Fluorescência com Células Fixadas	256
6.11.2.1.2.	Microscopia Confocal de Fluorescência com Células Vivas	257
6.11.2.2.	Captação Celular e Internalização Nuclear de Complexos de Tecnécio (I)	257
6.11.2.3.	Efluxo de Complexos de Tecnécio (I)	258
6.12.	Estudos Biológicos / Farmacocinética	259
6.12.1.	Estudos de Biodistribuição	259
6.12.2.	Estabilidade <i>in vivo</i> / Metabolização	260
	Referências Bibliográficas	263

Índice de Figuras

Figura 1.1: Representação esquemática de um radiofármaco contendo na sua composição um centro metálico: perfusão (em cima) e específico (em baixo).	15
Figura 1.2: Representação esquemática do percurso das partículas α , β e e^- Auger no meio celular e subcelular.	18
Figura 1.3: Iododeoxiuridina marcada com ^{125}I (^{125}I -UdR).	20
Figura 1.4: Daunorubicina marcada com ^{125}I .	21
Figura 1.5: Citotoxicidade de ^{111}In -DTPA-hEGF na ausência (preto) ou presença (branco) de gefitinibe a 37°C em células MDA-MB-468.	22
Figura 1.6: Estruturas de: Octreoscan (A) e ^{111}In -DOTA-TOC-NLS (B: análogo da SST ligado ao DOTA e a uma sequência NLS, marcado com ^{111}In).	23
Figura 1.7: Complexo contendo o emissor Auger $^{99\text{m}}\text{Tc}$, uma unidade intercaladora (pireno) e uma sequência NLS (PKKKRKVGG: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Gly-Gly).	25
Figura 1.8: Electroforese de ΦX174 (100 ng) em tampão TRIS (50 mM, pH 7,4, 50 μL) após 24 horas de incubação com o complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ representado (15 MBq).	25
Figura 1.9: a) Complexo contendo o emissor Auger $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e uma unidade intercaladora (antraceno). b) Indução de apoptose em células B16-F1	26
Figura 1.10: a) Complexos contendo a unidade $\text{fac}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, ^{99\text{m}}\text{Tc}$), uma unidade intercaladora (alaranjado de acridina) e um análogo da bombesina (BBN[8-14]). b) Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células B16-F1 e PC-3 incubadas com o complexo representado quando $\text{M} = \text{Re}$.	27

Figura 2.1: Exemplos de fragmentos metálicos mais estudados para a marcação de biomoléculas (BM) com tecnécio.	33
Figura 2.2: Síntese de $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ a partir de $[^{99m}TcO_4]^-$.	34
Figura 2.3: Exemplos de ligandos tridentados para estabilização do fragmento metálico $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$.	34
Figura 2.4: Representação esquemática da aproximação trifuncional explorada nesta tese.	35
Figura 2.5: Espectro de RMN de 1H em $CDCl_3$ da unidade pirazolo-diamina 8 .	38
Figura 2.6: Estrutura do alaranjado de acridina (AO), do 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA) e do antraceno.	42
Figura 2.7: Estrutura de 9-antrilmetilamónio (AMAC).	43
Figura 2.8: Espectro de RMN de 1H em CD_3OD de L2 .	46
Figura 2.9: Espectro de RMN de 1H em CD_3OD de L3 .	48
Figura 2.10: Espectro de massa de L3 (ESI-MS; modo positivo).	49
Figura 2.11: Espectro de RMN de 1H em CD_3OD de L5 (* - impureza).	51
Figura 2.12: Espectro de massa de Re5 (ESI-MS; modo positivo). Insert: espectro teórico.	53
Figura 2.13: Espectros de RMN de 1H (em cima) e de ^{13}C (em baixo) de Re5 em CD_3OD (* - impureza).	54

- Figura 2.14:** Modos de interação de compostos com o ADN: a) ligação electrostática ou iónica a um grupo químico da hélice, como por exemplo, grupo fosfato; b) ligação electrostática ou iónica a grupos químicos localizados à superfície da hélice de ADN no sulco maior ou menor; c) intercalação (interacção hidrofóbica entre um fragmento planar e as bases do ADN). 56
- Figura 2.15:** Representação esquemática de intercaladores com o eixo molecular mais longo paralelo (a) e perpendicular (b) ao local de ligação. A cinzento estão representadas as bases nucleotídicas e a preto a molécula que intercala. 57
- Figura 2.16:** Espectros de absorção de **L1** ($4,25 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re1** ($1,5 \times 10^{-5}$ M, baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,13; 0,17; 0,23 e 0,33 mM para **L1**; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05; 0,07; 0,10; 0,14; 0,21 e 0,40 mM para **Re1**) em tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 7,4). 59
- Figura 2.17:** Espectros de absorção de **L2** ($6,5 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re2** ($4,94 \times 10^{-5}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,12; 0,48; 0,90; 1,29; 1,64; 1,96; 2,31; 2,79 e 3,19 mM para **L2**; 0,26; 0,40; 0,47; 0,54; 0,61; 0,72 e 1,01 mM para **Re2**) em tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 7,4). 61
- Figura 2.18:** Espectros de fluorescência de **L1** ($1,06 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re1** ($1,5 \times 10^{-6}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (5,5; 8,4; 11,1; 13,9; 16,6; 21,5; 26,4; 36,0; 50,1 e 59,3 μ M para **L1**; 4,0; 7,8; 11,7; 15,5; 19,3; 23,1; 30,1; 37,0; 50,6; 70,4 e 83,2 μ M para **Re1**) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4). Excitação a 470 nm. 62
- Figura 2.19:** Espectros de fluorescência de **L2** ($1,3 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re2** ($9,9 \times 10^{-6}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,20; 0,29; 0,37; 0,44; 0,53; 0,61; 0,68; 0,75 e 0,81 mM para **L2**; 0,02; 0,06; 0,13; 0,29; 0,55 e 0,72 mM para **Re2**) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4). Excitação a 359 nm. 64

Figura 2.20: Espectros de CD induzido (CDI) para os compostos L1 (em cima) e Re1 (em baixo) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4) em presença de várias razões composto/ADN, para uma concentração de ADN de $2,5 \times 10^{-5}$ Mnucl ⁻¹ : A) 0,2 eq. de composto; B) 2 eq. de composto.	65
Figura 2.21: Espectros de LD e LDr dos compostos L1 (à esquerda) e Re1 (à direita) para diferentes razões molares composto/ADN: A) sem composto; B) 0,04 eq. de composto; C) 0,08 eq. de composto; D) 0,2 eq. de composto. Os espectros foram registados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2).	67
Figura 2.22: Espectros de LD e LDr dos compostos L2 (à esquerda) e Re2 (à direita) para diferentes razões molares composto/ADN: A) sem composto; B) 0,04 eq. de composto; C) 0,08 eq. de composto; D) 0,2 eq. de composto. Os espectros foram registados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2).	68
Figura 2.23: Variação da absorvância de L1 em função da concentração de ADN: ajuste ao modelo de Scatchard (1).	70
Figura 2.24: Variação da absorvância de L1 em função da concentração de ADN. A curva representa um ajuste não linear à equação 3.	71
Figura 2.25: Variação da intensidade de fluorescência de L1 em função da concentração de ADN. A curva representa um ajuste não linear à equação 4.	72
Figura 2.26: Ajuste de McGhee von Hippel para os dados de fluorescência obtidos para L1 .	73
Figura 3.1: Cromatograma de HPLC obtido após co-injecção dos complexos Re3 e Tc3 . (HPLC: coluna Nucleosil 100-5 C18; método: A)	85
Figura 3.2: Clivagem de ADN plasmídico (puc19) após 48 horas de incubação com diferentes compostos à temperatura ambiente e em tampão Tris (pH 7,4): A – marcador de peso molecular de ADN – 1 Kb; B – controlo (ADN + tampão); C – ADN	87

+ **Tc1** (310 μCi); **D** – ADN + **Tc1** (150 μCi); **E** – ADN + $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ (310 μCi); **F** – ADN + $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ (150 μCi); **G** – ADN + **Re1** (10^{-8} M).

Figura 3.3: Viabilidade das células PC-3 na presença de diferentes concentrações de **Re1** após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3). **89**

Figura 3.4: Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações de **L2** e **Re2** após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3). **90**

Figura 3.5: Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações radioactivas de **Tc1** e **Tc2** após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3). **91**

Figura 3.6: b) Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações radioactivas do complexo representado em a) após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3). **92**

Figura 3.7: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 7×10^{-5} M de **L1** e **Re1** (verde), após incubação com DAPI (azul), e **L2** e **Re2** (azul), após incubação com DRAQ5 (vermelho). As setas indicam os nucléolos onde se verifica a acumulação dos compostos. **94**

Figura 3.8: Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 7×10^{-5} M de **L3** e **Re3** (verde) após incubação com DAPI (azul). As setas indicam os nucléolos onde se acumulam os compostos. **96**

Figura 3.9: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 8×10^{-5} M do ligando pirazolo-diamina com antraceno (**B**, azul) e do respectivo complexo de rénio (I) (**C**, azul), após incubação com DRAQ5 (vermelho). As setas a branco indicam os compostos. **97**

Figura 3.10: a) Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células PC-3 na presença de $1,5 \times 10^{-5}$ M de Re1 (verde) Vermelho: dihidroetídio. Imagens adquiridas a 5, 15, 30 e 60 minutos após adição dos compostos. Insert: distribuição celular da fluorescência para uma única célula aos mesmos tempos. Barra: 20 μ m. As setas a branco indicam a localização dos compostos. b) Gráfico representativo da intensidade de fluorescência em função do tempo.	98
Figura 3.11: Em cima: Internalização celular de Tc1 e Tc2 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 ou B16-F1. A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3). Em baixo: Internalização nuclear de Tc1 e Tc2 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 ou B16-F1. A internalização nuclear é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n=3).	100
Figura 3.12: Retenção celular de Tc1 em células PC-3 ou B16-F1 após 1 hora de internalização e 4 horas de efluxo a 37°C (média \pm desvio padrão, n=3).	101
Figura 3.13: Em cima: Internalização celular de Tc5 e A após 4 horas de incubação a 37°C com células B16-F1 ou PC-3. A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3). Em baixo: Internalização nuclear de Tc5 e A após 4 horas de incubação a 37°C com células B16-F1 ou PC-3. A internalização nuclear é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3).	103
Figura 3.14: Retenção celular do complexo A após 2 horas de internalização e 4 horas de efluxo em células PC-3 a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).	104
Figura 4.1: Ligandos acíclicos e cíclicos poliaminocarboxílicos.	115
Figura 4.2: Estrutura de [DTPA ¹ , Lys ³ , Tyr ⁴]-BBN[2-14].	117
Figura 4.3: Estrutura de ¹⁷⁷ Lu-AMBA (AMBA = DOTA-Gly-(4-aminobenzoil)-Gln-Trp-	117

Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂).

- Figura 4.4:** Estrutura de complexos do tipo [⁶⁴Cu-NO₂A-(X)-BBN(7-14)NH₂]. **118**
- Figura 4.5:** Aproximação "4+1" para marcação de análogos da bombesina (BBN) com Tc (III). **119**
- Figura 4.6:** Estrutura de ^{99m}Tc-RP-527 e imagem SPECT de um paciente obtida após injeção deste composto (as setas indicam metástases ósseas). **120**
- Figura 4.7:** Estruturas de ^{99m}Tc-Demobesina-1 e ^{99m}Tc-Demobesina-4. **121**
- Figura 4.8:** Estruturas pirazolo-diamina contendo análogos da bombesina (BBN) e uma unidade intercaladora do ADN (R). **123**
- Figura 4.9:** Transporte nucleocitoplasmático promovido pelo NLS (PN = poro nuclear). **124**
- Figura 4.10:** Resina rink amide MBHA (P = matriz de poliestireno). **125**
- Figura 4.11:** Estruturas dos compostos **23** e **32**. **128**
- Figura 4.12:** Cromatogramas de HPLC da mistura reaccional resultante da conjugação de **23** a **SGS-BBN**, obtidos com diferentes gradientes. (HPLC: coluna nucleosil 100-5 C18) **131**
- Figura 4.13:** Metionina e respectivo produto de oxidação. **132**
- Figura 4.14:** Espectro de massa de **L11** (ESI-MS; modo positivo). **134**
- Figura 4.15:** Locais da sequência **NLS-BBN** onde poderia ocorrer a conjugação do ligando pirazolo-diamina **L3**. (* - local onde ocorreu a conjugação). **134**
- Figura 4.16:** Cromatograma de HPLC (A) e espectro de massa de **L12** (B: ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna nucleosil 100-5 C18; método: C) **137**

Figura 4.17: Espectro de massa de L10 (ESI-MS; modo positivo) (* - pico não identificado).	138
Figura 4.18: Cromatogramas de HPLC (A) e espectros de massa (B) de Re7 e Re9 (ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna 100-5 C18; método: C)	141
Figura 4.19: Espectro de massa (A: ESI-MS; modo positivo) e cromatograma de HPLC (B) de Re11 . (HPLC: coluna 100-5 C18; método: A)	142
Figura 4.20: Cromatograma de HPLC e espectro de massa de Re12 (ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna 100-5 C18; método: C)	142
Figura 4.21: Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de uma célula PC-3 na presença de $1,5 \times 10^{-5}$ M de Re6 (A) e Re7 (B). Verde: compostos. Imagens adquiridas a 5, 15, 30 e 60 min após adição dos compostos.	144
Figura 4.22: Cromatograma de HPLC obtido após a co-injeção dos complexos Re7 e Tc7 . (HPLC: coluna Nucleosil 100-5 C18; método C)	146
Figura 4.23: Internalização celular de Tc6-Tc9 e Tc11 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 (esquerda) e B16-F1 (direita). A internalização celular é expressa em porcentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3).	150
Figura 4.24: Internalização nuclear de Tc6-Tc9 e Tc11 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 (esquerda) e B16-F1 (direita). A internalização nuclear é expressa em porcentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3).	150
Figura 4.25: Retenção celular para Tc6 , Tc7 e Tc11 após 1 hora de internalização e 4 horas de efluxo a 37°C em células PC-3 (média \pm desvio padrão, n = 3).	152
Figura 4.26: Viabilidade das células PC-3 na presença de diferentes concentrações	153

radioactivas de **Tc6** e **Tc7** após 36 horas de incubação a 37°C (média ± desvio padrão, n = 3).

Figura 4.27: Estrutura do complexo de ^{99m}Tc com a unidade pirazolo-diamina. **154**

Figura 4.28: Estabilidade de **Tc6** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado) **155**

Figura 4.29: Estabilidade de **Tc7** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado) **155**

Figura 4.30: Estabilidade de **Tc11** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado) **156**

Figura 4.31: Estabilidade de **Tc8** e **Tc9** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 3 horas de incubação a 37°C. **157**

Figura 4.32: Estabilidade de **Tc6** *in vivo* – cromatogramas obtidos por HPLC, 30 minutos após administração. (* - produto de metabolização não identificado). **159**

Figura 4.33: Estabilidade de **Tc7** na urina de um ratinho injectado com o complexo. A urina foi recolhida 30 minutos e 60 minutos após injeção do complexo (* - produto de decomposição não identificado). **160**

Figura 5.1: Unidades intercaladoras: **18** e **19**. **175**

Figura 5.2: Síntese dos ligandos **L1** e **L2** e dos complexos **Re1/Tc1** e **Re2/Tc2**. **175**

Figura 5.3: Ligação de análogos peptídicos a ligandos pirazolo-diamina contendo um intercalador e síntese dos respectivos complexos de rénio (I) e ^{99m}Tc (I). **179**

- Figura 5.4:** Internalização celular de **Tc6** (esquerda) e **Tc7** (direita), após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 e B16-F1. A internalização celular é expressa em porcentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3). **183**
- Figura 5.5:** Distribuição celular de **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** em células PC-3 a 37°C. **184**
- Figura 5.6:** Síntese dos compostos **L5**, **Re5/Tc5** e **L10**. **186**

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Isótopos em utilização clínica ou com potencial para aplicação em medicina nuclear.	17
Tabela 2.1: Constantes de ligação ao ADN para os compostos L1 e Re1 .	74
Tabela 3.1: Condições de síntese e características dos complexos Tc1 , Tc2 , Tc3 e Tc5 .	85
Tabela 4.1: Constantes de estabilidade (K_{ML}) ^a para complexos de poliaminocarboxilatos com iões metálicos divalentes e trivalentes.	116
Tabela 4.2: Caracterização por ESI-MS e HPLC das diferentes sequências peptídicas.	128
Tabela 4.3: Resumo das condições reaccionais estudadas para ligação de 23 às sequências peptídicas.	130
Tabela 4.4: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos conjugados peptídicos L6-L12 .	133
Tabela 4.5: Análise de MS-MS por MALDI do conjugado L11 .	135
Tabela 4.6: Análise de MS-MS por MALDI do conjugado L12 .	137
Tabela 4.7: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos Re6-Re9 , Re11 e Re12 .	140
Tabela 4.8: Condições de síntese e características dos complexos Tc6-Tc9 e Tc11 .	146
Tabela 4.9: Ligação de Tc8 e Tc9 às proteínas plasmáticas.	157
Tabela 6.1: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos análogos da BBN.	236
Tabela 6.2: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos conjugados peptídicos.	242

Tabela 6.3: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos de rênio (I) com análogos peptídicos. **246**

Tabela 6.4: Caracterização por HPLC e log $D_{O/W}$ dos complexos de ^{99m}Tc com análogos peptídicos. **249**

Abreviaturas

aa – aminoácido

ADN – ácido desoxiribonucleico

Ala - alanina

Ar - aromático

Arg – arginina

Asn – asparagina

BFCA – agente quelante bifuncional

BBN – bombesina

BM - biomolécula

BOC – *tert*-butoxicarbonilo

br – *broad*, sinal largo

c.d.o. – comprimento de onda

cm⁻¹ – unidade de número de onda

cpm – contagens por minuto

CT – tomografia computadorizada

d – duplete

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol

dd – dubleto de dupletos

DEAD - dietilazodicarboxilato

DI – dose injectada

DIPEA – diisopropiletilamina

DMF - dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DNSCL – cloreto de 2,4-dinitrobenzenosulfonilo

Dpr – ácido-2,3-diamonipropiónico

DRAQ5 - 1,5-bis{[2-(di-metilamino)etil]amino}-4, 8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona

DTPA – ácido dietilenotriaminapenta acético

e⁻ - electrão

EDC – N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

eV – electrão-volt

fac – facial

Gln - glutamina

Gly - glicina

h – horas

HBTU – o-benzotriazol-N,N',N'',N'''-tetrametil-uronium

His - histidina

HYNIC – ácido hidrazino nicotínico

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

ITLC – cromatografia em camada fina instantânea

IV – infravermelho

K – constante de ligação ao ADN

L - ligando

LET – transferência linear de energia

Leu – leucina

log D_{o/w} – coeficiente de partição octanol-água

Lys - lisina

m - multiplete

Me - metilo

MeOH – metanol

Met – metionina

min – minutos

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Et₃N - trietilamina

NHS – N-hidroxisuccinimida

NLS – sinal de localização nuclear

PBS – tampão fosfato salino

PET – Tomografia por Emissão de Positrão

p.i. – após injeção

PPh₃ – trifenilfosfina

ppm - partes por milhão

Pro - prolina

Pyr – ácido piroglutâmico

pz – pirazolo

q – quarteto

MRI – ressonância magnética

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm - rotações por minuto

s - singuleto

SPECT - Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único

t - tripleto

t. a. – temperatura ambiente

TC - tomografia computadorizada

Tc – ^{99m}Tc

TFA - ácido trifluoroacético

THF - tetrahydrofurano

TLC - cromatografia em camada fina

TMS - tetrametilsilano

t_{ret} - tempo de retenção

Trp - triptofano

t_{1/2} – tempo de semi-vida

Val – valina

α - alfa

β - beta

γ - gama

κ - hapticidade

δ – desvio químico

ν – frequência

λ – comprimento de onda

Preâmbulo

A imagiologia molecular permite a visualização não invasiva, caracterização e quantificação *in vivo* de processos biológicos ao nível molecular e celular utilizando sondas específicas. Os desenvolvimentos tecnológicos levaram a uma evolução das técnicas de imagiologia permitindo a obtenção de imagens de elevada qualidade e resolução que ajudam a efectuar um diagnóstico diferenciado de diversas patologias. As técnicas de imagiologia molecular disponíveis, ou actualmente em maior desenvolvimento, para a monitorização dessas patologias são as técnicas de imagiologia nuclear, ressonância magnética (MRI) e imagiologia óptica.

Dentro das técnicas de imagiologia não invasiva disponíveis para utilização clínica as nucleares, nomeadamente a tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia de emissão de positrão (PET), são as mais sensíveis e por isso as mais promissoras pois permitem fazer a quantificação *in vivo* dos alvos moleculares bem como obter informação funcional do sistema que está a ser analisado. Estas técnicas utilizam radiofármacos, que são formulações farmacêuticas que incluem um radionuclídeo na sua composição que pode ser um emissor de radiação gama (γ) para SPECT ou de positrões (β^+) para PET.

Contudo, a resolução espacial obtida com as técnicas de imagiologia nuclear é relativamente baixa no que se refere a detalhes anatómicos. Com frequência a tomografia computadorizada (CT) ou a MRI são aplicadas para fornecer informação anatómica de alta resolução que pode ser associada à informação molecular ou funcional obtida com as técnicas SPECT ou PET. O desenvolvimento de sistemas híbridos, tais como SPECT/CT, PET/CT ou PET/MRI permitem obter informação anatómica e molecular ou funcional sequencialmente numa única sessão de um exame de diagnóstico.

A imagiologia molecular ou funcional é importante não só para o diagnóstico precoce de certas patologias mas também para fazer o acompanhamento evolutivo das terapias convencionais. Destas terapias destacamos a cirurgia, a quimioterapia e a terapia com radiação.

Inicialmente, a terapia através da utilização de radiação era apenas realizada pela exposição do paciente a uma fonte externa. Mais recentemente, a utilização de radiofármacos pode constituir, nalguns casos, uma alternativa à radioterapia externa, com várias vantagens. Esta nova modalidade terapêutica procura utilizar radiofármacos que têm na sua composição radionuclídeos emissores de radiação ionizante. Estes compostos deverão localizar-se em locais específicos e induzir a morte celular de tecidos malignos.

Os radionuclídeos que mais têm sido estudados para esta aplicação são emissores β , α e Auger. Nos últimos 30 anos vários têm sido os esforços que visam tirar partido das propriedades ionizantes dos electrões (e^-) Auger com vista a uma terapêutica direccionada. Esta aproximação consiste em ligar emissores Auger a vectores biológicos (por exemplo, péptidos). Os radionuclídeos ^{111}In ($t_{1/2} = 2,8$ d), ^{125}I ($t_{1/2} = 60,1$ d) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6,0$ h) são emissores de radiação gama (γ). A emissão de radiação γ por parte destes radionuclídeos é também acompanhada da emissão de e^- Auger: 14 e^- para o ^{111}In , 21 e^- para o ^{125}I e 4 e^- para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Esta característica tem sido o fundamento para diversos estudos efectuados com estes radionuclídeos com o intuito de aferir qual o seu potencial terapêutico. Adicionalmente, pela emissão conjunta de radiação γ , estes radionuclídeos podem permitir fazer em simultâneo um acompanhamento evolutivo do tratamento do paciente por SPECT.

Os e^- Auger têm uma baixa penetração nos tecidos sendo necessária a sua estreita proximidade ao ADN nuclear, ou seja, o radiofármaco dever-se-á localizar no núcleo da célula. Para garantir esta proximidade várias abordagens têm sido estudadas. Uma delas assenta no estudo de compostos que têm na sua constituição moléculas com elevada afinidade para o ADN e com reconhecida capacidade para interactuar com ele, por intercalação entre os pares de base ou por ligação aos sulcos. Outra abordagem possível assenta na modificação de compostos pela introdução de sequências peptídicas conhecidas como sinais de localização nuclear (NLS) que têm a função de fazer a translocação de substâncias do citoplasma para o núcleo das células.

O trabalho apresentado nesta tese teve como principal objectivo contribuir para a avaliação do potencial terapêutico de complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Assim, concebemos, sintetizámos e

avaliámos novos compostos trifuncionais de ^{99m}Tc . Os complexos trifuncionais são constituídos por: i) um agente quelante tridentado para estabilizar a unidade tricarbonilo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$; ii) vectores biológicos para conferir especificidade ao complexo metálico e/ou promover a sua translocação do citoplasma para o núcleo; iii) e uma unidade que se sabe interactuar com o ADN.

Esta tese encontra-se organizada em seis capítulos. No primeiro faz-se uma breve introdução com considerações gerais sobre medicina nuclear e radiofármacos, dando particular atenção aos estudos realizados com emissores de e^- Auger para aplicação terapêutica.

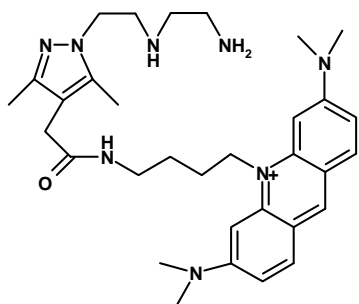
No segundo capítulo, após uma breve introdução sobre a química do rénio/tecnécio relevante para aplicação em medicina nuclear, descreve-se a síntese e caracterização de ligandos pirazolo-diamina contendo unidades com capacidade para interactuar com o ADN e sem ou com um braço carboxilato para ligação a péptidos biologicamente activos. Neste capítulo descrevem-se ainda os complexos modelo de rénio (I) sintetizados bem como a interacção de ligandos e complexos com o ADN, que foi estudada por diferentes técnicas espectroscópicas.

No terceiro capítulo descreve-se a síntese de complexos de ^{99m}Tc (I) com os ligandos descritos no capítulo 2 e apresentam-se estudos *in vitro* de complexos de rénio (I) e ^{99m}Tc (I) com ADN plasmídico e com células tumorais.

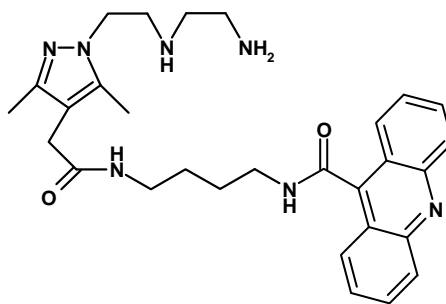
No quarto capítulo faz-se uma introdução geral à utilização de vectores biológicos com afinidade para receptores membranares sobreexpressos em determinados tipos de células, nomeadamente o GRPr. De seguida, faz-se a descrição da síntese e caracterização de análogos peptídicos da BBN e a sua conjugação a agentes trifuncionais, assim como a preparação dos respectivos complexos de rénio e ^{99m}Tc e a avaliação *in vitro* e *in vivo* desses complexos. Finalmente, descrevem-se os estudos realizados para aumentar a internalização nuclear de alguns dos compostos previamente descritos.

As conclusões e sugestões para trabalho futuro são apresentadas no quinto capítulo. Finalmente, no sexto capítulo, são descritos detalhes experimentais sobre o trabalho apresentado nos capítulos 2 a 4.

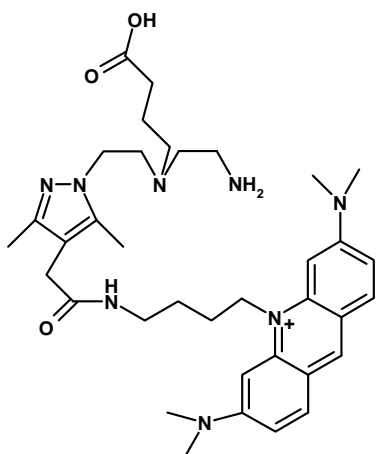
Principais Compostos Sintetizados



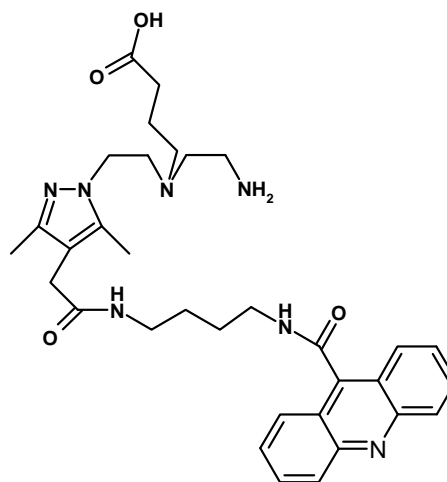
L1



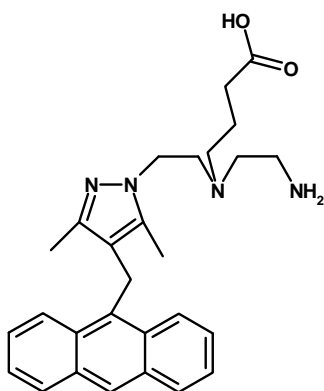
L2



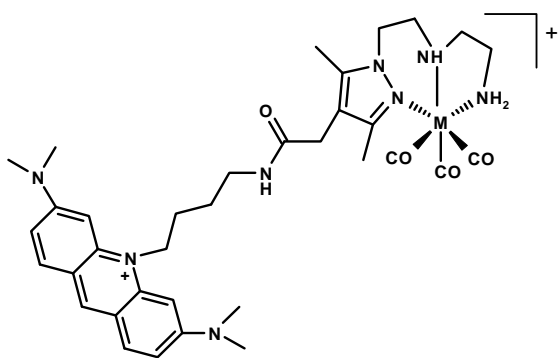
L3



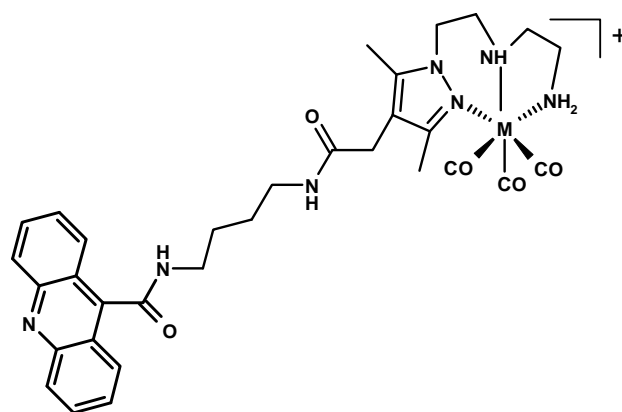
L4



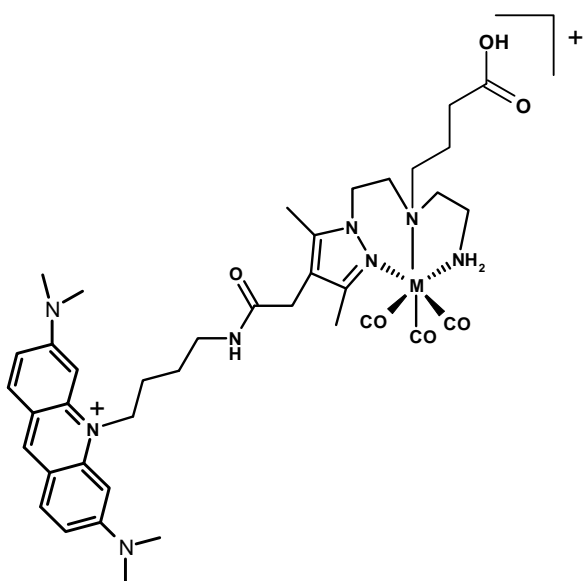
L5



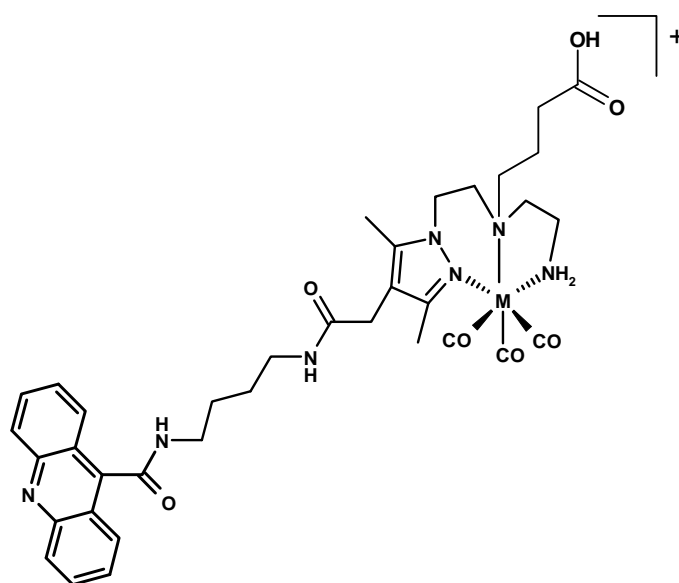
M = Re (Re1), ^{99m}Tc (Tc1)



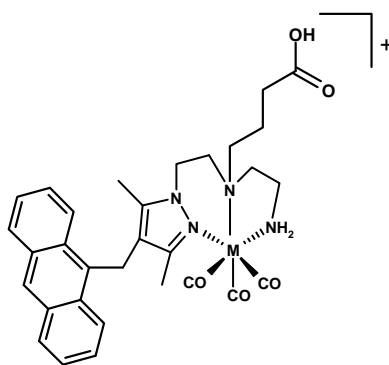
M = Re (Re2), ^{99m}Tc (Tc2)



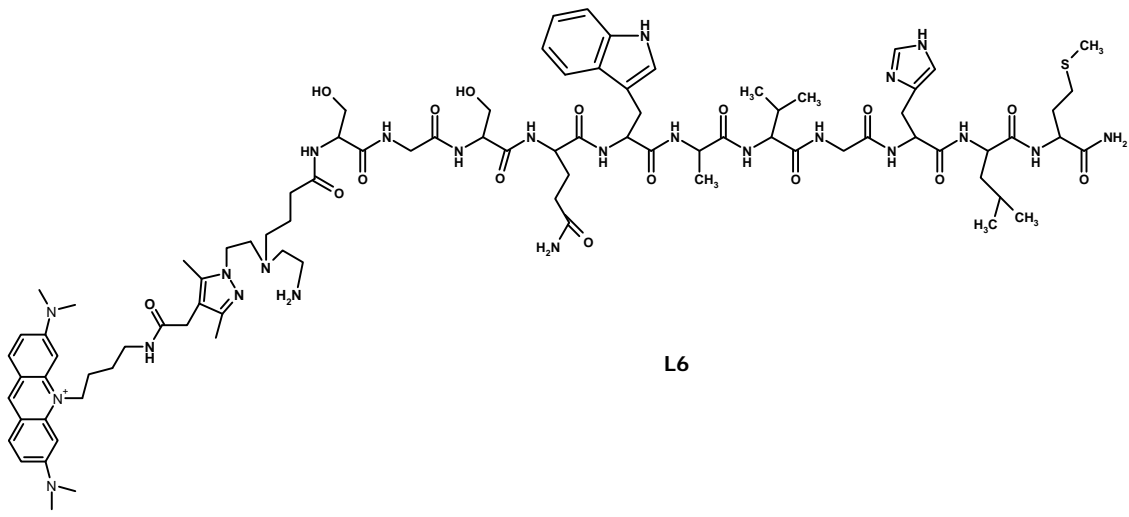
M = Re (Re3), ^{99m}Tc (Tc3)



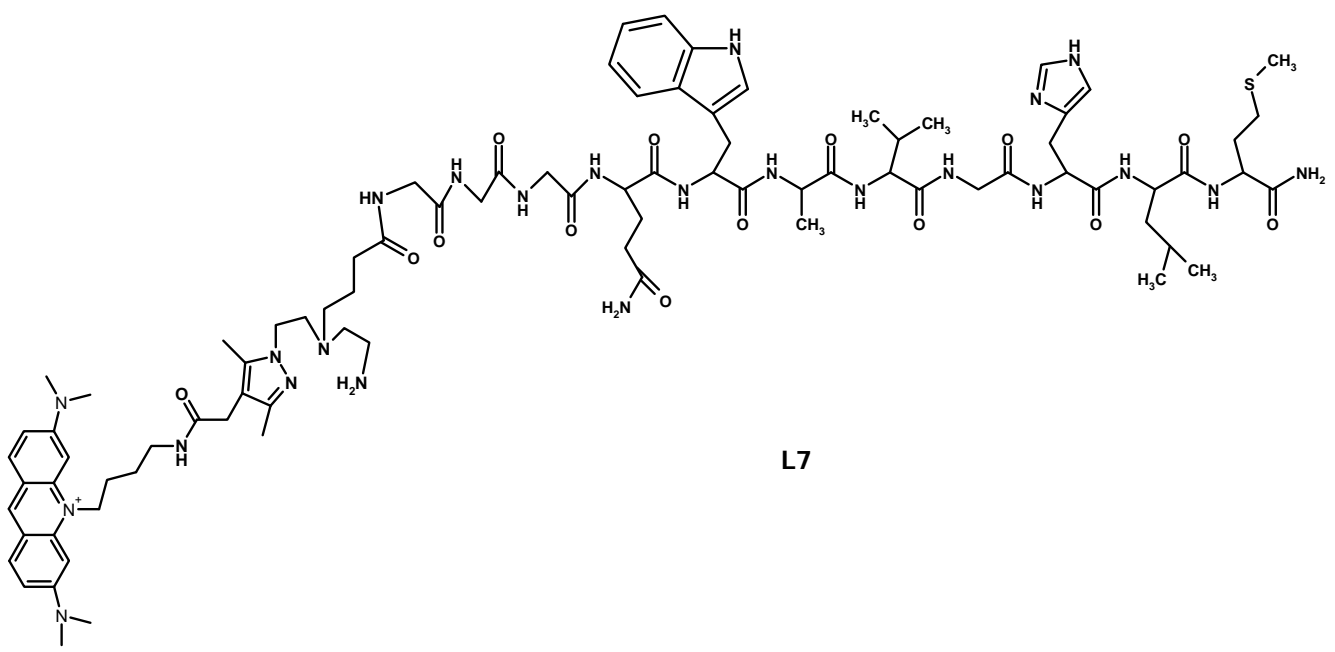
M = Re (Re4)



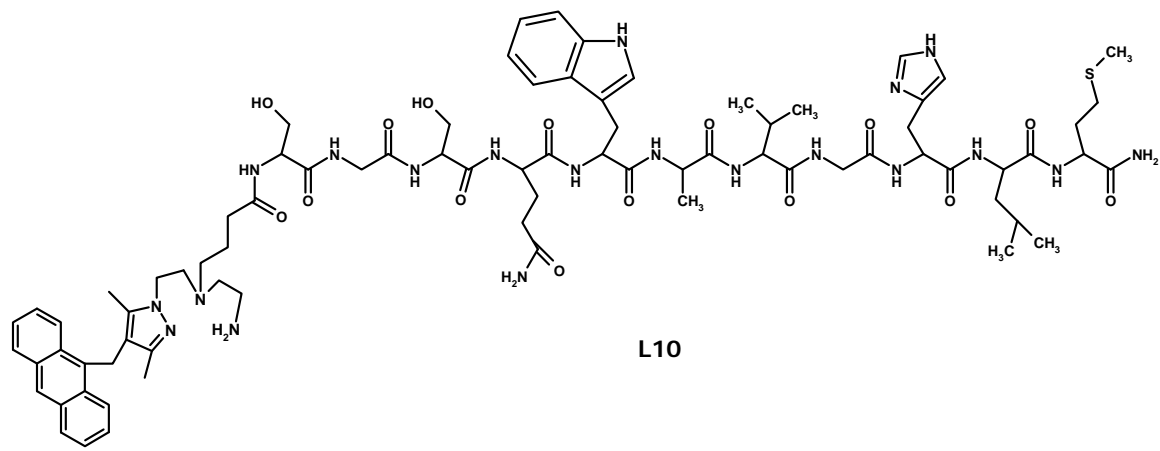
M = Re (Re5), ^{99m}Tc (Tc5)



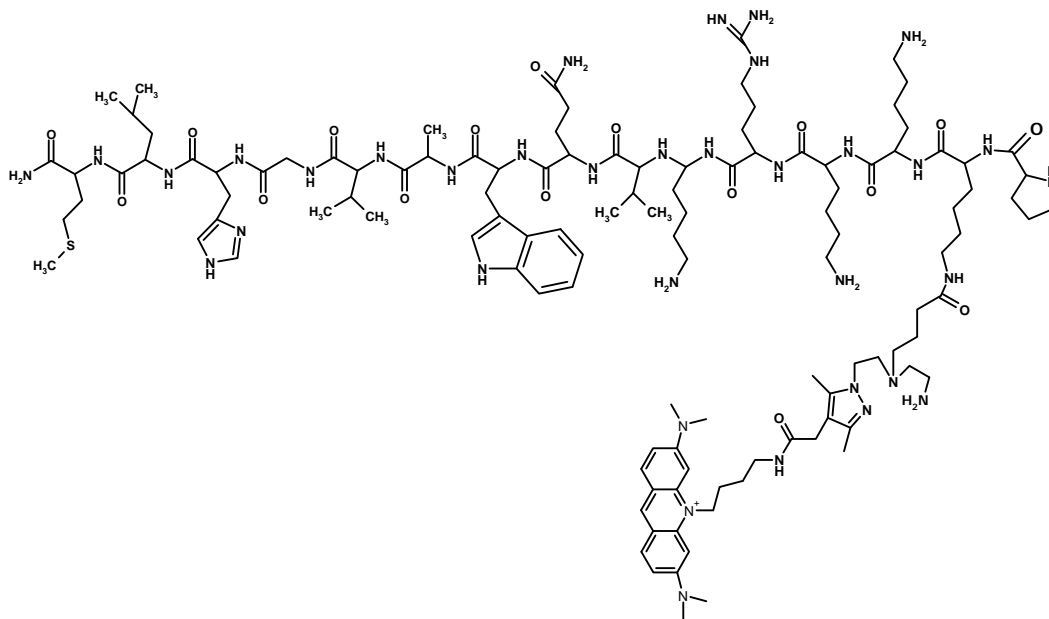
L6



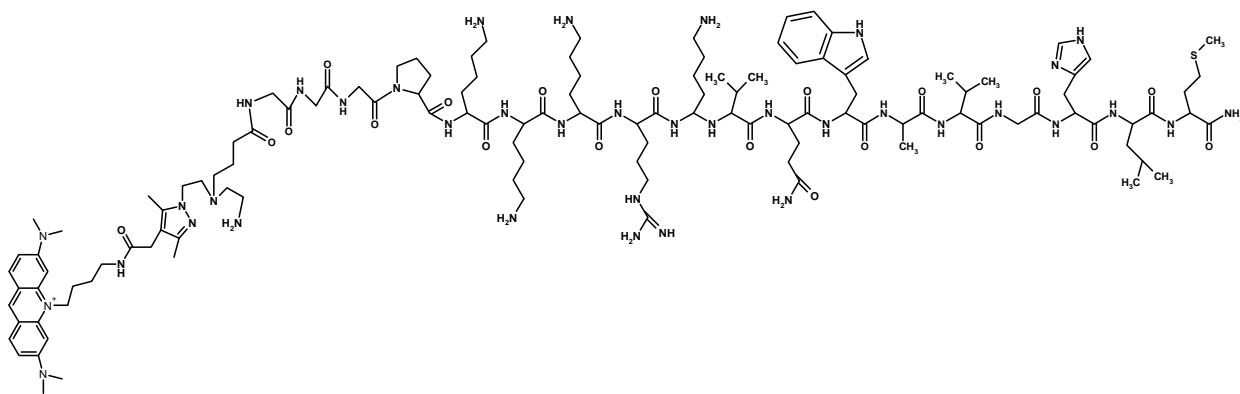
L7



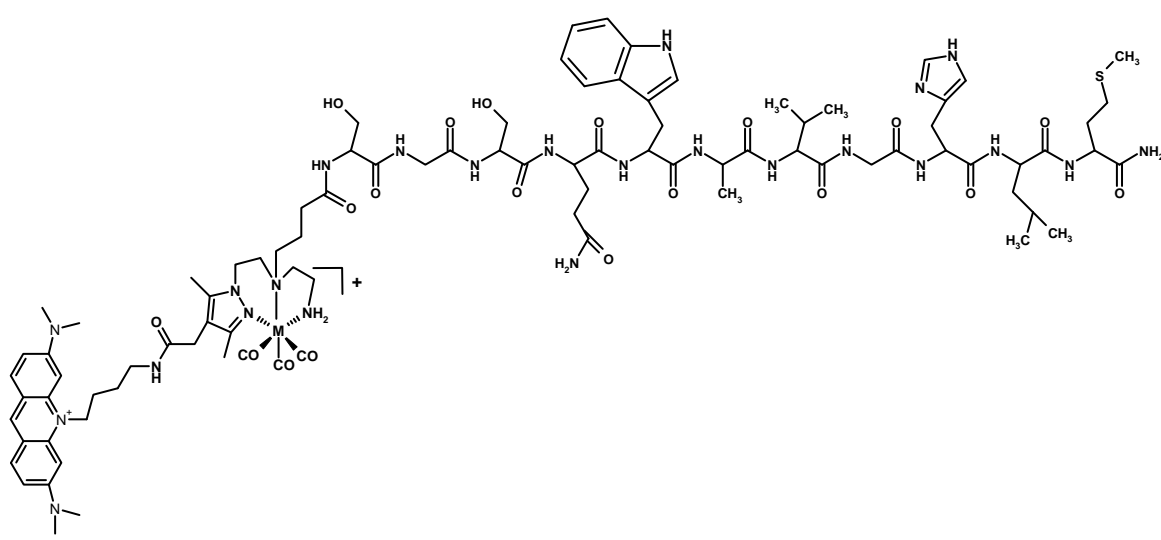
L10



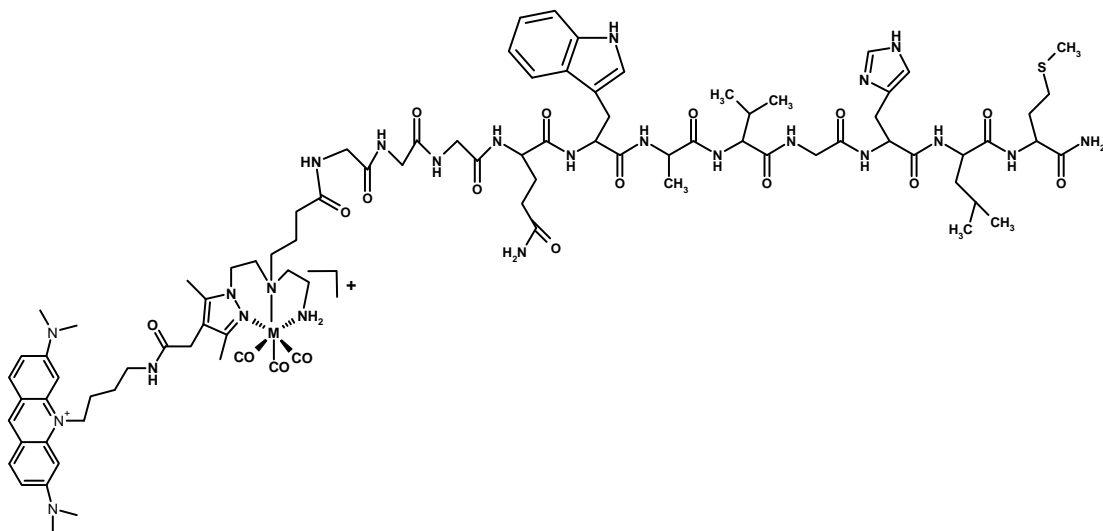
L11



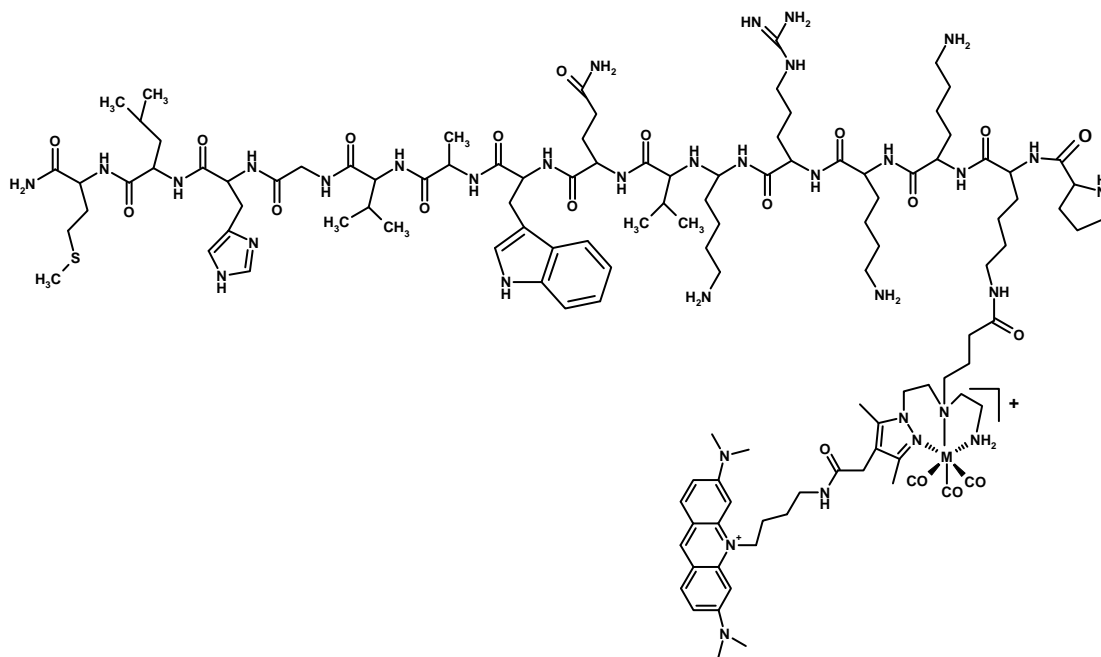
L12



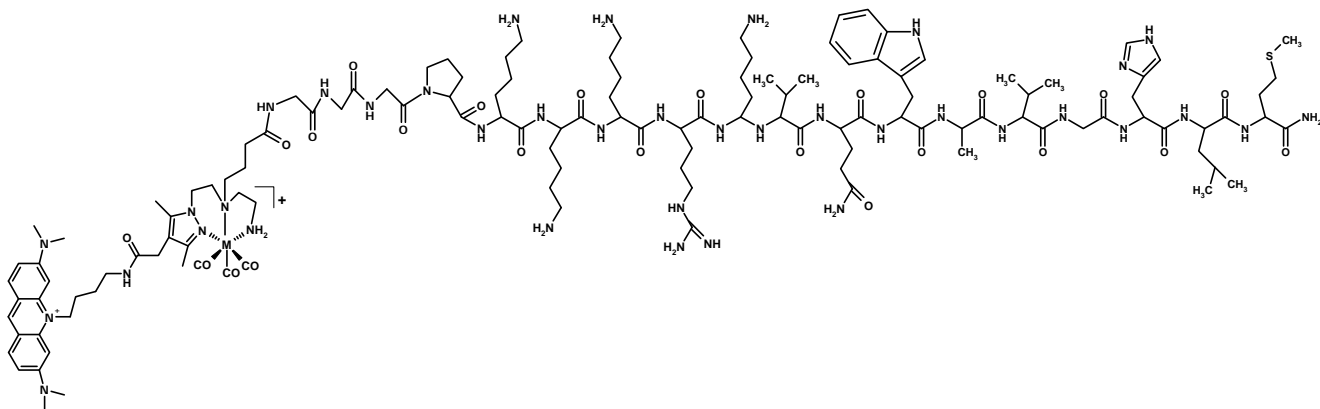
M = Re (Re6), ^{99m}Tc (Tc6)



$M = \text{Re (Re7)}, {}^{99\text{m}}\text{Tc (Tc7)}$



$M = \text{Re (Re11)}, {}^{99\text{m}}\text{Tc (Tc11)}$



M = Re (Re12)

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Considerações Gerais

A medicina nuclear é um ramo da medicina que utiliza radiofármacos para a realização de exames de diagnóstico ou para terapia. Radiofármacos são compostos que possuem na sua constituição um elemento radioativo (radionuclídeo) sendo concebidos de forma a direccionar a radioactividade para órgãos ou tecidos alvo no paciente. Estes compostos são, na sua maioria, injectados intravenosamente e, dependendo das suas características, podem ser denominados de perfusão ou específicos. Um radiofármaco de perfusão fixa-se no órgão alvo devido às suas características físico-químicas tais como carga global, peso molecular, forma e lipofilia. Por outro lado, um radiofármaco específico tem na sua composição um vector biológico que determina a sua interacção com o órgão alvo (Fig. 1.1).¹⁻⁵

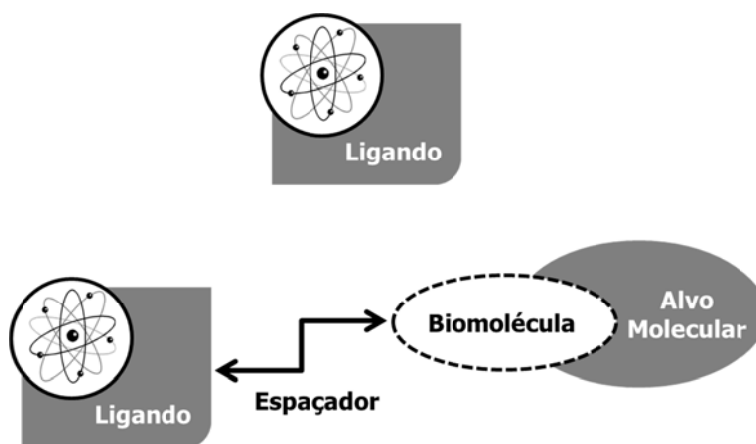


Figura 1.1: Representação esquemática de um radiofármaco contendo na sua composição um centro metálico: perfusão (em cima) e específico (em baixo).

Os radionuclídeos metálicos têm um elevado interesse no desenvolvimento de radiofármacos devido às suas propriedades nucleares tais como tipo de radiação emitida, tempo de semi-desintegração ($t_{1/2}$) e também por apresentarem, de um modo geral, uma química de coordenação variada. Na concepção de um radiofármaco específico contendo um radionuclídeo metálico é frequente aplicar-se a denominada aproximação bifuncional. Nesta aproximação o radionuclídeo é estabilizado por um ligando bifuncional (BFCA) que deverá permitir a sua

1. Introdução

ligação a um fragmento biologicamente activo (biomolécula, BM). Entre o ligando bifuncional e a BM pode existir uma cadeia espaçadora de natureza variada, que contribui para modelar a farmacocinética do radiofármaco e para afastar o fragmento metálico da BM, evitando que ela perca especificidade para o alvo molecular.³ A BM tem como função direccionar o radionuclídeo para o alvo molecular. As BM podem ser anticorpos (AC) monoclonais, fragmentos de AC, péptidos ou pequenas moléculas.

A escolha do BFCA é determinada pela natureza e estado de oxidação do metal radioactivo. Para além disso, o BFCA pode muitas vezes ser modificado com grupos funcionais, contribuindo também para modelar a farmacocinética do complexo final. Os radiofármacos específicos devem apresentar uma elevada actividade específica, bem como elevada afinidade e especificidade para o alvo. Estas características são essenciais para que com eles se possam visualizar alvos moleculares que normalmente são expressos e/ou sobreexpressos em concentração muito baixa.³

A escolha do radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco depende da aplicação a que se destina, isto é, diagnóstico ou terapia. Para cada uma destas aplicações o $t_{1/2}$ e energia das partículas e/ou radiação electromagnética emitidas, assim como a disponibilidade e custo do radionuclídeo são parâmetros importantes.^{3,6}

Os radiofármacos com aplicação em diagnóstico clínico são compostos que têm na sua composição radionuclídeos emissores de radiação gama (γ), sendo utilizados em tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), ou radionuclídeos emissores de positrões (β^+) e são neste caso utilizados em tomografia de emissão de positrão (PET). Para terapia os radiofármacos podem ter na sua constituição emissores beta (β), alfa (α) ou de electrões (e^-) Auger.⁷

Na tabela 1.1 apresentam-se alguns dos isótopos que entram na composição de radiofármacos em utilização clínica. Apresentam-se também outros radionuclídeos com potencial para diagnóstico ou para terapia, com os quais decorrem vários estudos de investigação.

Tabela 1.1: Isótopos em utilização clínica ou com potencial para aplicação em medicina nuclear.⁷⁻¹¹

Isótopo	$t_{1/2}$	Tipo de Emissão	Aplicação
^{99m} Tc*	6,0 h	γ , 4 e ⁻ Auger	SPECT
¹⁸⁶ Re	3,8 d	β	Terapia
¹⁸⁸ Re	17 h	β	Terapia
¹²³ I*	13,2 h	γ , 15 e ⁻ Auger	SPECT
¹³¹ I	8,0 d	β	Terapia
¹⁸ F	1,8 h	β^+	PET
¹¹ C	20,3 min	β^+	PET
⁸⁶ Y	14,7 h	β^+	PET
⁹⁰ Y	64,1 h	β	Terapia
¹¹¹ In*	2,8 d	γ , 14 e ⁻ Auger	SPECT
⁶⁷ Ga*	3,2 d	γ , 5 e ⁻ Auger	SPECT
⁶⁸ Ga	68,1 min	β^+	PET
⁶⁴ Cu	12,7 h	β^+ , β , γ	PET
⁶⁷ Cu	61,9 h	β	Terapia
¹⁵³ Sm	46,8 d	β	Terapia
¹⁶⁶ Ho	26,8 d	β	Terapia
¹⁷⁷ Lu	6,7 d	β	Terapia

*Emissores Auger com potencial interessa em terapia.

No caso concreto da terapia, até ao momento, só estão a ser utilizados em clínica radiofármacos que têm na sua constituição radionuclídeos que emitem radiação β . O efeito desta radiação sobre os tecidos ou órgãos alvo promove a destruição das células tumorais. A captação do radiofármaco no órgão alvo deve ser selectiva, de modo a minimizar os efeitos secundários. A escolha do emissor β vai depender da energia das partículas emitidas, das dimensões do tumor, da distribuição intratumoral e da farmacocinética do radiofármaco.¹²

No que respeita à utilização para terapia dos emissores α ou Auger, indicados na tabela 1.1, decorre uma intensa investigação no sentido de sintetizar e avaliar biologicamente compostos com radionuclídeos emissores destas partículas. As partículas α , β e e⁻ Auger têm percursos variáveis nas células (Fig. 1.2), que dependem da sua carga, massa e energia.

1. Introdução

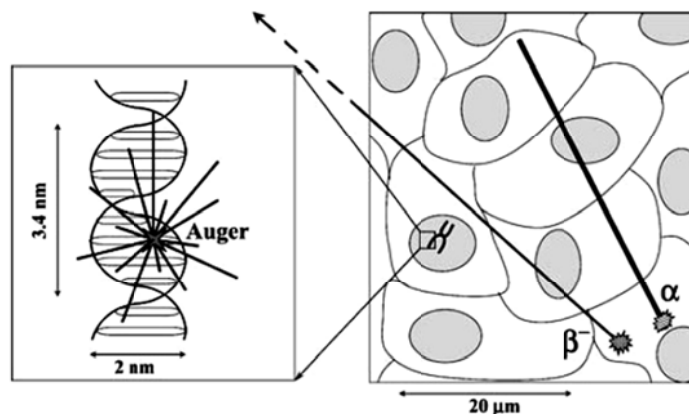


Figura 1.2: Representação esquemática do percurso das partículas α , β e e^- Auger no meio celular e subcelular.¹¹

A LET¹ das partículas β é baixa e, dependendo da sua energia, podem percorrer alguns milímetros nos tecidos alvo. Por seu lado, a LET das partículas α e dos e^- Auger é elevada, pelo que o seu percurso é muito mais curto do que o das partículas β . O percurso das partículas α tem uma ordem de grandeza equivalente a várias células, enquanto o percurso dos e^- Auger tem uma ordem de grandeza que é inferior às dimensões do núcleo da célula.⁸ Desta forma, os radionuclídeos emissores de partículas β são mais eficientes no tratamento de massas tumorais com alguma dimensão, enquanto os emissores α ou Auger seriam mais indicados para o tratamento de pequenos aglomerados tumorais.^{13,14}

No caso concreto dos e^- Auger, o seu curto alcance torna necessário que o radionuclídeo esteja muito próximo do alvo terapêutico que, em última instância, é o ADN. Assim, para que este tipo de terapia possa ter sucesso, é necessário encontrar compostos com emissores Auger que sejam capazes de chegar ao núcleo das células, e que se localizem próximos ou incorporados no ADN. As lesões que podem ser induzidas no ADN por esta radiação ionizante são as seguintes: quebra de uma única hélice do ADN (*ssb*, *single strand break*), quebra das duas hélices do ADN (*dsb*, *double strand break*) ou danificação das bases

¹ O termo transferência linear de energia (LET) descreve a transferência de energia da partícula (keV) ao longo do seu percurso (μm).

nucleotídicas. As dsb são as lesões com menor probabilidade de reparação e podem ocorrer pela ionização directa do ADN (efeito directo) ou pela interacção com radicais livres formados a partir das moléculas de água que se difundem no meio.^{8,12,15} Os radicais formados podem difundir-se livremente no espaço intracelular e causar danos adicionais.^{11,16} Apesar das dificuldades inerentes a este tipo de terapia a possível utilização de compostos com emissores Auger tem-se revelado apelativa devido à possibilidade de se virem a utilizar compostos com toxicidade selectiva para as células que incorporam no seu núcleo o radiofármaco e baixa toxicidade nos órgãos não alvo.¹⁷

O ^{125}I , o ^{123}I e o ^{111}In são emissores Auger (tabela 1.1) que se têm revelado interessantes para aplicação em terapia, uma vez que o número de e^- Auger e a energia da radiação que por eles é emitida é significativa. Para isótopos como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ esta componente corresponde a menos de 1% da energia do processo de decaimento.¹¹

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é o isótopo com maior aplicação em medicina nuclear sendo utilizado em cerca de 85% dos exames de diagnóstico (SPECT), devido às suas propriedades nucleares ($t_{1/2} = 6,0$ h, $\gamma = 140$ keV), elevada disponibilidade, baixo custo e química variada.^{7,18} O período de semi-desintegração de 6 horas é suficientemente longo para permitir a síntese dos radiofármacos, administração no paciente e aquisição de imagem, sendo suficientemente curto para minimizar a dose de radiação fornecida ao paciente. A emissão de radiação γ com uma energia de 140 keV é adequada para detecção pelas câmaras gama localizadas nos centros hospitalares.

Para além do seu reconhecido potencial em exames de diagnóstico, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ também tem sido visto como um radionuclídeo com potencial para aplicação em terapia devido à emissão de 4 e^- Auger por decaimento, com uma energia total correspondente a 960 eV.¹⁹

1. Introdução

1.2. Emissores Auger com Potencial Interesse para Terapia

Como referido anteriormente, o $^{125/123}\text{I}$ e o ^{111}In têm sido estudados como emissores de e^- Auger.

O nucleósido iododeoxiuridina foi marcado com ^{125}I (^{125}I -UdR, Fig. 1.3) e o composto radioactivo foi incubado com células do ovário de hamster tendo-se verificado uma diminuição da sobrevivência das mesmas.²⁰ Resultados semelhantes foram obtidos para o mesmo composto marcado com ^{123}I (^{123}I -UdR). Nestes estudos foi também avaliado o efeito dos e^- Auger ao nível do ADN mitocondrial tendo sido verificado que a radiotoxicidade do composto ^{125}I -UdR era primariamente causada por danos no ADN nuclear e não no ADN mitocondrial, uma vez que o composto se localizava predominantemente no ADN nuclear.²⁰

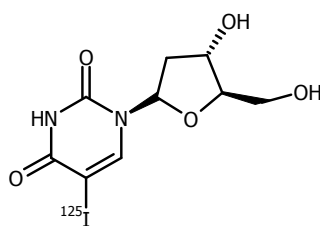


Figura 1.3: Iododeoxiuridina marcada com ^{125}I (^{125}I -UdR).²⁰

Estudos efectuados com o intercalador daunorubicina (Fig. 1.4) marcado com ^{125}I ($t_{1/2} = 60,1$ d; $21 e^-$ Auger) revelaram que este composto se localizava no núcleo das células do adenocarcinoma humano da mama (SK-BR-3) sendo mais tóxico do que o respectivo composto inactivo.²¹ Também se demonstrou que um outro intercalador do tipo aminoacridina (N-(3-(acridina-9-ilamino)-propil)-3-iodobenzamida) marcado com ^{125}I se ligava ao ADN plasmídeo pBR322, provocando cerca de 1-1,4 dsb por decaimento.²²

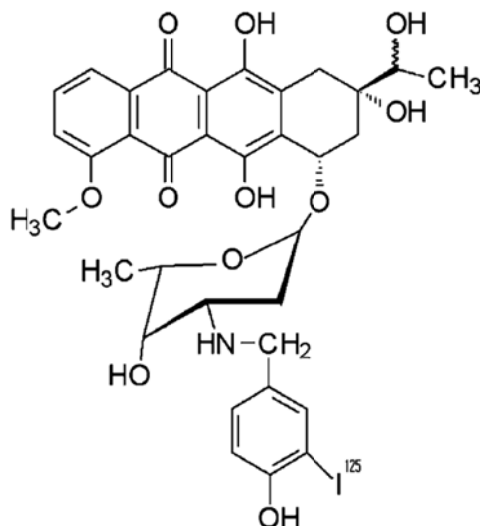


Figura 1.4: Daunorubicina marcada com ^{125}I .²¹

Balagurumoonthy e colaboradores efectuaram um estudo comparativo entre os radionuclídeos ^{125}I e ^{123}I .²³ Estes autores incubaram amostras de ADN plasmídeo puc19 com concentrações radioactivas crescentes de uma molécula marcada com ^{123}I e avaliaram a indução de quebras no ADN. A molécula escolhida foi Hoechst 33342 que é reconhecida pela sua forte interacção com o ADN. Os autores verificaram que a conversão da forma enrolada (FE) do ADN na forma linear (FL), por indução de duplas quebras na macromolécula, aumentava com o número de decaimentos do ^{123}I . Estes autores concluíram ainda que o ^{125}I , quando incorporado na mesma molécula, conseguia ser três vezes mais eficiente na indução de duplas quebras no ADN plasmídeo do que o ^{123}I .²³

Contudo, os processos de desiodação *in vivo* a que os complexos de iodo se encontram expostos, e o elevado tempo de semi-desintegração do ^{125}I (60,1 d) apresentam-se como desvantagens com vista a uma possível aplicação terapêutica.⁶ Por estas razões, tornou-se necessário explorar outros emissores Auger que se apresentassem como mais adequados, entre os quais o ^{111}In ($t_{1/2} = 2,8$ d) e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6,0$ h).

1. Introdução

Vários estudos mostraram uma elevada morte celular com os AC anti-CD74 ou anti-CD20 marcados com ^{111}In .^{24,25} Foi então adoptada uma estratégia para direccionar AC marcados com emissores Auger ao núcleo de células tumorais.²⁶ Para tal, Chen e colaboradores modificaram um AC monoclonal com uma sequência peptídica de localização nuclear (NLS, Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val) e marcaram o conjugado resultante com ^{111}In . Neste trabalho, os autores escolheram o ácido dietilenotriaminopenta acético (DTPA) para estabilização do ião metálico. Estudos com o composto radioactivo, em células tumorais de leucemia mielóide aguda (HL-60), revelaram que o composto se localizava no núcleo das células parecendo ser esta uma boa abordagem para o desenvolvimento de compostos para o tratamento desta patologia.²⁶

Bailey e colaboradores demonstraram também que a eficácia do composto ^{111}In -DTPA-hEGF (em que: hEGF = factor de crescimento epidérmico humano), actualmente em avaliação clínica, dependia da sua internalização e localização nuclear, fundamental para a acção terapêutica dos e^- Auger emitidos pelo ^{111}In .²⁷ A utilização conjunta de ^{111}In -DTPA-hEGF com gefitinibe, utilizado no tratamento de tumores sólidos, levou ao aumento da localização nuclear do composto radioactivo e ao aumento dos danos provocados no ADN. Na figura 1.5 apresenta-se a viabilidade de células tratadas com ^{111}In -DTPA-hEGF, com DTPA-hEGF ou com a combinação de qualquer destes compostos com o citostático gefitinibe.²⁷

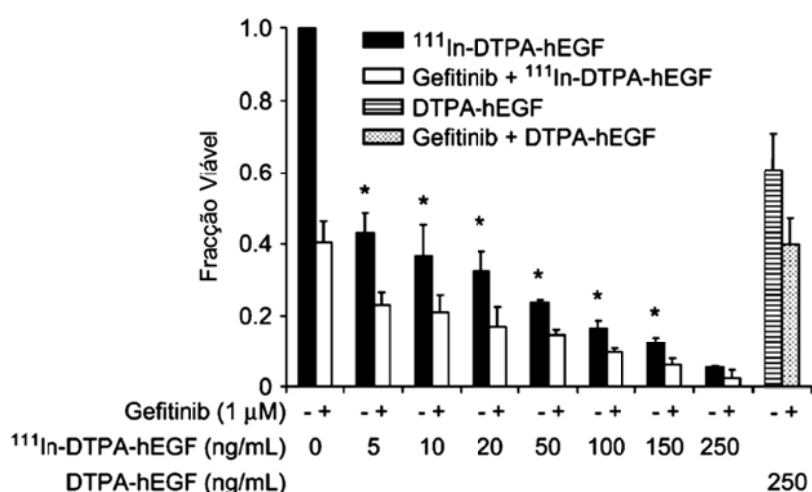


Figura 1.5: Citotoxicidade de ^{111}In -DTPA-hEGF na ausência (preto) ou presença (branco) de gefitinibe a 37°C em células MDA-MB-468.²⁷

O Octreoscan (^{111}In -DTPA-octreótido, Fig. 1.6 A) é um radiofármaco em aplicação clínica para a visualização de tumores neuroendócrinos.²⁸ Este composto tem na sua composição um péptido análogo da somatostatina (SST) que reconhece especificamente receptores sobreexpressos em tumores neuroendócrinos. Vários ensaios clínicos mostraram que este radiofármaco podia ter potencial terapêutico quando administrado de forma cumulativa e em doses superiores às normalmente utilizadas nos exames de diagnóstico. Este aspecto fazia-se sentir sobretudo na remissão ou no crescimento dos tumores.^{28,29}

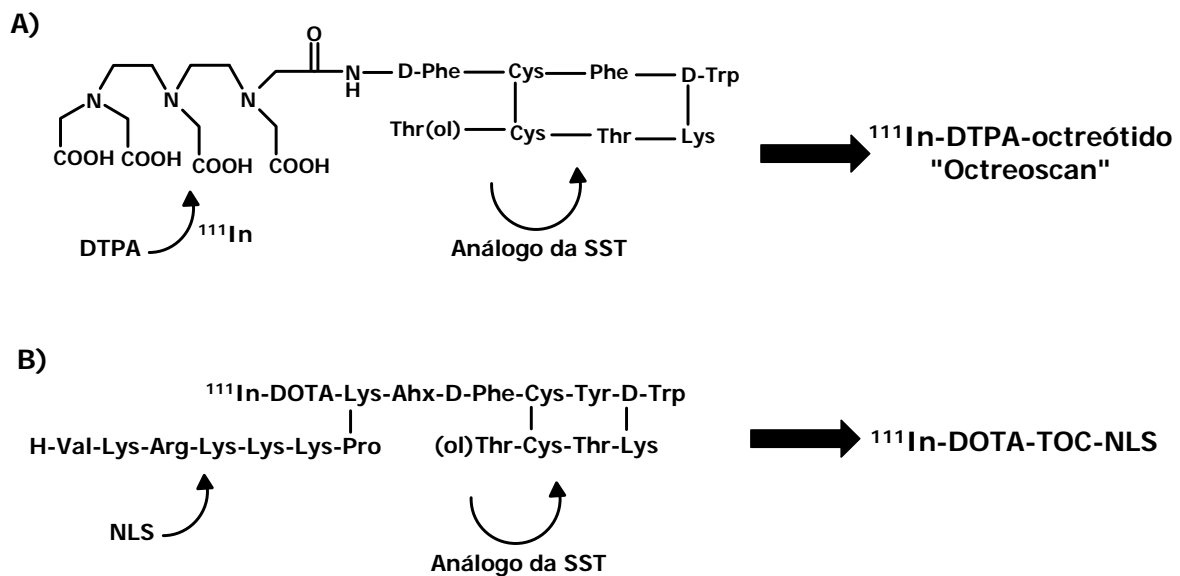


Figura 1.6: Estruturas de: Octreoscan (A) e ^{111}In -DOTA-TOC-NLS (B: análogo da SST ligado ao DOTA e a uma sequência NLS, marcado com ^{111}In).¹⁴

No sentido de poder avaliar o efeito terapêutico do ^{111}In , Maecke e colaboradores sintetizaram um composto contendo o macrociclo ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), um análogo da SST e uma sequência NLS (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val), marcando-o em seguida com ^{111}In (Fig. 1.6 B).¹⁴ O NLS introduzido neste composto tinha como objectivo potenciar a entrada do complexo metálico no núcleo de células tumorais, o que poderia tornar mais eficaz o efeito terapêutico dos e^- Auger emitidos pelo ^{111}In . De facto, o complexo representado na figura 1.6 B face ao ^{111}In -DOTA-TOC, que não possui a sequência NLS, apresentou uma retenção celular, em células de rato AR4-2J de tumor do pâncreas, 6

1. Introdução

vezes superior e uma acumulação no núcleo das mesmas 45 vezes superior. Estes resultados confirmaram que a introdução de uma sequência NLS favorecia a internalização e retenção do emissor Auger no núcleo das células de tumores neuroendócrinos.

No caso concreto do ^{99m}Tc só recentemente se iniciaram estudos com vista à sua possível aplicação terapêutica. Schipper e colaboradores demonstraram o potencial terapêutico do $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$, pela primeira vez *in vivo*, em ratos atômicos com tumores neuroendócrinos que expressavam o sistema simporte Na^+/I^- (NIS).³⁰ A utilização de $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ promoveu a diminuição do volume dos tumores neuroendócrinos, enquanto os tumores controlo mantiveram a sua taxa de crescimento. Os autores verificaram, no entanto, que existia uma elevada toxicidade nos tecidos normais. Por esta razão, mesmo tendo sido observado *in vivo* um efeito terapêutico do emissor Auger ^{99m}Tc , a dose absorvida pelos tumores relativamente aos tecidos normais necessitava ser melhorada, por forma a minimizar a toxicidade nos tecidos não alvo.³⁰

Como foi referido, para aproveitar o efeito terapêutico de compostos contendo emissores Auger, estes deverão acumular-se no núcleo das células tumorais e, se possível, interagir com o ADN. Para atingir estes objectivos têm sido utilizadas estruturas intercaladoras (pireno, acridina, antraceno) com reconhecida afinidade para o ADN, e/ou sequências peptídicas NLS com reconhecida capacidade para translocar substâncias do citoplasma para o núcleo das células.

No caso concreto de complexos de ^{99m}Tc , para aumentar a acumulação no núcleo das células e a interacção com o ADN, Alberto e colaboradores sintetizaram um complexo com a unidade $\text{fac}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$) estabilizada por uma triamina ligada a uma sequência NLS (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Gly-Gly) e a uma unidade intercaladora do ADN (pireno) (Fig. 1.7).³¹ Estudos com células B16-F1 mostraram que o composto radioactivo se localizava no núcleo das células e que provocava um efeito radiotóxico mais forte do que complexos análogos que não possuíam a sequência NLS.³¹ Estes estudos confirmaram a necessidade da localização

do radionuclídeo no núcleo das células e de uma estreita proximidade ao ADN. Contudo, em estudos com células, estes investigadores verificaram que a actividade a utilizar tinha que ser relativamente elevada para que os complexos tivessem efeito radiotóxico.

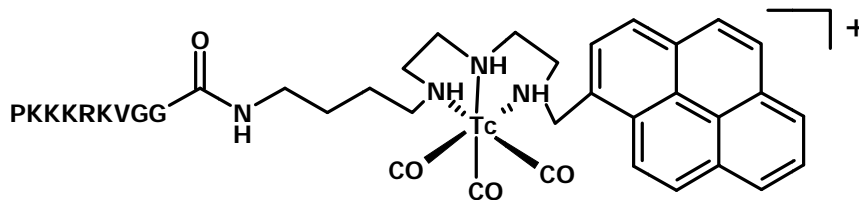


Figura 1.7: Complexo contendo o emissor Auger ^{99m}Tc , uma unidade intercaladora (pireno) e uma sequência NLS (PKKKRKVGG: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Gly-Gly).³¹

Para compreender qual o mecanismo envolvido na morte celular, Alberto e colaboradores estudaram a interacção do ADN plasmídico ΦX174 com um composto análogo ao indicado na figura 1.7 mas sem a sequência NLS. Os investigadores observaram que o ADN na forma superenrolada (FSE) se convertia na forma circular (FC, ssb), e que aparecia uma nova banda correspondente à forma linear (FL), devido à indução de dsb no ADN plasmídico (Fig. 1.8).³²

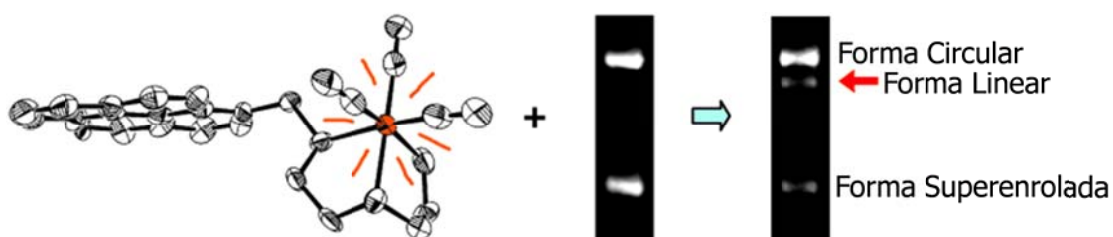


Figura 1.8: Electroforese de ΦX174 (100 ng) em tampão TRIS (50 mM, pH 7,4, 50 μL) após 24 horas de incubação com o complexo de ^{99m}Tc representado (15 MBq).³²

Posteriormente, Vitor e colaboradores sintetizaram complexos tricarbonilo de rênio (I) e ^{99m}Tc (I) contendo um derivado do antraceno como unidade intercaladora (Fig. 1.9 a).^{33,34} Estudos com células B16-F1 mostraram uma rápida internalização nas células e uma morte significativa das mesmas. Os investigadores verificaram que a morte celular era por apoptose.

1. Introdução

Esta conclusão baseou-se em estudos de *western blot* do lisado de células B16-F1, após incubação com o complexo de ^{99m}Tc (I) (Fig. 1.9 b). Com efeito, estes estudos mostraram que tinha lugar a clivagem da proteína PARP, processo indicativo de morte celular por apoptose.³³

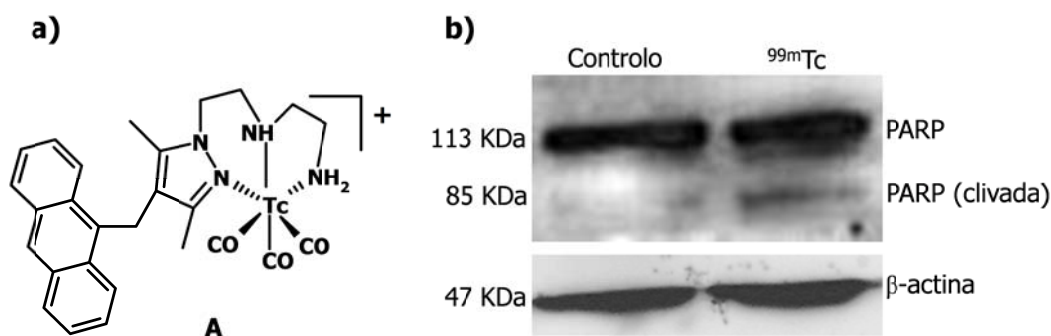


Figura 1.9: A: Complexo contendo o emissor Auger ^{99m}Tc e uma unidade intercaladora (antraceno). B: Indução de apoptose em células B16-F1.³³

A necessidade de actividades elevadas para obtenção de efeito terapêutico *in vivo* pode ser o maior obstáculo à aplicação do ^{99m}Tc numa terapia direccionada ao ADN. No entanto, a utilização de vectores biológicos que propiciem uma fixação selectiva do composto nos tecidos alvo poderá contribuir para minimizar os danos em tecidos não alvo. Com este objectivo, Alberto e colaboradores desenvolveram complexos de rénio e ^{99m}Tc que tinham uma unidade intercaladora do ADN e um péptido análogo da bombesina (BBN[8-14]) que deveria conferir especificidade aos complexos (Fig. 1.10 A).³⁵

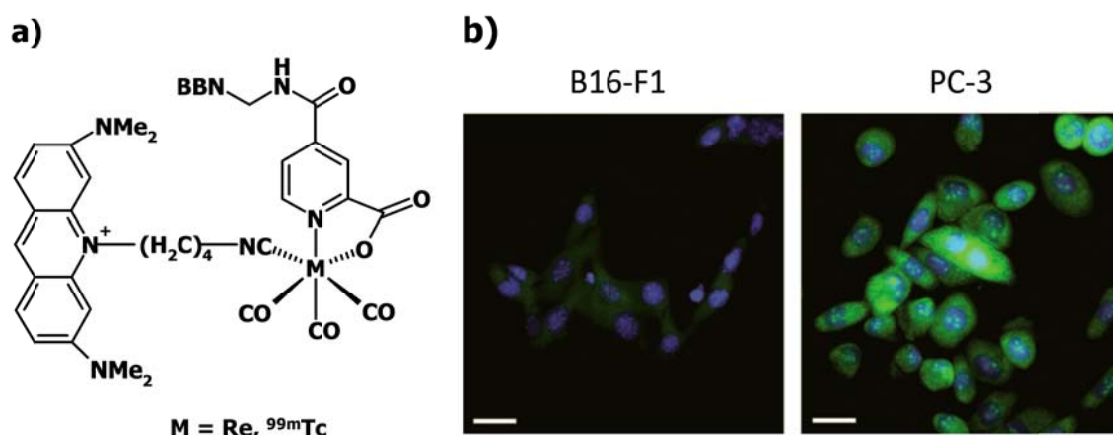


Figura 1.10: a) Complexos contendo a unidade *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$), uma unidade intercaladora (alaranjado de acridina) e um análogo da bombesina (BBN[8-14]). b) Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células B16-F1 e PC-3 incubadas com o complexo representado quando $\text{M} = \text{Re}$.³⁵

Os autores verificaram que o complexo de rênio (I) era internalizado pelas células PC-3 que expressam receptores que reconhecem o péptido BBN. No entanto, o complexo permanecia no citoplasma não entrando no núcleo das células como demonstraram as imagens de microscopia confocal obtidas com o complexo de rênio (I) (Fig. 1.10 B).³⁵

Um desafio importante a ser ultrapassado para uma possível aplicação terapêutica de complexos de ^{99m}Tc , prende-se com a sua acumulação apenas nas células tumorais.²² Tendo isto em conta, um radiofármaco com um emissor Auger que consiga alvejar populações de células de uma forma específica e uniforme poderá ser um agente eficiente no panorama da terapia oncológica, principalmente para a terapia de metástases.

Com o objectivo de poder contribuir para esta área de investigação, o Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN tem vindo a sintetizar e a analisar o comportamento biológico de complexos organometálicos de rênio (I) e ^{99m}Tc (I).^{36,37} Concretamente, o grupo sintetizou ligandos tridentados do tipo pirazolo-diamina funcionalizados com unidades

1. Introdução

intercaladoras, derivadas do antraceno, na posição 4 do anel de pirazolo ou na amina primária da unidade pirazolo-diamina. Com estes ligandos sintetizou complexos tricarbonilo de rênio (I) e ^{99m}Tc (I) e avaliou a sua interação com ADN e com células B16-F1, respectivamente.^{33,34} Os resultados obtidos foram extremamente interessantes pois mostraram que alguns dos complexos sintetizados conseguiam chegar ao núcleo de células tumorais e que a viabilidade das mesmas era comprometida pelo efeito dos e^- Auger emitidos pelos complexos tricarbonilo de ^{99m}Tc (I).³³

A introdução de especificidade nestes complexos de rênio e de ^{99m}Tc era o passo seguinte e constituiu o objectivo fundamental do trabalho apresentado nesta tese. Procurou-se ainda utilizar unidades intercaladoras e fluorescentes consideradas mais potentes do que as anteriormente estudadas, para poder potenciar a intercalação e ao mesmo tempo aproveitar as suas propriedades fluorescentes, utilizando os respectivos complexos de rênio (I) como sondas histoquímicas. Estas sondas permitem utilizar a microscopia de fluorescência para seguir *in vitro* a captação e localização subcelular dos compostos em estudo, completando a informação que pode ser obtida *in vivo* com os complexos análogos de ^{99m}Tc .

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I)

Contendo Unidades Intercaladoras:

Síntese, Caracterização e Estudos de

Interacção com ADN

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Como já foi referido, o trabalho apresentado nesta tese visava essencialmente explorar a química de rénio (I) e tecnécio (I) para uma possível utilização dos e^- Auger emitidos pelo ^{99m}Tc (I) em terapia dirigida. Neste capítulo começaremos por apresentar, de um modo breve, alguns aspectos da química destes dois elementos com relevância para aplicação em medicina nuclear. Em seguida, apresentam-se os novos ligandos e complexos de rénio (I) sintetizados, bem como estudos de interação de alguns desses complexos com o ADN, utilizando várias técnicas espectroscópicas.

2.1. Química de Rénio (I) e de Tecnécio (I) Relevante para Aplicação Médica

Os compostos de ^{99m}Tc não têm massa suficiente para permitir fazer a sua caracterização química, pelo que a mesma exige que se preparem compostos análogos de ^{99}Tc ou de rénio. Uma vez que o ^{99}Tc é um emissor β , o rénio tornou-se no elemento de eleição para a caracterização de complexos de ^{99m}Tc . Por pertencerem ao mesmo grupo da tabela periódica, e devido à contracção dos lantanídeos, o rénio e o tecnécio, apresentam algumas propriedades semelhantes, e os respectivos complexos são normalmente isoestruturais. Assim, o desenvolvimento de novos complexos de ^{99m}Tc é precedido, em geral, pela síntese dos complexos congéneres de rénio.³⁸ No entanto, é necessário ter em atenção que tal só pode ser feito desde que as reacções químicas que têm lugar não envolvam processos de oxidação-redução, uma vez que os complexos de rénio se oxidam mais facilmente do que os de tecnécio. Assim, sempre que não estão envolvidas reacções redox, constitui uma prática corrente, nas ciências radiofarmacêuticas, preparar complexos de rénio e caracterizá-los pelas técnicas habituais em química inorgânica (espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de infravermelho

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

(IV), espectrometria de massa (MS) e/ou difracção de raio-X de cristal único). O passo seguinte consiste em co-injectar os complexos de rénio e de ^{99m}Tc num sistema de HPLC e analisar os respectivos perfis cromatográficos, utilizando simultaneamente dois sistemas de detecção diferentes: UV-Visível para o rénio e gama (γ) para o ^{99m}Tc . Caso as duas espécies apresentem o mesmo tempo de retenção considera-se que o complexo de ^{99m}Tc tem estrutura análoga à do complexo de rénio.⁴

O ^{99m}Tc é obtido por eluição de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ que tira partido do equilíbrio transiente entre o ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66,0$ horas) e o ^{99m}Tc : a actividade do ^{99m}Tc vai aumentando à medida que o ^{99}Mo vai decaindo. A separação destes dois radionuclídeos é feita por eluição selectiva do $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ de uma coluna de alumina que contém $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^-$, utilizando como eluente uma solução estéril de NaCl a 0,9%. O ^{99m}Tc eluído do gerador não é "carrier-free" porque 13% do ^{99}Mo decai directamente para o isótopo ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,14 \times 10^5$ anos) logo, a actividade específica do $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ depende do tempo que decorre entre duas eluições consecutivas. Geralmente, a concentração de tecnécio no eluído do gerador é da ordem de 10^{-7} - 10^{-6} M.^{2,3}

O tecnécio no eluído do gerador encontra-se no estado de oxidação +7. O Tc (VII) pode ser reduzido a estados de oxidação mais baixos, nomeadamente a Tc (I), (III), (IV) e (V).^{1,2,39} No caso concreto do Tc (V), os compostos mais estudados contêm unidades do tipo $[\text{TcO}]^{3+}$, *trans*- $[\text{TcO}_2]^+$, Tc-HYNIC ou $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$. No caso do Tc (I) os complexos contêm a unidade *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Na figura 2.1 apresentam-se exemplos de estruturas possíveis para complexos de tecnécio em estados de oxidação diferentes e com as unidades metálicas atrás referidas.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

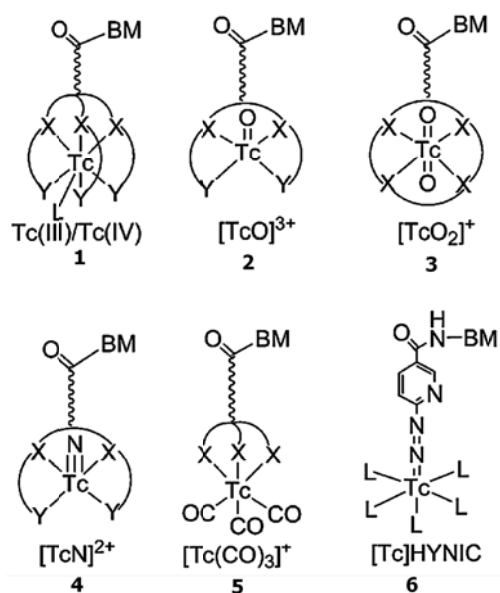


Figura 2.1: Exemplos de fragmentos metálicos mais estudados para a marcação de biomoléculas (BM) com tecnécio.^{3,40}

O Tc (I) tem uma configuração electrónica d^6 e a sua estabilização é conseguida preferencialmente por ligandos contendo como átomos doadores oxigénio, azoto ou enxofre. Utilizando como produto de partida o complexo $fac-[M(CO)_3(H_2O)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$) uma série de compostos tem sido preparada e caracterizada. As três moléculas de água presentes na esfera de coordenação são ligandos lábeis e podem ser prontamente substituídas por ligandos mono, bi ou tridentados nalguns casos derivatizados com grupos funcionais que permitem a ligação a determinadas BM (Fig. 2.1).⁴¹ A primeira síntese do complexo de Tc (I), $fac-[{}^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$, foi efectuada por redução directa do $[{}^{99m}TcO_4]^-$ com borohidreto de sódio em solução aquosa na presença de monóxido de carbono (Fig. 2.2).⁴¹ Posteriormente, a mesma síntese tornou-se possível por redução directa de $[{}^{99m}TcO_4]^-$ com boranocarbonato de potássio (Fig. 2.2).⁴²

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

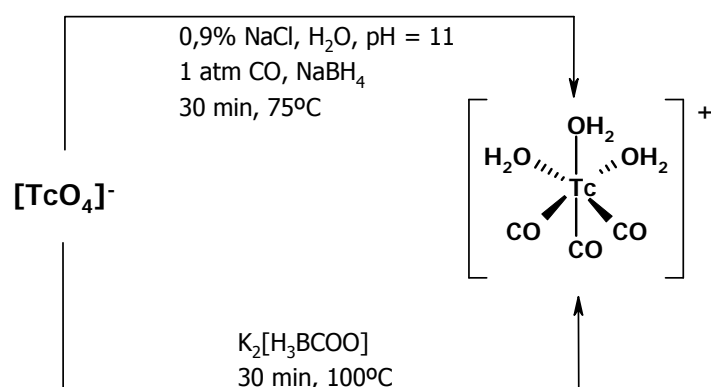


Figura 2.2: Síntese de *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a partir de $^{99m}\text{TcO}_4^-$.³⁹⁻⁴¹

Estudos posteriores indicaram que, para aplicações biológicas, agentes quelantes mono ou bidentados formavam frequentemente complexos de tricarbonilo de Tc (I) com reduzida estabilidade *in vitro* e *in vivo*. Este comportamento levava a que *in vivo* existisse uma forte ligação às proteínas e elevada actividade circulante na corrente sanguínea. Por outro lado, agentes quelantes tridentados originavam complexos com elevada estabilidade e rápida depuração da corrente sanguínea e dos principais órgãos não alvo.^{1,43-45} Foram vários os ligandos tridentados explorados na química do Tc (I). Como exemplo, na figura 2.3 encontram-se alguns dos que têm sido mais estudados.

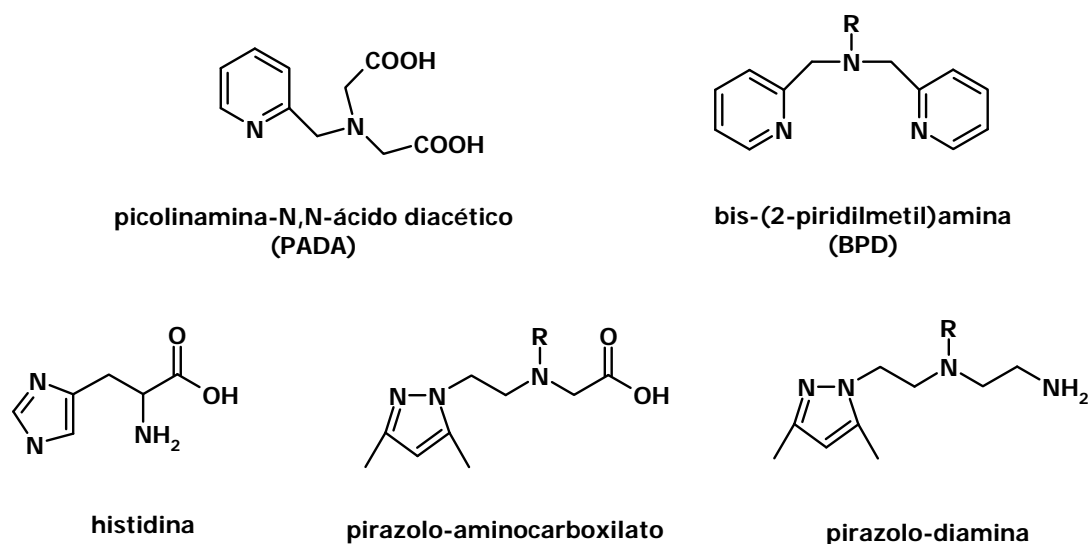
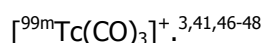


Figura 2.3: Exemplos de ligandos tridentados para estabilização do fragmento metálico *fac*-



2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

O Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN introduziu e tem estudado essencialmente ligandos tridentados do tipo pirazolo-diamina ou pirazolo-aminocarboxilato (Fig. 2.3).^{33,34,36,37,48} Estes têm-se mostrado versáteis podendo ser derivatizados na posição 4 do anel pirazolilo ou na amina central ou terminal da unidade pirazolo-diamina permitindo a ligação a unidades intercaladoras e/ou a biomoléculas peptídicas ou não peptídicas.^{34,36,49,50} Prosseguindo estes estudos, nesta tese sintetizámos ligandos pirazolo-diamina com um intercalador na posição 4 do anel pirazolilo e com péptidos biologicamente activos na amina central da unidade diamina (Fig. 2.4). Em seguida, preparámos e avaliámos biologicamente os complexos tricarbonylo de rénio (I) e ^{99m}Tc (I) estabilizados pelos ligandos pirazolo-diamina.

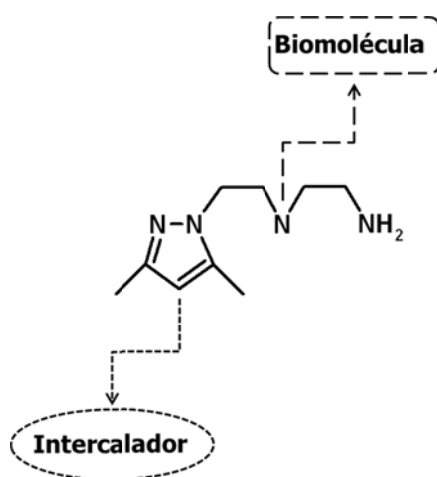


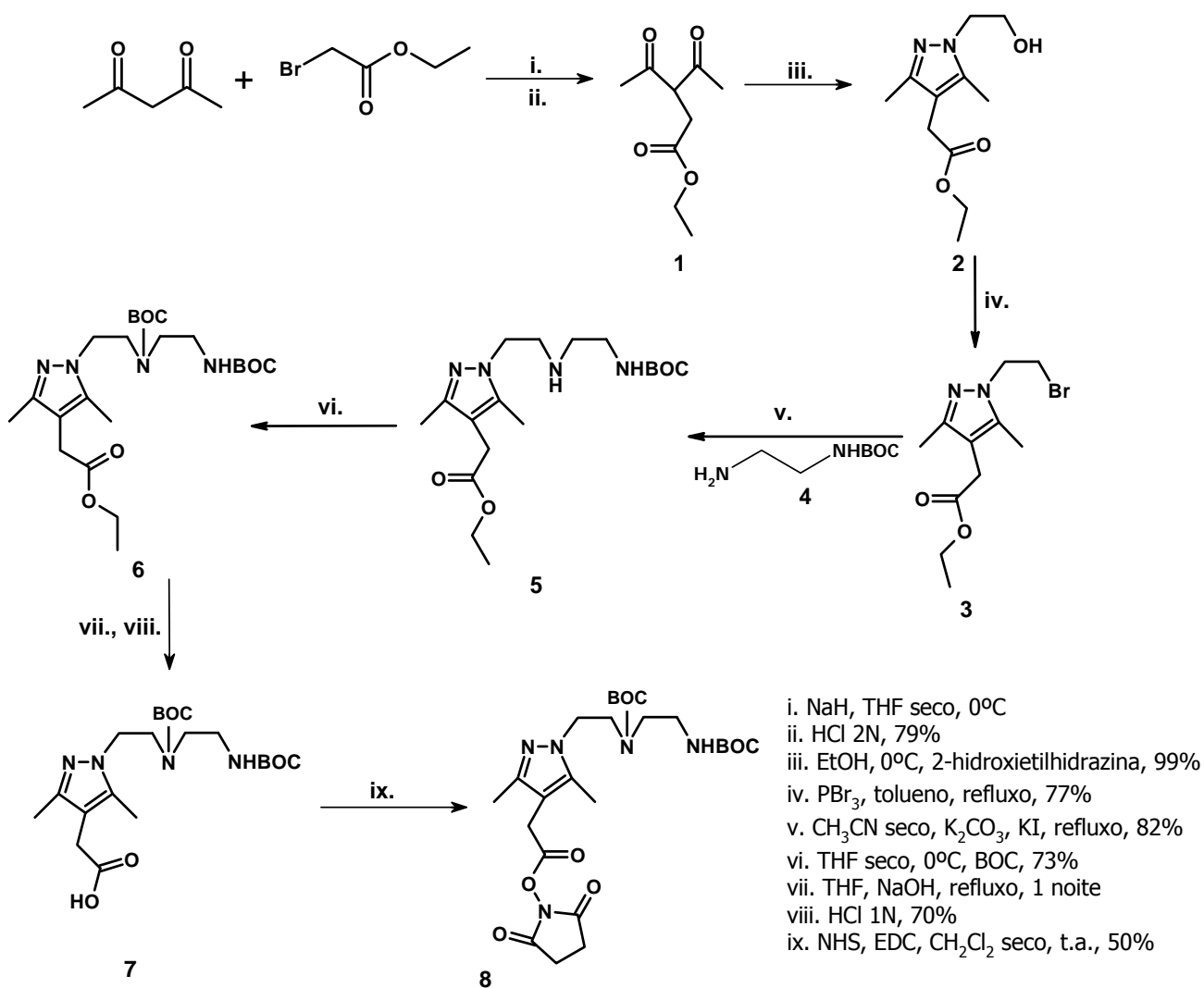
Figura 2.4: Representação esquemática da aproximação trifuncional explorada nesta tese.

Neste capítulo começamos por descrever a síntese e caracterização de ligandos tridentados do tipo pirazolo-diamina com diferentes unidades intercaladoras na posição 4 do anel pirazolilo (**L1** e **L2**) e alguns destes com um braço carboxilato livre (**L3-L5**) para posterior ligação a sequências peptídicas, como se verá no capítulo 4. As unidades intercaladoras exploradas são derivadas da acridina (alaranjado de acridina (AO) e 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA)) e do antraceno, modificadas por forma a se ligarem à unidade pirazolo-diamina. Em seguida, descrevem-se os complexos de rénio (I) isolados com os ligandos **L1-L5** e apresentam-se os resultados obtidos quando se estudou a natureza e intensidade da interação de alguns desses ligandos e respectivos complexos de rénio (I) com o ADN.

2.2. Síntese e Caracterização de Unidades Pirazolo-Diamina

Para sintetizar os ligando pirazolo-diamina, com uma unidade intercaladora na posição 4 do anel pirazolilo, começámos por preparar o composto *tert*-butil N-(2-[[*tert*-butoxi)carbonil](2-{4-[2-(2,5-dioxopirrolidinil)-2-oxoetil]-3,5-dimetilpirazolo}etil)amino}-etil) carbamato (**8**), como indicado no esquema 2.1. Este composto possui uma função éster activada que deverá reagir com os grupos amina das diferentes unidades intercaladoras estudadas neste trabalho.

Esquema 2.1



2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Inicialmente, reagiu-se 2,4-pentanodiona com bromoacetato de etilo em tetrahidrofurano (THF) seco a 0°C na presença de hidreto de sódio (NaH), tendo-se formado o composto 3-acetil-4-oxopentanoato de etilo (**1**). A ciclocondensação de **1** com 2-hidroxiethylhidrazina em etanol (EtOH) a 0°C levou à formação de N-(2-hidroxiethyl)-4-(metilpropionato)-3,5-dimetilpirazolo (**2**). A conversão da função álcool do intermediário **2** a brometo foi conseguida por reacção com tribrometo de fósforo (PBr₃), numa razão molar de 1:2, em tolueno e refluxo durante uma noite, levando à formação de N-(2-bromoethyl)-4-(metilpropionato)-3,5-dimetilpirazolo (**3**). O composto **3**, após reacção com N-BOC-1,2-aminoetano (**4**) na presença de carbonato de potássio (K₂CO₃) e de iodeto de potássio (KI), originou o acetato de etil 2-(1-(2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)ethylamino)ethyl)-3,5-dimetilpirazolo) (**5**). A protecção da amina secundária em **5** com dicarbonato de di-*tert*-butilo (BOC) em THF seco a 0°C levou à obtenção de acetato de etil-2-(1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)ethyl)amino)ethyl)-3,5-dimetilpirazolo) (**6**). Após hidrólise alcalina do grupo éster de **6** obteve-se o 2-(1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)ethyl)amino)ethyl)-3,5-dimetilpirazolo) ácido acético (**7**). Este composto foi extraído com diclorometano (CH₂Cl₂) do resíduo seco obtido, após neutralização da mistura reaccional com uma solução de HCl 1N.

A reacção de **7** com N-hidroxisuccinimida (NHS) em CH₂Cl₂ seco na presença de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-ethyl-carbodiimida hidroclicorada (EDC) permitiu obter o composto **8**. Neste passo reaccional, para eliminar o excesso de NHS e a ureia formada durante a reacção, optou-se por fazer a extracção do resíduo seco de **8** com CH₂Cl₂, em vez de uma lavagem com água. Deste modo, optimizou-se o rendimento da reacção e obteve-se um produto mais limpo. Também se eliminou a EDC em excesso, uma vez que este composto é solúvel em água e a extracção do resíduo sólido é feita apenas com CH₂Cl₂.^{51,52}

O composto **8** foi obtido com um rendimento global de 13% e a sua caracterização foi feita por RMN de ¹H e ¹³C. No espectro de RMN de ¹H (Fig. 2.5) observam-se duas ressonâncias a 2,12 e 2,16 ppm, atribuídas aos protões dos grupos metilo do anel pirazolilo. O singuleto que se observa a 2,77 ppm corresponde aos protões dos grupos -CH₂ do anel do éster activado da

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

NHS. O singuleto a 3,59 ppm corresponde aos prótons do grupo $-\text{CH}_2$ que se encontra ligado à posição 4 do anel pirazolilo. Os dois sinais a 1,36 ppm são devidos aos seis grupos $-\text{CH}_3$ dos dois grupos protectores BOC. Finalmente, os prótons alifáticos da diamina aparecem entre 2,96 e 4,05 ppm.

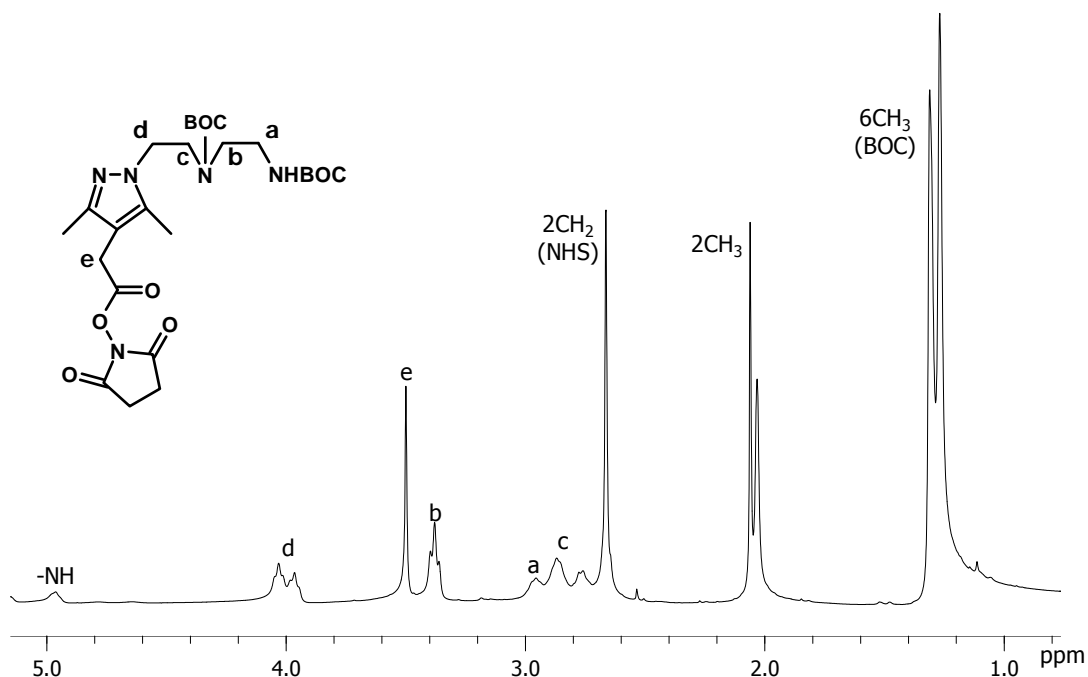
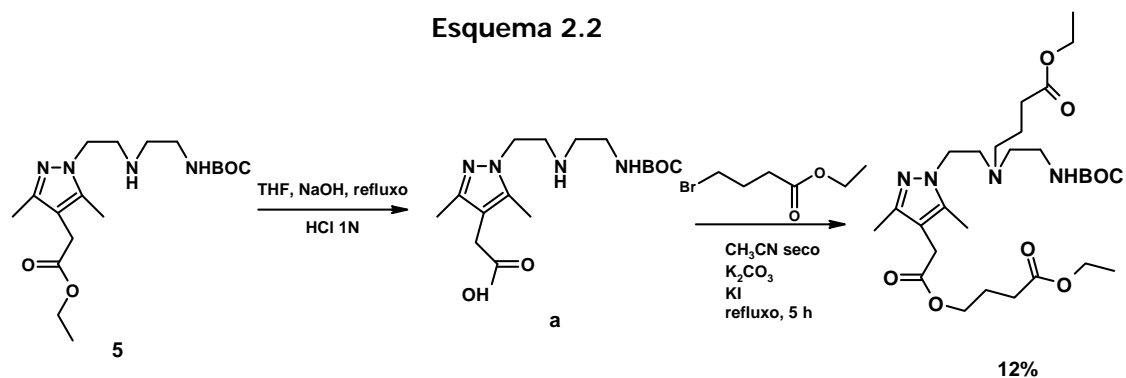


Figura 2.5: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 da unidade pirazolo-diamina **8**.

Para ser possível a ligação de **8** a análogos da bombesina (capítulo 4) procedeu-se à introdução de um braço butírico com uma função $-\text{COOH}$ livre, na amina central de **8**.

Uma primeira abordagem para a síntese dessa unidade pirazolo-diamina derivatizada na amina central foi a que resumidamente se mostra no esquema 2.2.



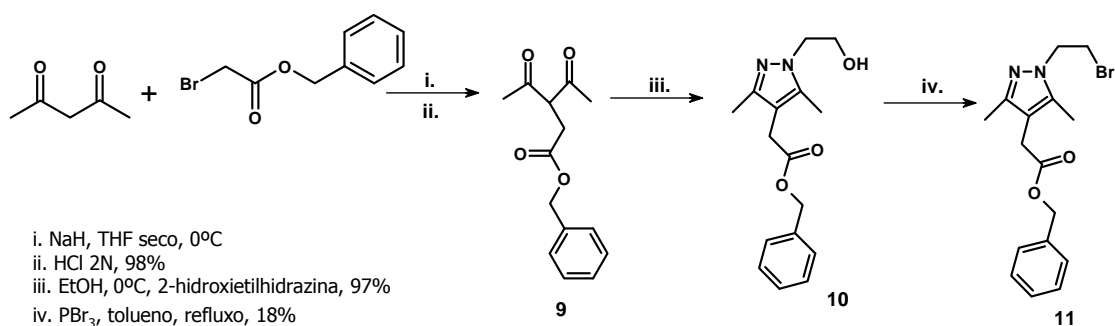
2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Partindo do intermediário **5** (ver esquema 2.1) fez-se a hidrólise alcalina do grupo éster presente na posição 4 do anel pirazolilo, para obtenção do propil 2-(1-(2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) acetato (**a**). Tentou-se então alquilar o composto obtido, na amina secundária, com 4-bromobutirato de etilo. Como se pode ver no esquema 2.2, o produto final obtido (12%) não era o desejado, uma vez que ocorreu esterificação no grupo carboxílico livre que se encontrava na posição 4 do anel pirazolilo.

Avançámos então para uma outra abordagem que consistiu em escolher o grupo benzilo para proteger o grupo carboxílico na posição 4 do anel de pirazolo.

Como indicado no esquema 2.3, reagiu-se 2,4-pentanodiona com bromoacetato de benzilo em THF seco a 0°C na presença de NaH. O produto obtido **9** foi então ciclizado por reacção com 1,2-hidroxietilhidrazina. Seguidamente, converteu-se a função álcool de **10** a brometo por reacção com PBr₃ em tolueno. O produto obtido foi o 2-(1-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo)acetato de benzilo (**11**), mas com um rendimento muito baixo (18%). Concluiu-se então, que esta também não era a estratégia de síntese mais adequada.

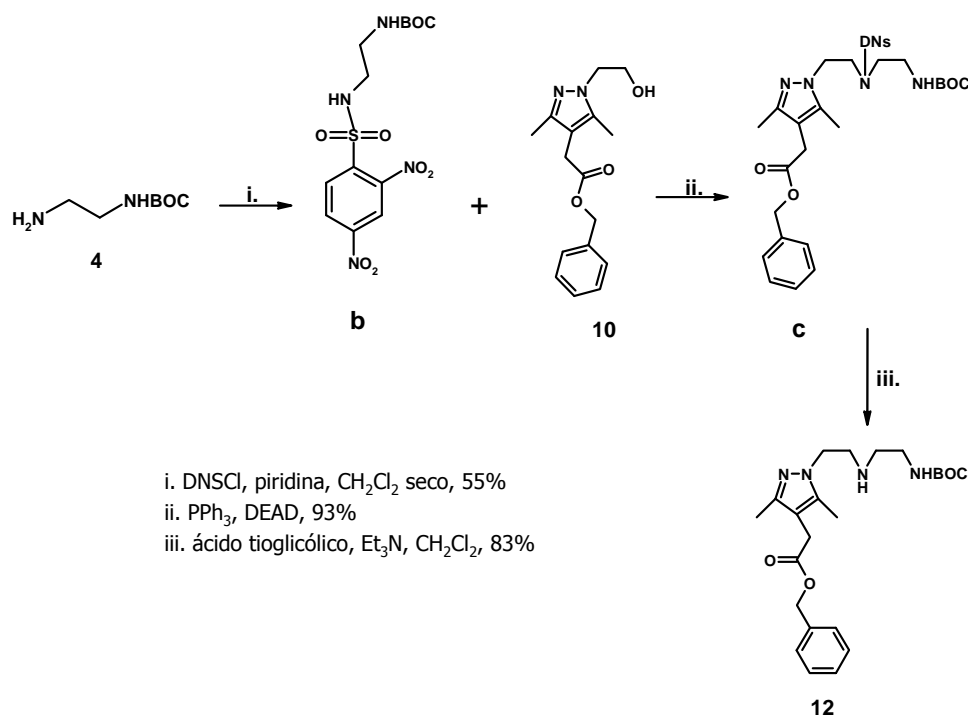
Esquema 2.3



Procurámos então seguir a estratégia de síntese indicada no esquema 2.4, que consistiu em reagir **10** com N-BOC-1,2-aminoetano (**4**) nas condições da reacção de Mitsunobu.^{53,54} O composto obtido foi o 2-(1-(2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) acetato de benzilo (**12**), após remoção do grupo 2,4-dinitrofenilsulfonamida da amina secundária do intermediário **c** com ácido tioglicólico.

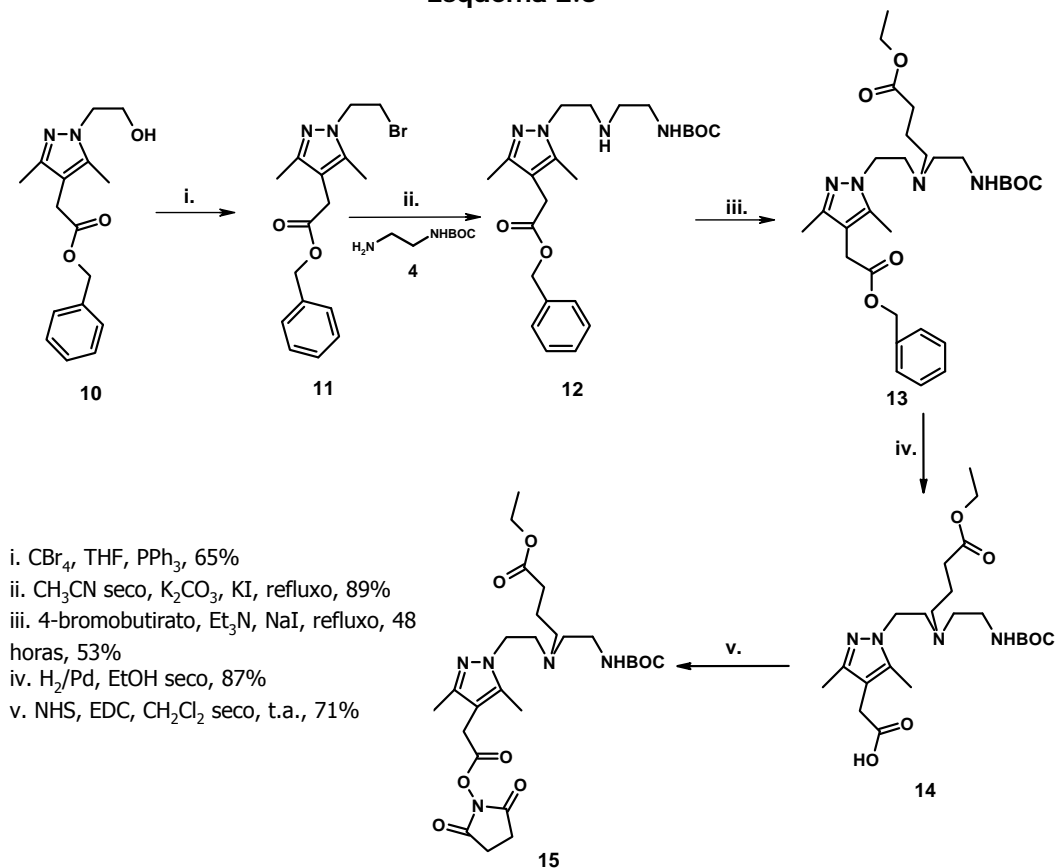
2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Esquema 2.4



A morosidade da metodologia de Mitsunobu e os baixos rendimentos, levaram a que explorássemos uma outra estratégia de síntese que está esquematizada em 2.5.

Esquema 2.5



Sumariamente, ao composto **10** em THF seco adicionou-se tetrabrometo de carbono (CBr_4) e uma solução de trifetilfosfina (PPh_3) no mesmo solvente. Após uma noite de reacção, à temperatura ambiente, evaporação do solvente e lavagem com éter dietílico (Et_2O), verificou-se que o produto obtido correspondia ao intermediário 2-(1-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo)acetato de benzilo (**11**), obtido com um rendimento de 65% e sem necessidade de purificação adicional.⁵⁵ Reagiu-se então **11** com N-BOC-1,2-aminoetano (**4**) na presença de K_2CO_3 e KI em CH_3CN seco obtendo-se o intermediário **12**. Deste modo, e comparando com a síntese indicada no esquema 2.4, o rendimento global de **12** passou de 40% para 55%, e foram eliminados vários passos reaccionais.

Após optimização das condições reaccionais, concluímos que **13** (etil-4-((2-(4-(2-(benziloxi)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)butanoato) podia ser obtido fazendo reagir **12** com 4-bromobutirato na presença de trietilamina (Et_3N) e iodeto de sódio (NaI). Após refluxo durante 48 horas, o composto **13** foi obtido com rendimento de 53%. Removeu-se então o grupo benzílico por hidrogenação utilizando como catalisador paládio adsorvido em carvão activado e como solvente EtOH seco.⁵⁶ O composto 2-(1-(2-((2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil) (4-etoxi-4-oxobutil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) ácido acético (**14**) reagiu então com NHS em CH_2Cl_2 seco, na presença de EDC originando **15**, que foi obtido com um rendimento global de 19%. A caracterização de **15** por RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a obtenção do composto pretendido.

2.3. Síntese e Caracterização das Unidades Intercaladoras

As unidades intercaladoras que utilizámos nos estudos apresentados nesta tese são derivadas da acridina (alaranjado de acridina (AO) e 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA)) e do antraceno (Fig. 2.6).

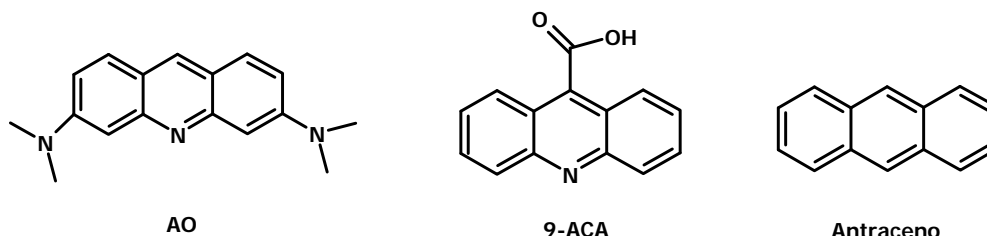


Figura 2.6: Estrutura do alaranjado de acridina (AO), do 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA) e do antraceno.

A acridina e seus derivados são uma família de compostos cuja interacção com o ADN tem sido estudada. Estes compostos encontram-se protonados no átomo de azoto da unidade aromática mesmo em condições neutras, e os catiões resultantes representam uma classe promissora de intercaladores, podendo mesmo exibir um elevado potencial para aplicação em quimioterapia, como é o caso da anilinoacridina. Por esta razão, vários derivados de acridina têm sido sintetizados e avaliados relativamente à sua actividade biológica e potencial clínico.⁵⁷ Neste contexto, derivados de acridina têm também sido ligados a moléculas ou complexos que não interagem com o ADN ou a algumas que já interagem, com o objectivo de promover a interacção das primeiras com o ADN ou de aumentar a ligação e selectividade das segundas.⁵⁷

⁶³ Devido às suas propriedades fluorescentes, os derivados de acridina têm também sido explorados como sondas para detecção de ADN *in vitro*.⁶⁴

O AO intercala com o seu longo eixo molecular paralelo ao local de ligação à molécula de ADN e a intensidade de fluorescência que emite aumenta em presença do ADN. Por essa razão, este composto é utilizado como corante do ADN em electroforese em gel ou para detecção de ADN celular. Este composto também apresenta metacromismo, emitindo uma fluorescência verde ($\lambda_{em} = 530$ nm) quando intercala em cadeias duplas de ADN ($\lambda_{ex} = 488$

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

nm), mas quando se associa a cadeias simples de ADN ou a ARN exibe uma fluorescência vermelha ($\lambda_{em} = 640$ nm) ao mesmo comprimento de onda (c.d.o.) de excitação, sendo por isso utilizado em citometria de fluxo.^{57,65} O 9-ACA (Fig. 2.6) tem também sido alvo de estudos que pretendem tirar partido das suas propriedades espectroscópicas para o desenvolvimento de ensaios *in vitro*.^{66,67}

À semelhança das acridinas, o antraceno é uma unidade planar hidrofóbica, fluorescente e intercaladora que absorve na região 320-390 nm, isto é a maiores c.d.o. do que as bases nucleotídicas.⁶⁸ Os derivados do antraceno possuem geralmente cadeias laterais ou substituintes que se encontram protonados a pH fisiológico, o que potencia a sua interação com o ADN. Por isso, estes compostos têm também recebido especial atenção como potenciais agentes antitumorais.⁶⁹ Estas espécies são também conhecidas por se ligarem ao ADN de vários modos, sendo a intercalação o processo dominante. Por exemplo, o 9-antrilmetilamónio (AMAC, Fig. 2.7) constitui um dos primeiros exemplos de um composto que intercala no ADN com uma constante de ligação da ordem de $\approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.⁷⁰⁻⁷²

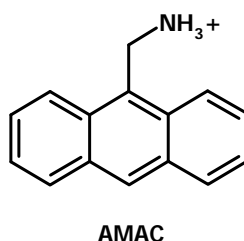


Figura 2.7: Estrutura de 9-antrilmetilamónio (AMAC).⁷¹

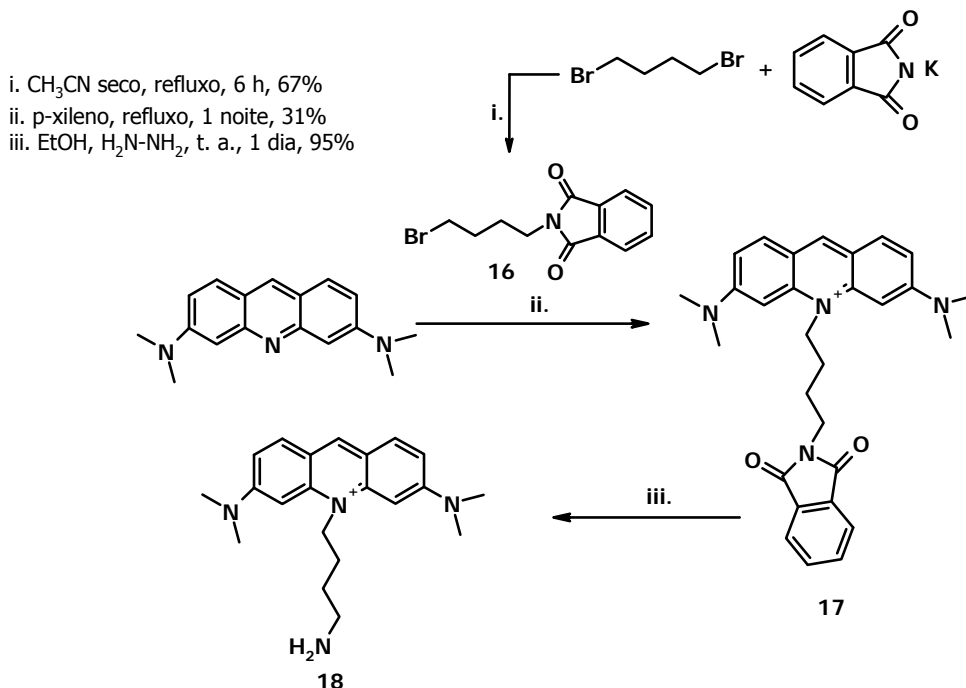
Nos esquemas 2.6 e 2.7 descreve-se a síntese das unidades intercaladoras derivadas de acridina, que designámos por compostos **18** e **19**.

O composto **18** foi sintetizado utilizando o método anteriormente descrito no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas (esquema 2.6).⁷³ Resumidamente, o AO foi alquilado com 2-(4-(bromobutil)isindolino-1,3-diona (**16**), utilizando xileno como solvente e refluxo. O grupo

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

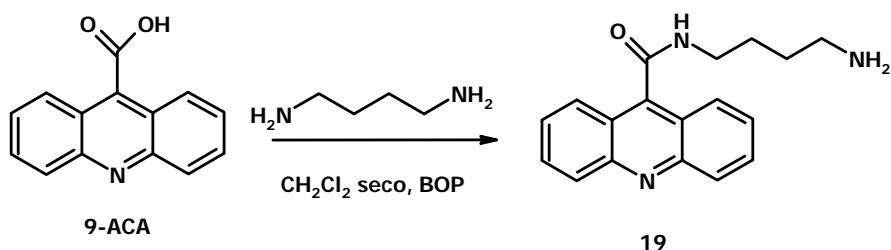
protector ftalimida foi removido do composto **17**, originando 10-(4-amino-butil)-3,6-dimetilamino-acridinium (**18**) sob a forma de um sólido vermelho alaranjado.

Esquema 2.6



O composto N-(4-aminobutil)acridina-9-carboxamida (**19**) foi sintetizado por reacção do 9-ACA com 1,4-diaminobutano, utilizando uma razão molar de 1:5, CH₂Cl₂ seco como solvente e (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)-fosfónio-hexafluorofosfato (BOP) como agente acoplante (esquema 2.7). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente durante 53 horas. O solvente foi evaporado e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna tendo sido obtido o composto **19** com um rendimento de 69%.

Esquema 2.7

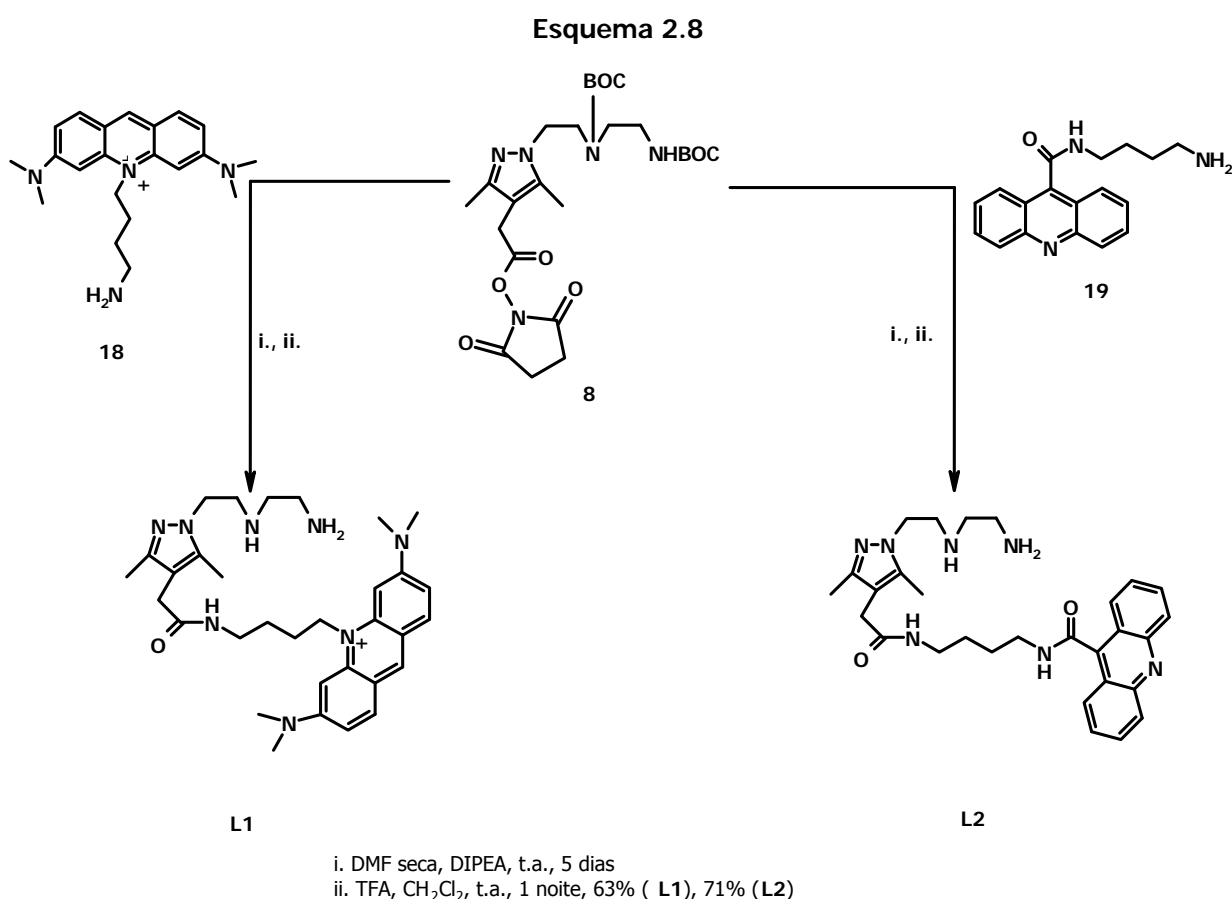


2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

A caracterização de **18** e **19** foi realizada com base no RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H apresentava as ressonâncias esperadas para os prótons aromáticos, bem como para a cadeia butilénica e grupos substituintes do anel aromático, no caso de **18**.

2.4. Síntese e Caracterização de Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo Unidades Intercaladoras (L1–L5)

Os ligandos **L1** e **L2** foram sintetizados fazendo reagir os compostos **18** e **19** com o composto **8**. O processo sintético seguido encontra-se indicado no esquema 2.8.



Inicialmente, reagiu-se o composto **8** com **18** em MeOH seco à temperatura ambiente, na presença de diisopropiletilamina (DIPEA). Neste solvente não ocorreu qualquer reacção, provavelmente devido à polaridade do mesmo. Optou-se então por fazer a reacção em

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

dimetilformamida (DMF) seca, na presença de DIPEA. Contudo, a baixa solubilidade de **18** em DMF exigiu que a reacção se prolongasse por 5 dias à temperatura ambiente. A mesma metodologia foi utilizada na reacção de **19** com **8**. Os produtos obtidos nestas duas reacções foram purificados por cromatografia em coluna, dissolvidos em CH_2Cl_2 e tratados com uma solução de TFA, durante uma noite, originando os compostos **L1** e **L2** com rendimentos globais de 63% e 71%, respectivamente.

Estes compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massa (ESI-MS), HPLC e análise elementar de C, H e N.

A título de exemplo, apresenta-se na figura 2.8 o espectro de RMN de ^1H de **L2**. Neste espectro observámos dois singletos a 2,12 e 2,16 ppm correspondentes aos grupos metilo do anel pirazolilo. Os prótons aromáticos do cromóforo aparecem entre 7,61 e 8,13 ppm, enquanto os prótons metilénicos da cadeia alifática entre o anel pirazolilo e o cromóforo aparecem a 1,70, 3,24 e 3,61 ppm. A ressonância a 3,24 ppm encontra-se sobreposta com o sinal do solvente. O sinal correspondente aos prótons do grupo $-\text{CH}_2$ ligado ao carbono 4 do anel pirazolilo encontra-se também sobreposto com o sinal do solvente a 3,24 ppm. Os prótons alifáticos da unidade pirazolo-diamina aparecem a 2,61, 2,73, 2,88 e 4,00 ppm.

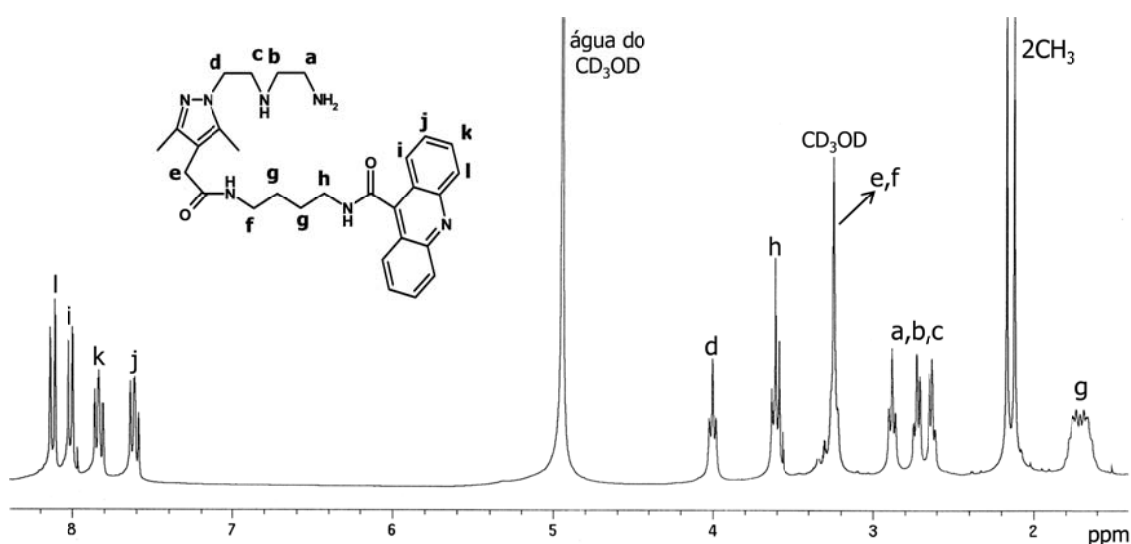
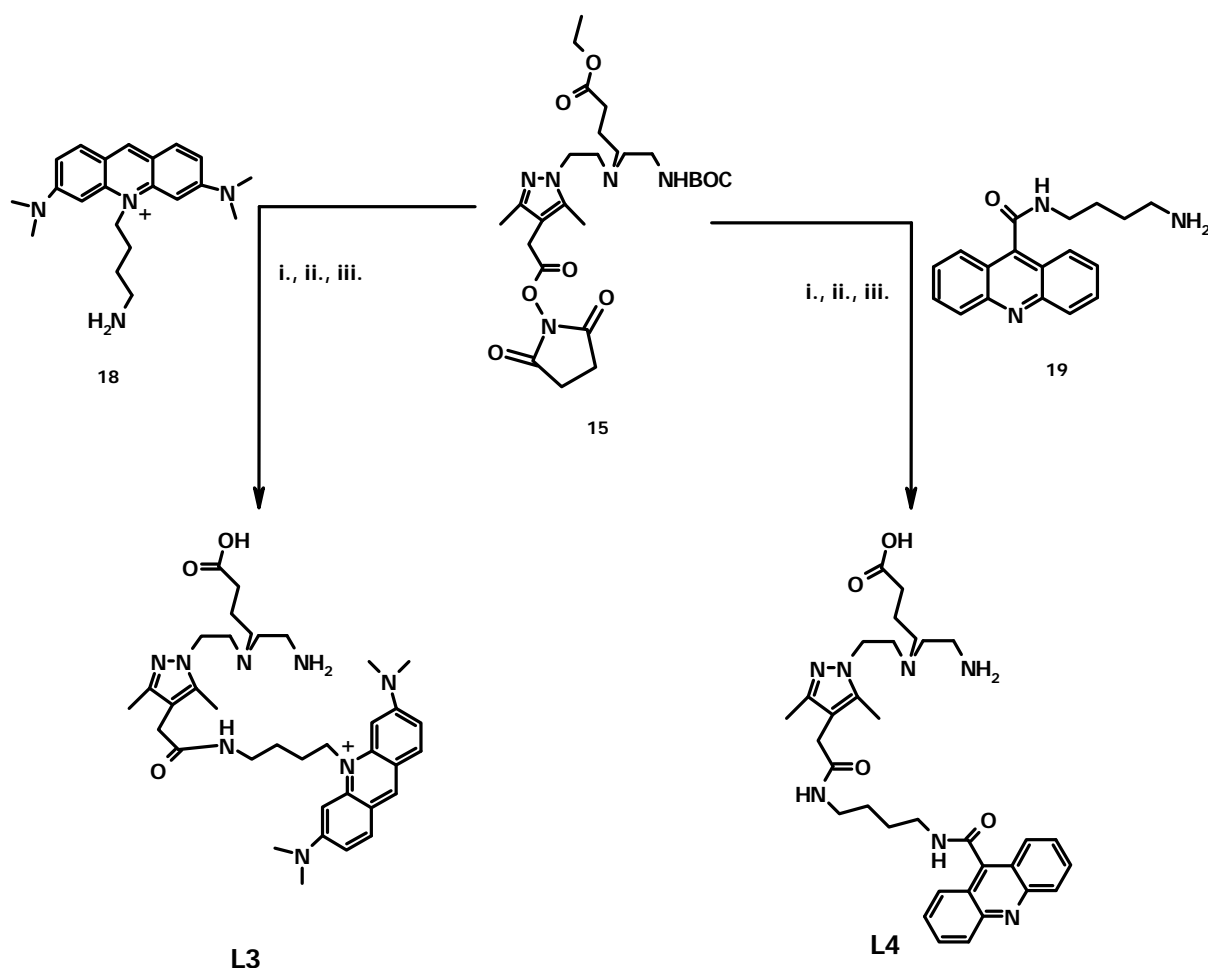


Figura 2.8: Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD de **L2**.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Os compostos **L3** e **L4** foram obtidos fazendo reagir o composto **15** com **18** e **19** em DMF seca (esquema 2.9). Os compostos **L3** e **L4** foram obtidos após hidrólise básica dos ésteres lineares presentes na amina central e remoção dos grupos protectores BOC com TFA. O composto **L3** foi obtido com um rendimento global de 25% e a sua caracterização foi feita por RMN de ^1H e ^{13}C , ESI-MS, HPLC e análise elementar de C, H e N. **L4** foi obtido com um rendimento global de 9% e a sua caracterização foi feita unicamente por RMN de ^1H .

Esquema 2.9



- DMF seca, t. a.
- THF, NaOH, refluxo, 1 noite
- TFA, CH₂Cl₂, t. a., 1 noite, 25% (**L3**), 9% (**L4**)

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Nos espectros de RMN de ^1H de **L3** (Fig. 2.9) e **L4** observámos dois singuletos a campo alto correspondentes aos grupos metilo do anel pirazolilo. As ressonâncias esperadas para os prótons aromáticos apareciam entre 6,46 e 8,49 ppm para **L3** e entre 7,82 e 8,32 ppm para **L4**. As ressonâncias dos prótons das cadeias alifáticas da unidade pirazolo-diamina e da cadeia que liga a unidade aromática encontravam-se entre 1,58 e 4,54 ppm. Para **L3** algumas destas ressonâncias coincidiam com as ressonâncias dos grupos metilénicos do cromóforo que apareciam a 3,24 ppm.

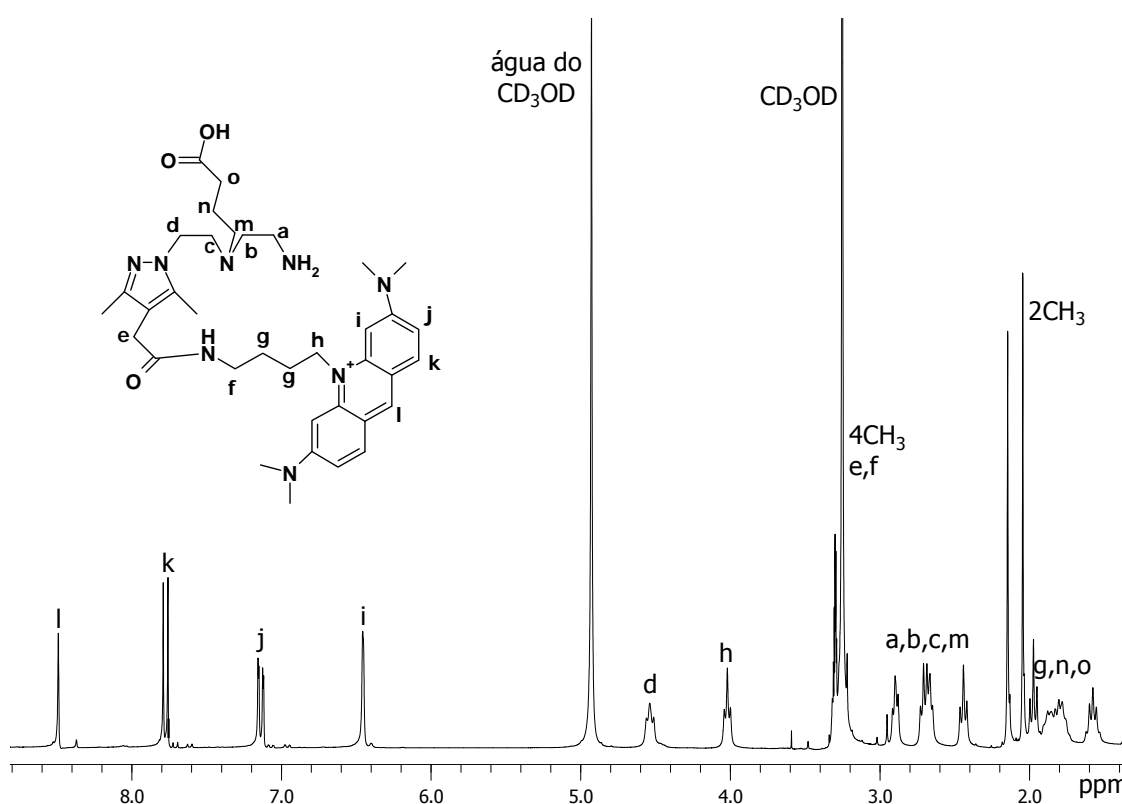


Figura 2.9: Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD de **L3**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **L3** observámos sete ressonâncias entre 93,46 e 157,12 ppm correspondentes aos carbonos da unidade aromática, assim como uma ressonância a 40,89 ppm correspondente aos carbonos dos grupos metilo do AO. O carbono (4) do anel de pirazolo aparecia a 111,61 ppm e os carbonos (3) e (5) apareciam a 139,36 e 147,44 ppm. Observámos também duas ressonâncias a campo baixo (173,95 e 182,29 ppm)

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

correspondentes aos grupos C=O das funções amida e do grupo –COOH. As ressonâncias devidas aos carbonos dos grupos –CH₂ das cadeias alifáticas apareciam entre 24,95 e 54,63 ppm e a ressonância correspondente ao grupo –CH₂ ligado ao carbono (4) do pirazolo aparecia a 31,73 ppm.

No espectro de ESI-MS de **L3** (Fig. 2.10) observámos um pico a m/z 645,2, que correspondia ao ião molecular [M]⁺, e que apresentava um desdobramento compatível com o esperado teoricamente.

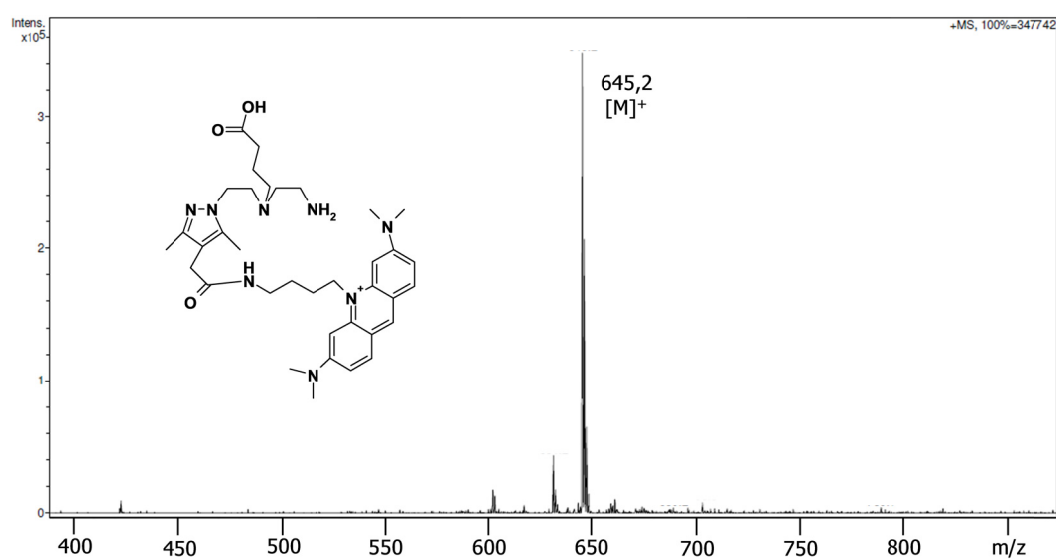
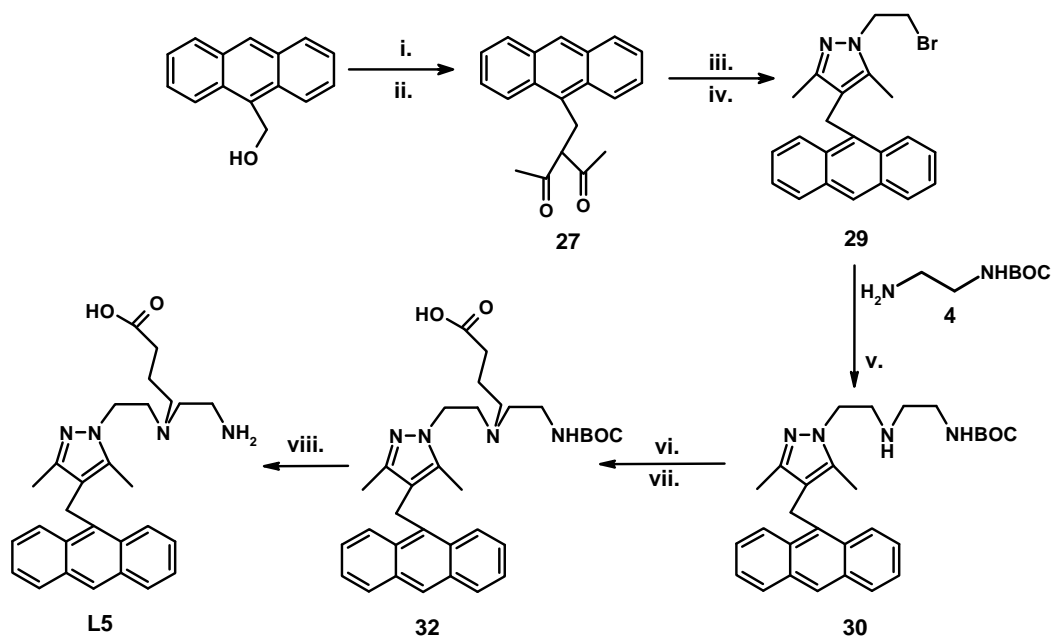


Figura 2.10: Espectro de massa de **L3** (ESI-MS; modo positivo).

O pirazolo-diamina com um derivado do antraceno na posição 4 do anel de pirazolo (**L5**) foi sintetizado como se encontra indicado no esquema 2.10.

Esquema 2.10



- i. PPh_3 , Br_2 , CH_3CN , t.a., 2 h, 99%
- ii. NaH , acacH , THF , 48%
- iii. 2-hidrazinoetanol, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, t.a., 2 h, 77%
- iv. PBr_3 , tolueno, refluxo, 88%
- v. K_2CO_3 , KI , CH_3CN , refluxo, 72%
- vi. K_2CO_3 , KI , 4-bromobutirato de etilo, CH_3CN , refluxo, 43%
- vii. NaOH , THF , refluxo, 88%
- viii. TFA , CH_2Cl_2 (1:1), t.a., 1 noite, 40%

Preparámos o composto 4-(antraceno-9-ilmetil)-1-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (**29**) como previamente descrito pelo Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.³⁴ Fez-se então reagir **29** com N-BOC-1,2-aminoetano (**4**) na presença de K_2CO_3 e KI em CH_3CN seco. O *tert*-butil 2-(2-(4-(antraceno-9-ilmetil)-3,5-dimetilpirazolo)etilamino) etilcarbamato (**30**) obtido reagiu então com 4-bromobutirato de etilo em CH_3CN seco, na presença de K_2CO_3 e KI , originando **L5**, após hidrólise básica da função éster e remoção do grupo protector BOC. A caracterização de **L5** foi feita por RMN de ^1H e ^{13}C , ESI-MS, HPLC e análise elementar de C, H e N.

O espectro de RMN de ^1H de **L5** com as respectivas atribuições é apresentado na figura 2.11.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

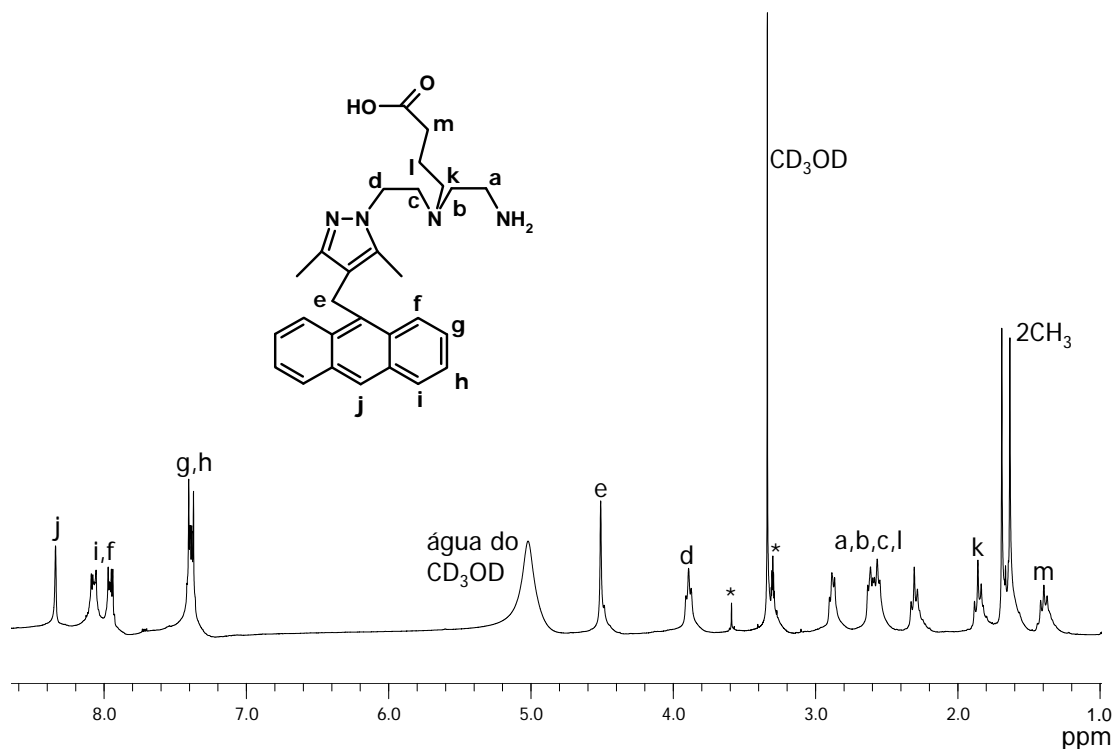


Figura 2.11: Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD de **L5** (* - impureza).

No espectro de RMN de ^{13}C de **L5** apareciam as duas ressonâncias esperadas a 9,39 e 12,22 ppm para os carbonos dos grupos $-\text{CH}_3$ do anel pirazolilo. A unidade aromática originou 8 ressonâncias entre 125,01 e 132,43 ppm. Aparecia ainda uma ressonância a 178,76 ppm correspondente ao grupo $\text{C}=\text{O}$ da função $-\text{COOH}$. As três ressonâncias que apareciam entre 23,75 e 38,89 ppm foram atribuídas aos grupos $-\text{CH}_2$ do braço butírico ligado à amina central da unidade pirazolo-diamina. O grupo $-\text{CH}_2$ ligado ao carbono (4) do anel pirazolilo originou uma ressonância a 23,65 ppm, enquanto as ressonâncias que apareciam entre 47,31 e 54,01 ppm correspondiam aos carbonos da cadeia alifática da unidade pirazolo-diamina.

O espectro de massa (ESI-MS) de **L5** apresentava um pico a m/z 459,2, correspondente ao ião molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$.

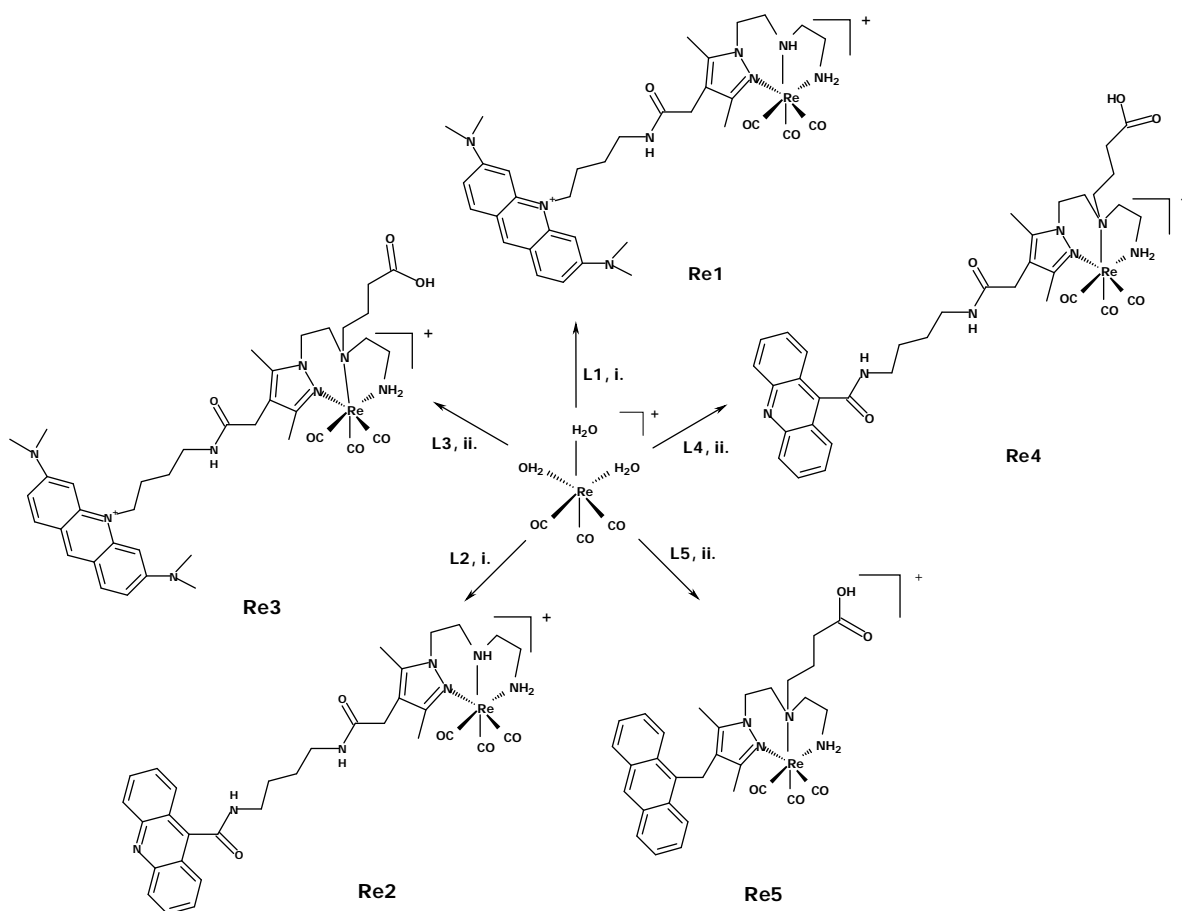
2.5. Síntese e Caracterização de Complexos de Rénio (I) (Re1-Re5)

Estabilizados pelos Ligandos L1-L5

Os complexos de rénio (I) foram preparados por reacção dos compostos **L1-L5** com $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]\text{Br}$ (esquema 2.11). Nas reacções com **L1** e **L2** utilizou-se uma relação molar metal:ligando de 1:1, o solvente foi MeOH e a mistura foi refluxada durante a noite. Nas reacções com os compostos **L3-L5** o solvente foi H_2O e a mistura foi refluxada durante a noite.

O complexo **Re5** precipitou do meio reaccional, tendo sido separado por filtração e seguidamente seco em vazio. Os restantes compostos foram obtidos após evaporação do solvente e purificação dos sólidos obtidos por cromatografia em coluna (**Re1** e **Re2**) ou por HPLC (**Re3** e **Re4**). Os complexos **Re1-Re5** foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C , g-HSQC, g-COSY, IV, ESI-MS, HPLC e análise elementar de C, H e N.

Esquema 2.11



i. MeOH, refluxo, 1 noite, 68% (**Re1**), 89% (**Re2**)
ii. H_2O , refluxo, 1 noite, 56% (**Re3**), 27% (**Re4**), 100% (**Re5**)

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Nos espectros de ESI-MS dos compostos **Re1-Re5** foram observados picos com valores de m/z correspondentes aos respectivos íões moleculares e com o desdobramento esperado para complexos de rénio. A título de exemplo, apresenta-se na figura 2.12 o espectro de ESI-MS para o complexo **Re5**.

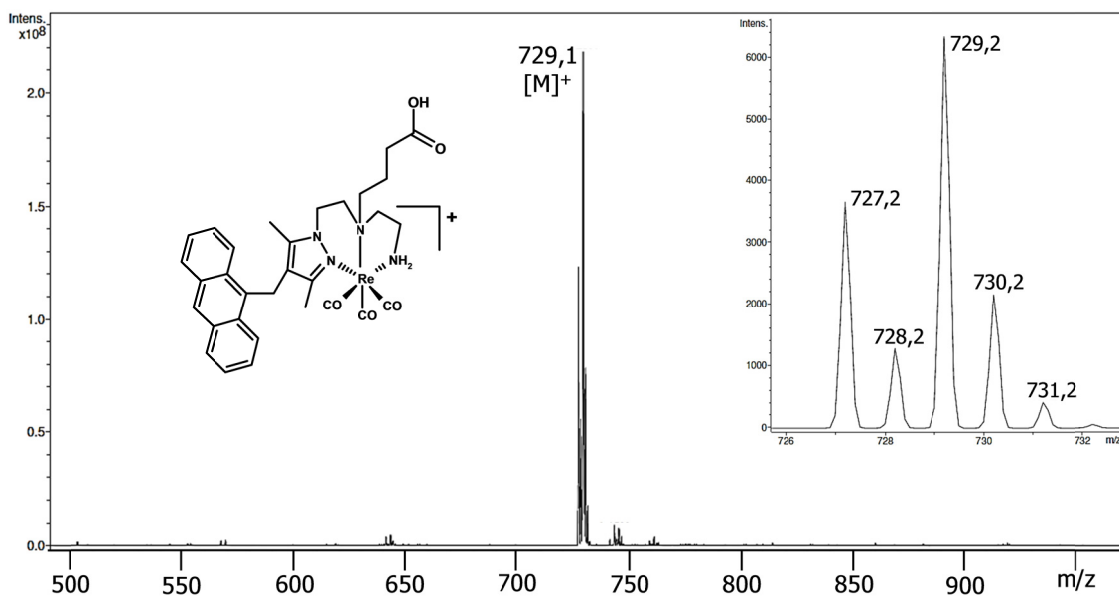


Figura 2.12: Espectro de massa de **Re5** (ESI-MS; modo positivo). Inset: espectro teórico.

O espectro de IV destes complexos, para além das bandas devidas aos ligandos, apresentava ainda duas bandas de forte intensidade situadas entre 1890 e 2029 cm^{-1} associadas às vibrações de extensão $\nu(\text{C}=\text{O})$.^{34,36}

A título de exemplo, apresentam-se na figura 2.13 os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o complexo **Re5**.

2. Ligandos e Complexos de Rênio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

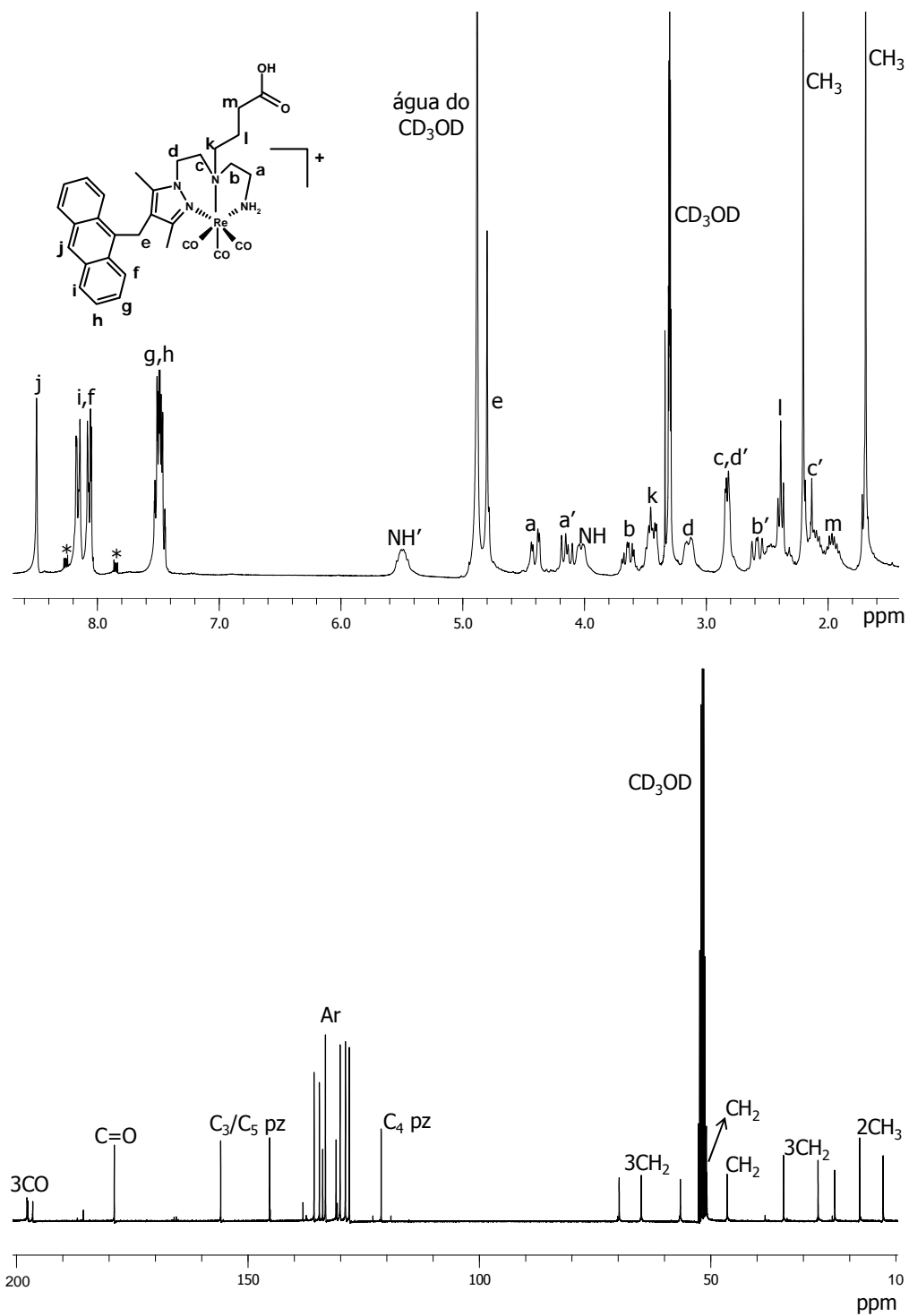


Figura 2.13: Espectros de RMN de ¹H (em cima) e de ¹³C (em baixo) de Re5 em CD₃OD (* - impureza).

Uma característica comum nos espectros de RMN de ^1H dos diferentes complexos (**Re1-Re5**) refere-se ao perfil diastereotópico das ressonâncias devidas aos quatro grupos $-\text{CH}_2$ das unidades pirazolo-diamina (a, b, c, d) e do grupo $-\text{NH}_2$ dessa mesma cadeia alifática. Este perfil confirma a coordenação das unidades pirazolo-diamina ao metal pelo azoto do anel pirazolilo e pelos dois átomos de azoto das aminas primária e secundária (**L1** e **L2**) ou terciária (**L3-L5**). As duas ressonâncias esperadas para os grupos $-\text{CH}_3$ do anel pirazolilo encontravam-se deslocadas para campo mais baixo relativamente à posição das mesmas nos ligandos livres, o que também confirma a coordenação do azoto do anel de pirazolilo ao centro metálico. As ressonâncias das unidades aromáticas apareciam entre 6,51 ppm e 8,68 ppm com um perfil e desvios químicos semelhantes aos observados nos espectros de RMN de ^1H para os respectivos ligandos livres (**L1-L5**), o que confirma que estes grupos não estão envolvidos na coordenação ao centro metálico.

Os espectros de RMN de ^{13}C para os complexos **Re1-Re5** apresentavam as ressonâncias esperadas para as unidades aromáticas (entre 93,62 e 157,35 ppm), para o anel pirazolilo e para os prótons das cadeias alifáticas. Também observámos as três ressonâncias esperadas para os ligandos carbonilo da unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ que apareciam entre 193,71 e 195,02 ppm. Os compostos **Re3** e **Re5** apresentavam ainda uma ressonância centrada a 176 ppm referente ao grupo $\text{C}=\text{O}$ da função $-\text{COOH}$ livre do braço butírico introduzido na amina central.

2.6. Interação de Ligandos e dos Respective Complexos de Rénio com ADN

O ADN é uma molécula biológica que possui vários locais de ligação disponíveis para uma grande diversidade de compostos. A interação desses compostos com o ADN origina modificações estruturais que podem influenciar variadas funções biológicas. Por esta razão, os compostos com capacidade para interagir com o ADN possuem elevado potencial como agentes quimioterapêuticos, podendo suprimir a replicação de genes ou mesmo a sua

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

transcrição. Sendo assim, um dos grandes desafios tem sido a concepção de moléculas que se ligam ao ADN selectivamente e com constantes de associação elevadas, sendo que, vários compostos orgânicos (derivados da acridina e do antraceno, por exemplo) e complexos organometálicos têm sido desenvolvidos e investigada a sua afinidade para esta macromolécula.⁵⁷

Como esquematicamente representado na figura 2.14, os modos de interacção com a dupla hélice do ADN podem ser de diferentes tipos:

- stacking* exterior
- ligação aos sulcos maior ou menor
- intercalação

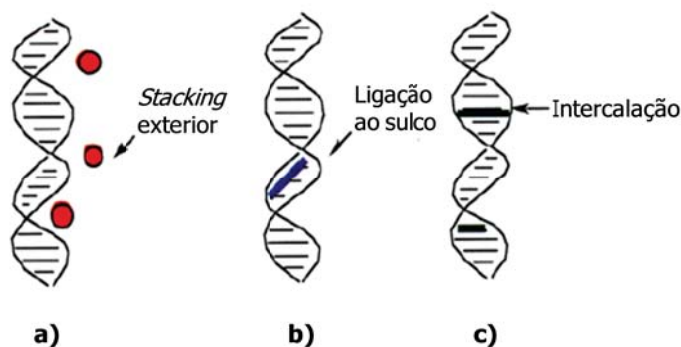


Figura 2.14: Modos de interacção de compostos com o ADN: a) ligação electrostática ou iónica a um grupo químico da hélice, como por exemplo, grupo fosfato; b) ligação electrostática ou iónica a grupos químicos localizados à superfície da hélice de ADN no sulco maior ou menor: c) intercalação (interacção hidrofóbica entre um fragmento planar e as bases do ADN).⁷¹

A maioria dos corantes orgânicos tem tendência para formar agregados que impossibilitam a sua interacção com o ADN ligando-se unicamente aos grupos fosfato da dupla hélice (*stacking* exterior). Este modo de ligação é favorecido por interacções electrostáticas, enquanto a ligação aos sulcos ou a intercalação resultam de um conjunto de fenómenos baseados em π -*stacking*, ligações de hidrogénio, forças de van der Waals ou interacções hidrofóbicas.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Na molécula de ADN as bases nucleotídicas encontram-se dispostas de uma forma coplanar, o que permite que compostos policíclicos aromáticos planares intercalem entre dois pares de bases. As moléculas orgânicas podem intercalar com o seu eixo molecular mais longo paralelo ou perpendicular relativamente ao local de ligação (Fig. 2.15), isto é, relativamente à direcção das ligações de hidrogénio nos pares de bases. Por exemplo, derivados de acridina ligam-se paralelamente ao local de interacção.⁵⁷



Figura 2.15: Representação esquemática de intercaladores com o eixo molecular mais longo paralelo (a) e perpendicular (b) ao local de ligação. A cinzento estão representadas as bases nucleotídicas e a preto a molécula que intercala.⁵⁷

Contudo, deve ter-se em conta que em algumas situações os três modos de interacção podem ocorrer em simultâneo.⁵⁷

Uma vez que as propriedades físicas do ADN e das moléculas que com ele interactuam se alteram após formação dos respectivos complexos de associação, o estudo dessas propriedades físicas constitui uma ferramenta útil para avaliar qualitativa e quantitativamente o processo de interacção e para confirmar o modo de ligação. Entre as propriedades que podem ser avaliadas temos: viscosidade, temperatura de fusão do ADN e propriedades de absorção e emissão. Neste último caso podem-se fazer estudos de espectroscopia de UV-Visível e fluorescência ou de dicroísmo circular (CD) ou dicroísmo linear (LD) em que a absorção de luz polarizada circular ou linear pode ser utilizada para deduzir a orientação de um intercalador relativamente ao ADN.^{57,73} No entanto, é necessário ter em conta que só uma combinação de métodos permite muitas vezes obter informação suficiente para determinar o modo de ligação entre uma molécula e o ADN.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Como foi referido no capítulo 1, com vista à exploração do potencial terapêutico do ^{99m}Tc é necessário que o radionuclídeo se localize no núcleo das células e que o complexo metálico que o contém tenha capacidade para interagir com o ADN. No sentido de prever a natureza e a intensidade da interação entre os complexos de ^{99m}Tc e o ADN fomos realizar estudos espectroscópicos com os complexos análogos de rênio.

Sabendo que as unidades intercaladoras **18** e **19** são derivadas da acridina, com reconhecida afinidade para interagir com o ADN por intercalação⁵⁷, fomos avaliar se estas unidades mantinham a sua afinidade para a macromolécula após ligação à unidade pirazolo-diamina, para o que se estudou a interação de **L1** e **L2** com ADN. Seguidamente, estudámos a interação com o ADN dos complexos **Re1** e **Re2** para podermos avaliar de que forma o fragmento metálico *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$, após ligação à unidade pirazolo-diamina, podia ou não comprometer a interação dos intercaladores com o ADN. Estes estudos foram realizados recorrendo a diversas técnicas espectroscópicas, nomeadamente espectroscopia de UV-Visível, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e dicroísmo linear (LD). Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos de seguida.

2.6.1. Espectroscopia de UV-Visível

A soluções dos compostos **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** em solução tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4) adicionámos quantidades crescentes de uma solução de ADN no mesmo solvente. Após cada adição as soluções foram deixadas a equilibrar durante cerca de 1 min seguindo-se a medição da absorvância das mesmas. Para **L1** e **Re1** os estudos foram realizados entre 400-600 nm enquanto para **L2** e **Re2** os estudos foram seguidos no intervalo 300-500 nm. A gama de c.d.o. escolhida teve em conta o valor do c.d.o. a que ocorrem as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de cada unidade cromófora.^{66,74,75}

Os espectros de UV-Visível obtidos para os compostos **L1** e **Re1** encontram-se indicados na figura 2.16. Da análise destes espectros concluiu-se que o máximo de absorção

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

que ocorre a 496 nm para os compostos livres sofria um desvio para 506 nm após ligação ao ADN. De igual forma, o ombro que se observava a 470 nm sofria um desvio para 480 nm.

Com base nestes resultados concluiu-se que a adição de quantidades crescentes de ADN a soluções de **L1** e **Re1** em TRIS-HCl provocava um desvio batocrômico de 10 nm no máximo da curva de absorção dos compostos livres. Este resultado é consistente com a existência de uma interação do tipo intercalação entre os compostos **L1** e **Re1** e o ADN. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores quando estudaram a interação com o ADN de complexos de platina (II) contendo um derivado do AO na sua estrutura.⁷⁶

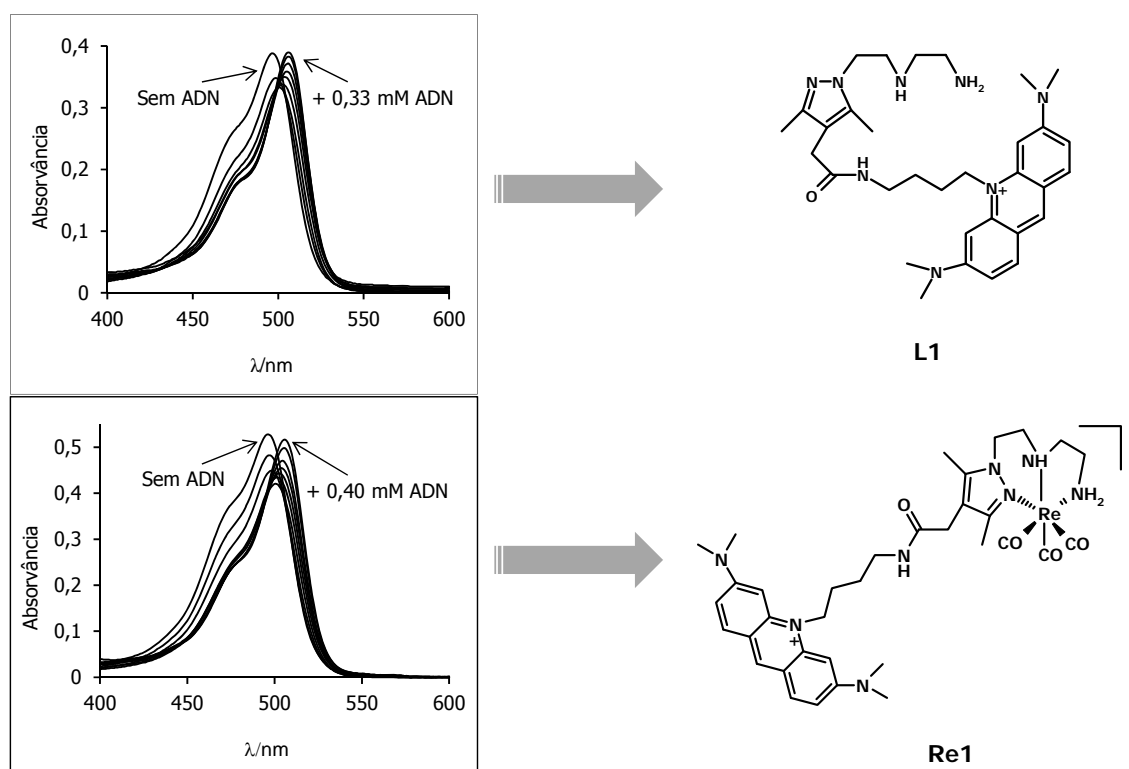


Figura 2.16: Espectros de absorção de **L1** ($4,25 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re1** ($1,5 \times 10^{-5}$ M, baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,13; 0,17; 0,23 e 0,33 mM para **L1**; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05; 0,07; 0,10; 0,14; 0,21 e 0,40 mM para **Re1**) em tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 7,4).

Verificou-se também que quando a concentração de ADN aumentava o ombro a 470 nm ia perdendo intensidade. Este ombro é geralmente atribuído à presença de espécies

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

diméricas resultantes da associação em solução dos anéis aromáticos do AO, sendo a sua formação menos provável quando os compostos se encontram ligados ao ADN. Esta deverá ser a razão pela qual este ombro diminuiu de intensidade à medida que se adicionava ADN.

A forma e intensidade da banda a 506 nm permaneceram constantes, indicando que as espécies **L1** e **Re1** actuam provavelmente como monómeros intercalados sem qualquer interação entre si. A existência de uma carga positiva no intercalador tem demonstrado ser essencial para a intercalação de pequenos compostos aromáticos tal como benzeno e naftaleno, uma vez que estes compostos só intercalam no ADN se possuírem uma carga positiva numa cadeia lateral substituída.⁵⁷

Para além do modo de intercalação dos compostos em estudo, pensamos que existe ainda uma interação electrostática entre os compostos e o ADN. Esta interação deverá ser estabelecida entre as aminas alifáticas e aromáticas protonadas a pH fisiológico, e as cargas negativas dos grupos fosfato da dupla cadeia.

Os espectros de UV-Visível obtidos nos estudos realizados com os compostos **L2** e **Re2** são apresentados na figura 2.17. Da análise desses espectros verifica-se que o máximo de absorção ocorre sempre a 359 nm. Concentrações crescentes de ADN não provocaram nenhum desvio batocrómico provocando unicamente uma diminuição na absorvância (hipocroísmo) nunca se atingindo a saturação. Estes resultados sugerem que não existe intercalação e que deverá existir unicamente uma interação electrostática entre as aminas alifáticas, protonadas ao valor do pH de trabalho, e o ADN.⁷⁷ Estes resultados pareciam indicar que **L2** e **Re2** tinham pouca afinidade para interagir com o ADN por intercalação da unidade cromófora entre os pares de base.

2. Ligandos e Complexos de Rênio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

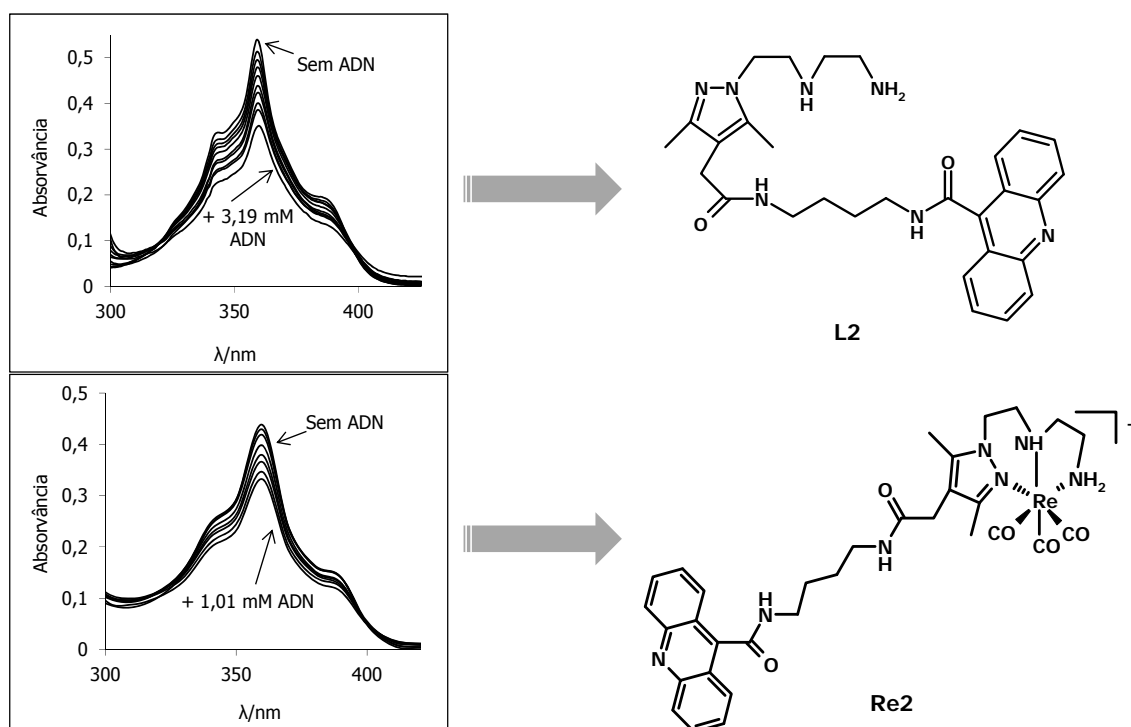


Figura 2.17: Espectros de absorção de **L2** ($6,5 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re2** ($4,94 \times 10^{-5}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,12; 0,48; 0,90; 1,29; 1,64; 1,96; 2,31; 2,79 e 3,19 mM para **L2**; 0,26; 0,40; 0,47; 0,54; 0,61; 0,72 e 1,01 mM para **Re2**) em tampão TRIS-HCl (0,1M, pH 7,4).

2.6.2 Espectroscopia de Fluorescência

Nos estudos por espectroscopia de fluorescência foram adicionadas quantidades crescentes de uma solução de ADN em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4) a soluções dos compostos **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** no mesmo solvente. As amostras foram deixadas a equilibrar durante 1 min, após o que cada uma delas foi excitada e medida a intensidade de fluorescência emitida.

As soluções com os compostos **L1** e **Re1** foram excitadas a 470 nm e as soluções com os compostos **L2** e **Re2** foram excitadas a 359 nm. Idealmente, o c.d.o. de excitação deveria corresponder a um ponto isobéptico, ou seja, quando a variação da densidade óptica é independente da concentração da amostra. Contudo, tal não sucedeu em nenhum dos casos,

2. Ligandos e Complexos de Rênio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

pelo que, para além da correcção do factor de diluição das amostras, fez-se também a correcção dos valores experimentais tendo em conta a densidade óptica registada após cada adição da solução de ADN, ao valor do c.d.o. de excitação dos compostos.

Os espectros obtidos para os compostos **L1** e **Re1** são apresentados na figura 2.18.

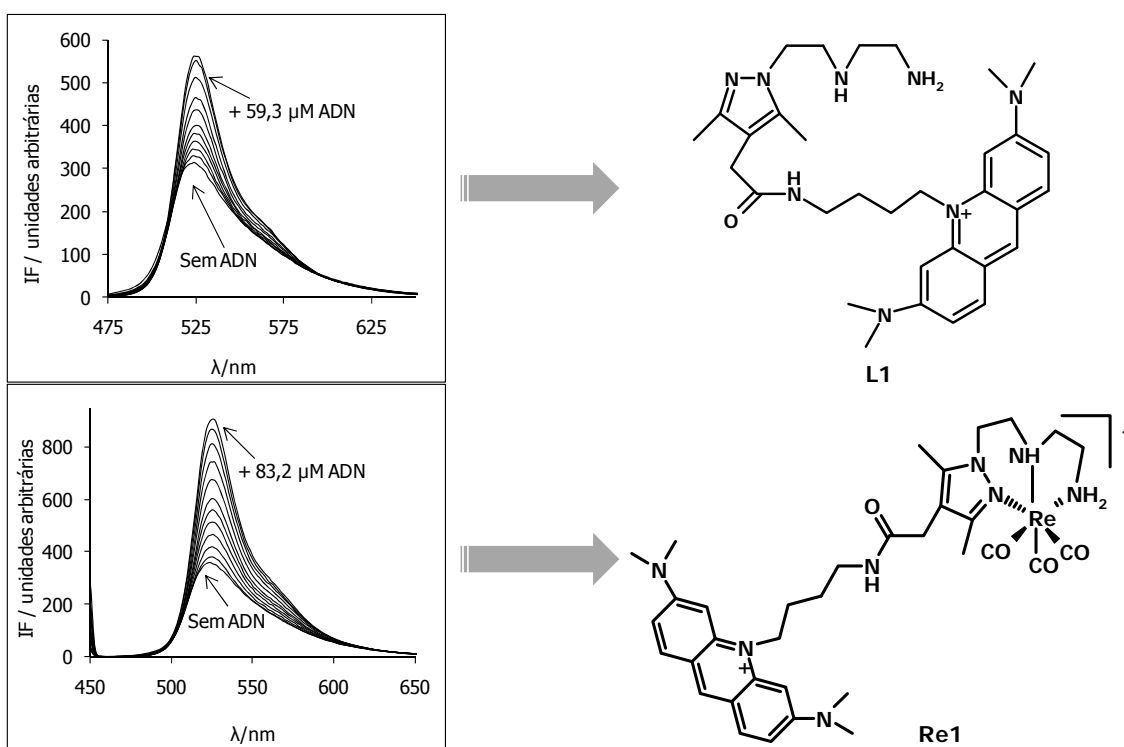


Figura 2.18: Espectros de fluorescência de **L1** ($1,06 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re1** ($1,5 \times 10^{-6}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (5,5; 8,4; 11,1; 13,9; 16,6; 21,5; 26,4; 36,0; 50,1 e 59,3 μ M para **L1**; 4,0; 7,8; 11,7; 15,5; 19,3; 23,1; 30,1; 37,0; 50,6; 70,4 e 83,2 μ M para **Re1**) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4). Excitação a 470 nm.

Da análise desses espectros concluímos que a adição de ADN provocava um aumento da intensidade de fluorescência até que se atingiu a saturação. De acordo com o que está descrito na literatura, este comportamento indica que existe uma associação forte dos compostos **L1** e **Re1** ao ADN por intercalação do AO na dupla hélice da macromolécula.^{74,75}

Alberto e colaboradores descreveram resultados semelhantes quando estudaram a interação com o ADN de um complexo de rénio contendo um derivado do AO.³⁵

No caso dos compostos **L2** e **Re2** a adição de quantidades crescentes de ADN levou a uma diminuição da fluorescência emitida (*quenching*) (Fig. 2.19). O *quenching* observado nestes estudos poderá ser devido à transferência rápida de um e⁻ das bases do ADN para o cromóforo.^{78,79} Contudo, particularmente para **Re2** observa-se apenas uma ligeira diminuição da fluorescência emitida o que poderá indicar uma fraca afinidade do composto para o ADN, tal como observámos nos estudos de espectroscopia de UV-Visível (secção 2.6.1.).

Resultados semelhantes foram descritos por outros autores.^{80,81} Denny e colaboradores estudaram a interação com o ADN de uma diacridina com uma cadeia espaçadora que continha uma função amida. Estes autores verificaram que a presença do grupo funcional amida afectava a geometria do complexo ADN-composto, levando a uma diminuição da afinidade do composto para interagir com o ADN.⁸¹ Dey e colaboradores observaram um comportamento semelhante quando estudaram o composto 9-ACA. Estes autores consideraram que tal resultado se devia provavelmente ao facto do grupo amida existente no 9-ACA adquirir coplanaridade com a unidade aromática não havendo uma transferência electrónica significativa.⁸⁰

2. Ligandos e Complexos de Rênio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

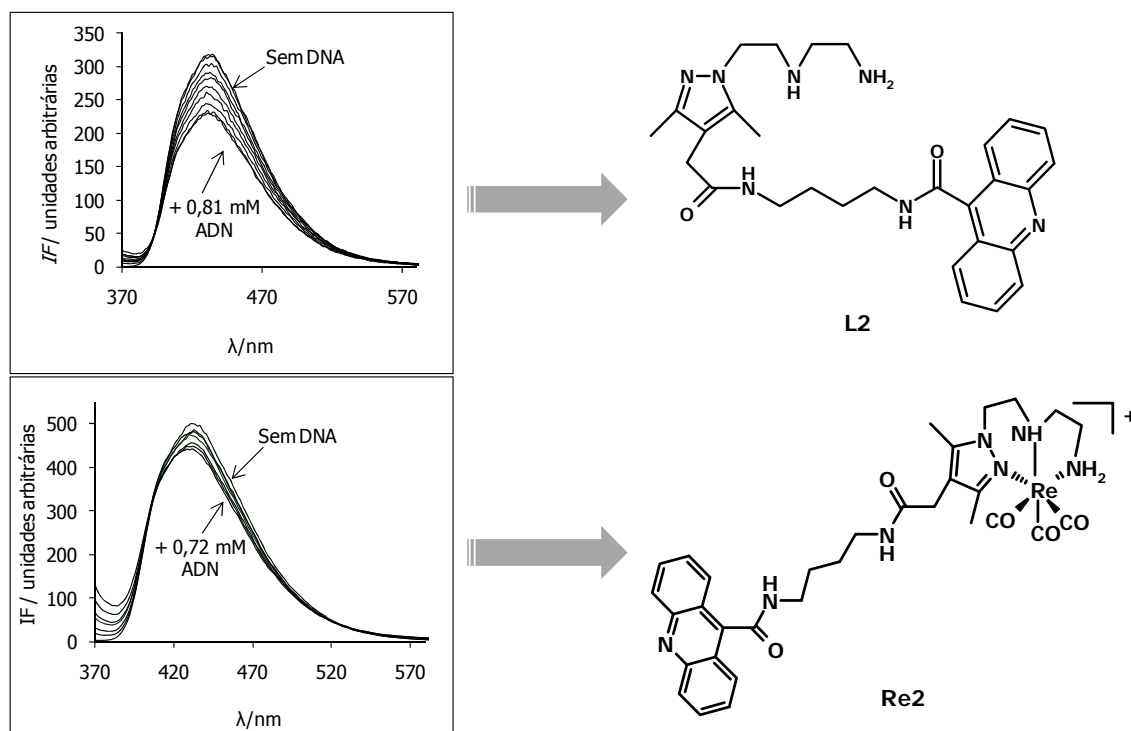


Figura 2.19: Espectros de fluorescência de **L2** ($1,3 \times 10^{-5}$ M, em cima) e **Re2** ($9,9 \times 10^{-6}$ M, em baixo) na presença de concentrações crescentes de ADN (0,20; 0,29; 0,37; 0,44; 0,53; 0,61; 0,68; 0,75 e 0,81 mM para **L2**; 0,02; 0,06; 0,13; 0,29; 0,55 e 0,72 mM para **Re2**) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4). Excitação a 359 nm.

2.6.3. Dicroísmo Circular

Nos estudos de dicroísmo circular (CD) foram adicionadas quantidades crescentes de soluções dos compostos **L1** e **Re1** em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4) a uma solução de ADN no mesmo solvente. As amostras foram deixadas a equilibrar durante 1 min e foram registados os respectivos espectros de CD.

Por CD são detectadas variações na conformação tridimensional das moléculas em estudo. A dupla hélice do ADN apresenta espectro de CD entre 200-300 nm. A ligação de cromóforos aquirais à dupla hélice do ADN resulta frequentemente em dicroísmo circular induzido (CDI) devido à interação entre as duas entidades.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Devido à sua natureza aquiral tanto o ligando **L1** como o complexo **Re1** em solução não apresentam qualquer sinal de CD na sua zona de absorção, isto é entre 400-600 nm. No entanto, estes compostos em presença do ADN originaram sinais de CDI, na zona de absorção do cromóforo, como resultado da estreita proximidade entre estes e o ADN (Fig. 2.20). Quando se adicionaram apenas 0,2 equivalentes de **L1** ou **Re1** ao ADN observou-se uma banda positiva a 516 nm e duas bandas negativas a 475 nm e a 489 nm cujas intensidades aumentaram fortemente com o aumento da concentração do cromóforo. Estes resultados são certamente devidos à intercalação de **L1** e **Re1** no ADN, se tivermos em conta espectros de CDI obtidos em estudos de interação do AO com o ADN, anteriormente descritos.⁷⁵ Fredericq e colaboradores estudaram a interação do AO com o ADN por CD.⁷⁵ Nestes estudos os investigadores observaram uma banda positiva a 510 nm e duas bandas negativas a 470 e 485 nm. Todas as bandas estavam relacionadas com uma forte interação com o ADN, que tudo indicava ser por intercalação.⁷⁵

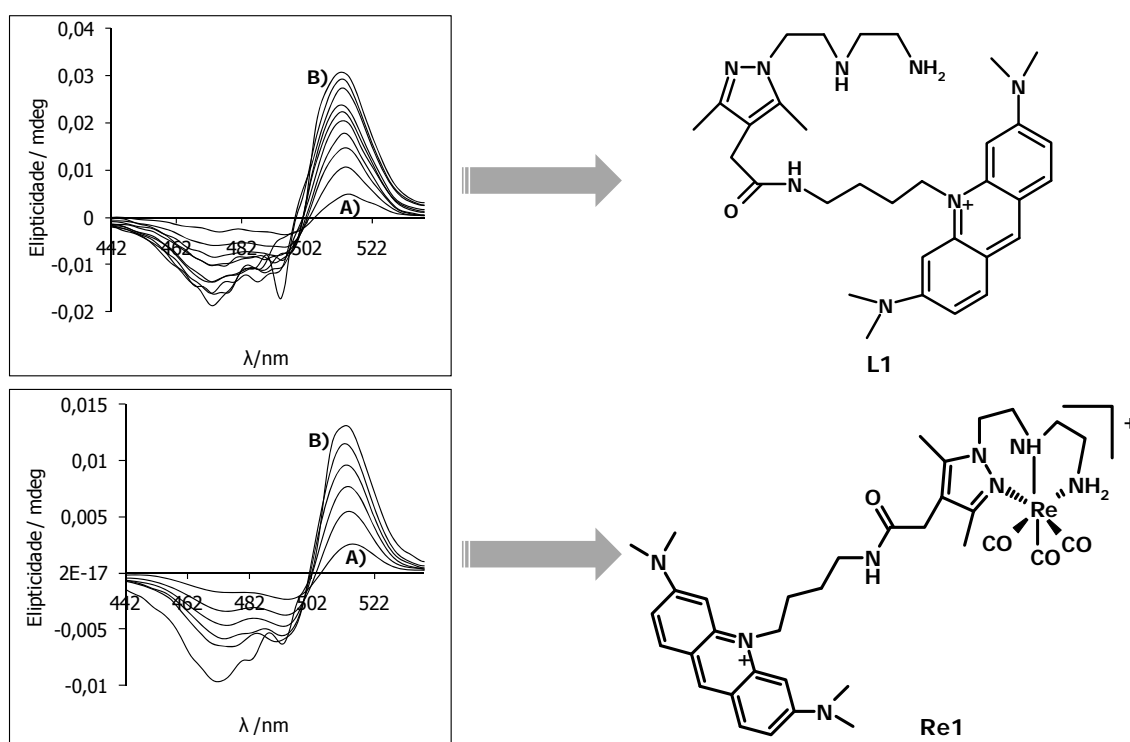


Figura 2.20: Espectros de CD induzido (CDI) para os compostos **L1** (em cima) e **Re1** (em baixo) em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4) em presença de várias razões composto/ADN, para uma concentração de ADN de $2,5 \times 10^{-5}$ Mnucl⁻¹: A) 0,2 eq. de composto; B) 2 eq. de composto.

Os espectros de CD dos compostos **L2** e **Re2** não mostraram qualquer alteração após a adição do ADN. Este resultado parece indicar que a interação destes compostos com o ADN é muito fraca, não originando qualquer sinal de CDI.

2.6.4. Dicroísmo Linear

Os estudos de dicroísmo linear (LD) dão informação sobre a orientação espacial das moléculas em estudo em relação à dupla hélice do ADN, sugerindo se os compostos estão intercalados (perpendicular ao ADN) ou ligados aos grupos fosfato (paralelo ao ADN). O espectro de LD reduzido (LDr) fornece ainda informação sobre a orientação do composto em estudo, relativamente às bases do ADN e permite distinguir entre uma ligação homogénea ou heterogénea.

Nestes estudos foram adicionadas quantidades crescentes de soluções de **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2) a uma solução de ADN no mesmo solvente.

Começámos por registar o espectro de LD do ADN na ausência dos compostos em estudo e posteriormente registámos os espectros para diferentes relações molares composto/ADN. Verificámos que a adição dos compostos **L1** e **Re1** induzia um aumento na intensidade do sinal para a banda do ADN (230-300 nm) o que indicava que a orientação desta molécula com o campo hidrodinâmico era favorecida após ligação aos compostos (Fig. 2.21). Estes resultados também sugeriam que os compostos interagiam com o ADN por intercalação. Adicionalmente, o valor praticamente constante do LDr entre 400-550 nm confirmava uma intercalação perfeita dos compostos **L1** e **Re1** no ADN. Resultados similares foram descritos por Alberto e colaboradores quando estudaram a interação de um ligando derivado do AO e do respectivo complexo de rénio com o ADN. Estes autores também concluíram que os compostos interagiam com o ADN por intercalação.³⁵

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

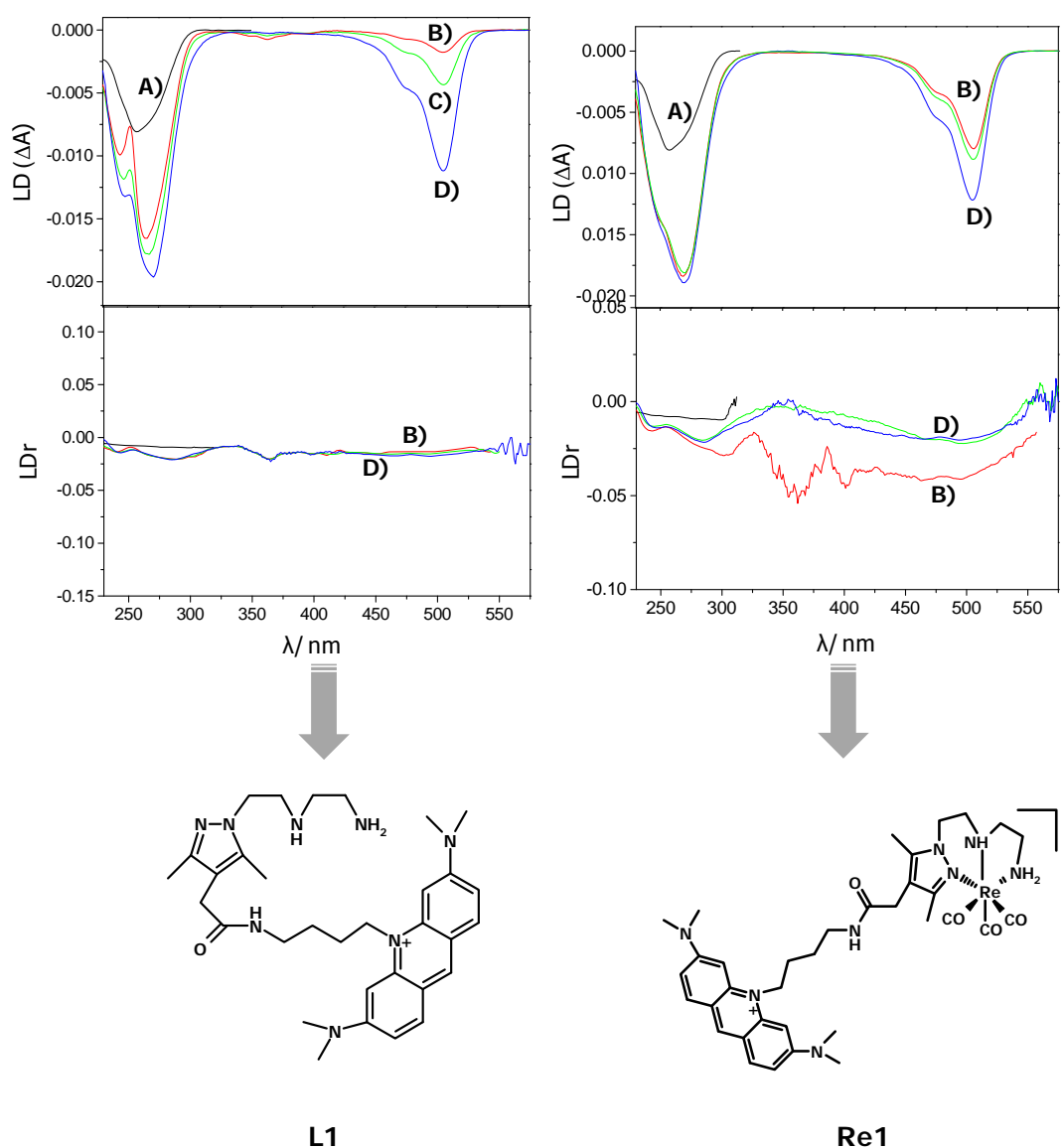


Figura 2.21: Espectros de LD e LDr dos compostos **L1** (à esquerda) e **Re1** (à direita) para diferentes razões molares composto/ADN: A) sem composto; B) 0,04 eq. de composto; C) 0,08 eq. de composto; D) 0,2 eq. de composto. Os espectros foram registrados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2).

A adição de soluções dos compostos **L2** e **Re2** em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2) a uma solução de ADN no mesmo solvente originou uma banda negativa na zona de absorção do cromóforo (300-400 nm) (Fig. 2.22). Contudo, mesmo para a concentração mais baixa dos compostos (situação em que idealmente todas as moléculas estariam intercaladas) a

2. Ligandos e Complexos de Rênio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

intensidade da banda negativa é muito menor do que a intensidade das bandas induzidas pelos compostos **L1** ou **Re1**. Estes resultados confirmam uma vez mais que os compostos **L2** e **Re2** têm uma baixa afinidade para o ADN em comparação com **L1** ou **Re1**. Contudo, a presença das bandas negativas sugere que **L2** e **Re2** poderão intercalar na dupla hélice do ADN. No entanto, o sinal de LDr nesta gama do espectro varia significativamente com o c.d.o. e apresenta uma intensidade maior do que o sinal obtido para o ADN isolado, sugerindo uma intercalação parcial. Intercalação parcial, por LD, foi também descrita anteriormente para um complexo de rênio contendo um derivado do antraceno.³⁴

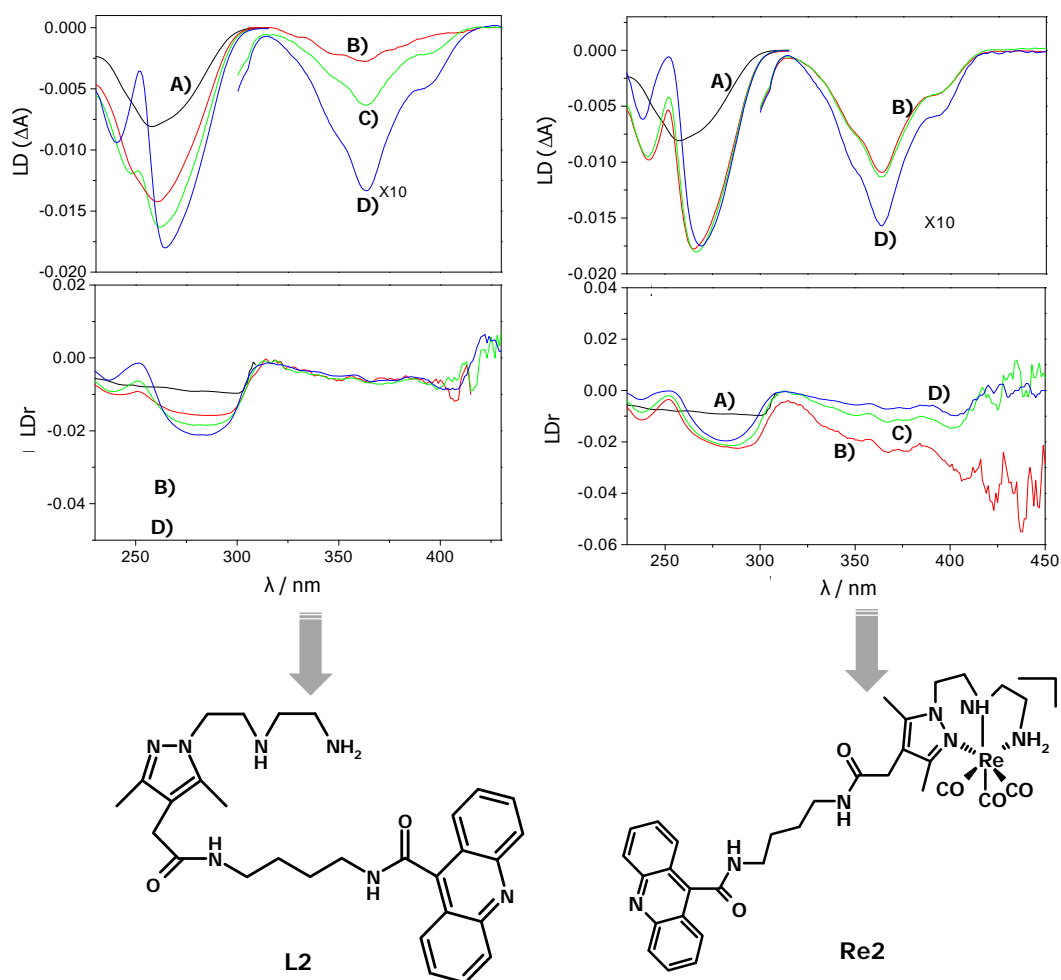


Figura 2.22: Espectros de LD e LDr dos compostos **L2** (à esquerda) e **Re2** (à direita) para diferentes razões molares composto/ADN: A) sem composto; B) 0,04 eq. de composto; C) 0,08 eq. de composto; D) 0,2 eq. de composto. Os espectros foram registados em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2).

2.6.5. Determinação das Constantes de Ligação ao ADN

Modelos para determinação da constante de ligação ao ADN

A constante de ligação (K) de um composto ao ADN pode ser calculada com base nos estudos de UV-Visível e fluorescência, após correção dos dados experimentais tendo em conta o factor de diluição das soluções e utilizando os modelos matemáticos de Scatchard⁶⁸, Kaminoh⁸² ou McGhee von Hippel.⁸³ Utilizando o método de McGhee von Hippel é também possível determinar o parâmetro n que é a distância, em pares de bases, entre duas moléculas consecutivas de intercalador.

Com base nos estudos de CD podemos também determinar as constantes de ligação de um composto ao ADN, mas neste caso os cálculos são realizados por ajuste de um modelo matemático ao programa PSEQUAD.⁸⁴

Modelo de Scatchard

A constante de ligação (K) entre as moléculas estudadas e a dupla hélice do ADN foi calculada com base nos estudos de espectroscopia de UV-Visível, aplicando a equação de Scatchard (1), na qual D é a concentração de ADN em pares de base, $\Delta\epsilon_{ap}=[\epsilon_a-\epsilon_F]$ e $\Delta\epsilon=[\epsilon_B-\epsilon_F]$.

$$\frac{D}{\Delta\epsilon_{ap}} = \frac{D}{\Delta\epsilon} + \frac{1}{\Delta\epsilon K} \quad (1)$$

O valor de ϵ_a corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração do composto em estudo ($Abs_{obs}/[composto]$); ϵ_B e ϵ_F correspondem aos coeficientes de extinção do composto ligado ao ADN (na saturação) ou livre em solução, respectivamente. A partir da representação de $D/\Delta\epsilon_{ap}$ em função de D determinou-se o valor de K para L1 (Fig. 2.23).

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

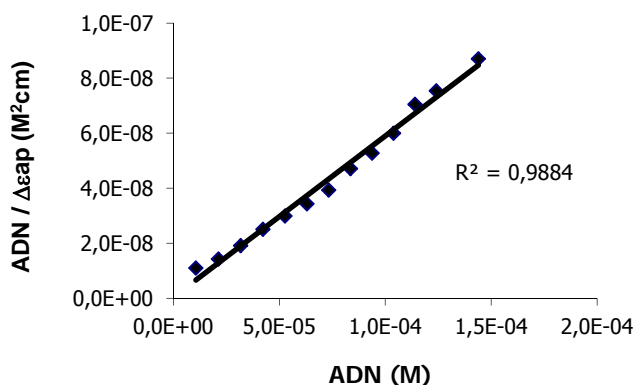


Figura 2.23: Variação da absorvância de L1 em função da concentração de ADN: ajuste ao modelo de Scatchard (1).

Também se aplicou o modelo de Scatchard aos dados obtidos nos estudos de fluorescência, utilizando a equação 2, na qual D é a concentração de ADN em pares de base, $\Delta A_{ap} = [A_a - A_f]$ e $\Delta A = [A_B - A_F]$.

$$\frac{D}{\Delta A_{ap}} = \frac{D}{\Delta A} + \frac{1}{\Delta AK} \quad (2)$$

Considerou-se que o valor de A_a correspondia à razão entre a área do espectro de fluorescência calculada e a concentração do composto em estudo ($A_{obs}/[\text{composto}]$); A_B e A_F correspondem às áreas dos espectros de fluorescência do composto ligado ao ADN (na saturação) ou livre em solução, respectivamente. A partir da representação de $D/\Delta A_{ap}$ em função de D determinou-se o valor de K, à semelhança do que foi feito para as titulações no UV-Visível.

Modelo de Kaminoh

O modelo de Kaminoh é aplicado a qualquer tipo de partição entre duas fases. Neste trabalho considerou-se que as duas fases correspondiam aos compostos livres em solução e ligados ao ADN, não havendo qualquer separação física entre elas. A extensão da interação dos compostos com o ADN foi então avaliada de uma forma quantitativa. O parâmetro a ser

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

medido engloba a contribuição da forma livre e ligada ao ADN. Isto implica que as medidas sejam obtidas para várias concentrações de ADN, o que é conseguido por adição de alíquotas de uma solução mais concentrada. Neste caso, o parâmetro que é medido apresenta uma variação hiperbólica com a concentração de ADN. De forma a ter-se uma correcta distribuição dos erros experimentais, e com o auxílio de programas computacionais, todas as equações lineares deveriam ser submetidas a um ajuste não linear dos dados uma vez que a linearização pode contribuir para influenciar os resultados. A aplicação deste modelo é limitada a sistemas em que o meio provoque pouca dispersão da luz para que se possam distinguir as fracções livre e ligada que possuem diferentes coeficientes de extinção molar.

A espectroscopia de UV-Visível baseia-se na variação da absorvância após interacção dos compostos com o ADN, podendo os dados ser ajustados à equação 3.

$$Abs = \frac{A_0 + K[ADN]A_{sat}}{1 + K[ADN]} \quad (3)$$

À medida que a concentração do cromóforo e a sua absorvância em solução, A_0 , são conhecidas, o valor limite na saturação, A_{sat} , pode ser calculado a partir da representação gráfica de Abs vs [ADN] (Fig. 2.24).

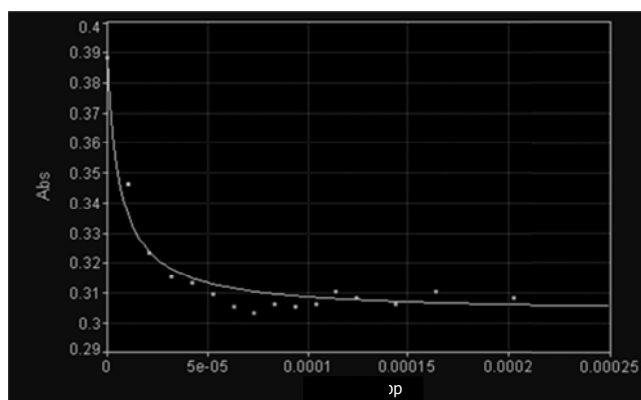


Figura 2.24: Variação da absorvância de L1 em função da concentração de ADN. A curva representa um ajuste não linear à equação 3.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas espectroscópicas mais sensíveis, uma vez que podem ser utilizadas concentrações muito baixas de cromóforos. O ajuste dos dados obtidos à equação 4 pode ser feito desde que ocorra variação nas propriedades dos compostos quando estão na forma livre ou ligada ao ADN.

$$IF = \frac{I_0 + K[ADN]I_{sat}}{1 + K[ADN]} \quad (4)$$

À medida que a intensidade de fluorescência (IF) e a concentração do cromóforo são conhecidas, o valor limite na saturação, I_{sat} , pode ser calculado a partir da representação gráfica de IF vs [ADN] (Fig. 2.25).

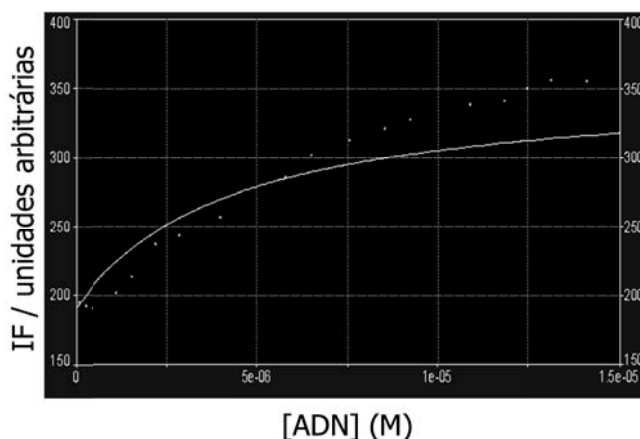


Figura 2.25: Variação da intensidade de fluorescência de L1 em função da concentração de ADN. A curva representa um ajuste não linear à equação 4.

Modelo de McGhee von Hippel

O modelo de McGhee von Hippel tem sido considerado o mais adequado para determinar constantes de ligação de compostos que interagem com o ADN por intercalação. Para a determinação de K e do parâmetro n , que reflecte o número de locais de ligação que não estão disponíveis devido à ligação de uma molécula intercaladora à cadeia de ADN, representa-se r/C_F em função de r e faz-se um ajuste, não linear dos dados, à equação 5.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

$$r/C_F = K(1-nr)[(1-nr)/[1-(n-1)r]]^{n-1} \quad (5)$$

C_F representa a concentração dos compostos livres e o valor de r é dado pela expressão $r = C_B / [\text{ADN}]$, em que C_B é a concentração dos compostos ligados ao ADN.

Primeiramente, é necessário determinar o parâmetro C_F pela equação 6 em que C_T representa a concentração total de composto, sendo A e A_0 as áreas dos espectros de fluorescência obtidos na presença e ausência de ADN, respectivamente.

$$C_F = C_T(A/A_0)/(1-P) \quad (6)$$

O parâmetro P é obtido por extrapolação da ordenada na origem da representação de A/A_0 vs $1/[\text{ADN}]$. A concentração do composto ligado (C_B) é dada pela expressão $C_B = C_T - C_F$. O ajuste à equação 5 encontra-se exemplificado na figura 2.26 para o composto **L1**. Um bom ajuste ao modelo de McGhee von Hippel é indicação de que as moléculas em estudo interagem com o ADN por um processo de intercalação.

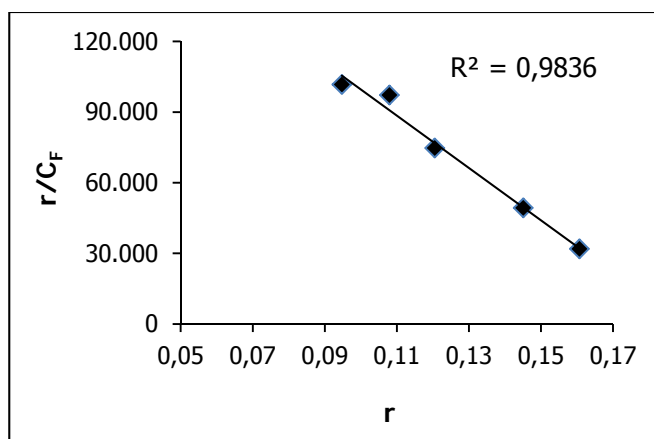


Figura 2.26: Ajuste de McGhee von Hippel para os dados de fluorescência obtidos para **L1**.

As constantes de ligação ao ADN para os compostos **L1** e **Re1** determinadas pelos métodos acima descritos encontram-se indicadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Constantes de ligação ao ADN para os compostos **L1** e **Re1**.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Técnica Espectroscópica	Modelo Matemático	K x 10 ⁵ (M ⁻¹)	
		L1	Re1
UV-Visível	Scatchard	1,71 ± 0,01	2,50 ± 0,01
	Kaminoh	1,75 ± 0,15	2,33 ± 0,39
Fluorescência	Scatchard	1,53 ± 0,01	2,26 ± 0,01
	Kaminoh	1,93 ± 0,22	2,36 ± 0,02
	McGhee von Hippel	1,93 ± 0,86 ; n = 2,7	1,17 ± 0,68 ; n = 17,8
CD	PSEQUAD	2,04 ± 0,11	2,34 ± 0,11

As constantes de ligação ao ADN para compostos orgânicos que intercalam variam entre 10⁴ - 10⁶ M⁻¹ e são geralmente inferiores às constantes de ligação de compostos que se ligam aos sulcos da macromolécula (10⁵ - 10⁹ M⁻¹).⁵⁷

Como já foi referido, o AO liga-se ao ADN por duas formas diferentes: uma de energia mais elevada, considerada intercalação, e outra, de energia mais baixa, que resulta da interação electrostática entre o composto e o exterior da molécula de ADN. Este intercalador apresenta uma constante de afinidade para o ADN que varia entre 5 x 10⁴ M⁻¹ e 1,8 x 10⁵ M⁻¹ com um valor para o parâmetro *n* entre 2 e 3.^{74,85,86}

Para o composto **L1** os valores de K e de *n* calculados pelo modelo de McGhee von Hippel foram de (1,93 ± 0,86) x 10⁵ M⁻¹ e 2,7, respectivamente. Estes valores são comparáveis aos descritos na literatura para o AO, particularmente no que se refere ao parâmetro *n*. Tendo em conta resultados descritos na literatura, os valores de K e *n* encontrados para **L1** são consistentes com a existência de um processo de intercalação^{74,85,86} como se tem vindo a discutir neste capítulo. Por outro lado, o valor de *n* encontrado para **Re1** (17,8) era muito elevado não sendo consistente unicamente com intercalação. Este resultado pode ser devido à presença de diferentes modos de ligação ao ADN na gama de concentrações necessárias para se atingir a saturação. De facto, nos estudos de fluorescência, para o composto **L1** atingiu-se a condição de saturação para uma concentração de ADN mais baixa (59,3 μM) do que para **Re1** (83,2 μM). Uma vez que o complexo **Re1** tem uma carga global de +2 pensamos que, para

além da intercalação, poderão existir também interações electrostáticas entre **Re1** e os grupos fosfato do ADN. Estas interações adicionais poderão ser responsáveis por ser necessária uma concentração de ADN mais elevada para se atingir a saturação. Rodger e colaboradores descreveram uma situação análoga para um derivado do antraceno.⁸⁷ Estes autores verificaram que para atingir a condição de saturação era necessária uma razão ADN:composto de 30:1, sendo $n = 8$. Pyle e colaboradores também descreveram o estudo de complexos de ruténio (II), que à semelhança do AO, interactuam por intercalação e por interações electrostáticas com o exterior da dupla hélice.⁸⁸ Para estes complexos os autores também encontraram para o parâmetro n valores entre 2 e 12. Contudo, a constante de ligação encontrava-se na gama de valores esperados ($10^3 \leq K \leq 10^5$) M^{-1} .

Tendo em conta o elevado valor de n encontrado para **Re1**, pelo modelo de McGhee von Hippel, fomos calcular para este complexo as constantes de ligação (K) aplicando os modelos matemáticos de Scatchard e Kaminoh aos dados obtidos nos estudos de UV-Visível e fluorescência. Recorremos também ao programa matemático PSEQUAD para tratar os dados de CD.

Como se pode ver na tabela 2.1, os valores de K calculados para **Re1** por estes modelos matemáticos encontram-se na gama $(2,26 \pm 0,01) \times 10^5 M^{-1}$ - $(2,50 \pm 0,01) \times 10^5 M^{-1}$, valores que são mais elevados do que os determinados para **L1** [$(1,53 \pm 0,01) \times 10^5 M^{-1} \leq K \leq (2,04 \pm 0,11) \times 10^5 M^{-1}$]. Esta diferença parece também indicar que **Re1**, para além de intercalar, estabelece também interações electrostáticas com o exterior do ADN, comportamento que pode ser devido à sua carga global elevada (+2).

Para os compostos **L2** e **Re2** não foi possível aplicar nenhum dos modelos matemáticos referidos. Nas titulações de UV-Visível e fluorescência, as variações observadas (diminuição da absorvância e da fluorescência) eram devidas essencialmente ao factor diluição das amostras. Por CD não se registou qualquer espectro de CDI na zona de absorção do cromóforo e por LD embora se observasse alguma interação com a macromolécula ela seria fraca, não predominando a intercalação.

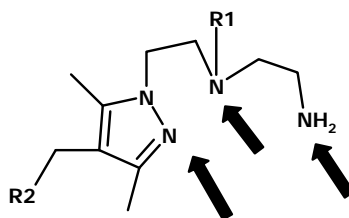
2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Este comportamento poderá ser explicado pelo facto de a unidade intercaladora comum a **L2** e **Re2** possuir uma função amida na posição 9 da acridina. De acordo com a literatura, este grupo terá que sofrer uma rotação antes de intercalar entre os pares de base. Rotação que pode ser dificultada por impedimentos estereoquímicos.⁷⁹ Provavelmente, a presença de um substituinte amina nessa posição, protonado a pH neutro, conferiria ao composto uma carga positiva que ao se deslocalizar no anel iria favorecer a intercalação no ADN.^{89,90}

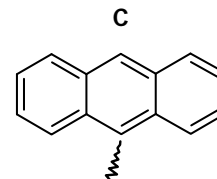
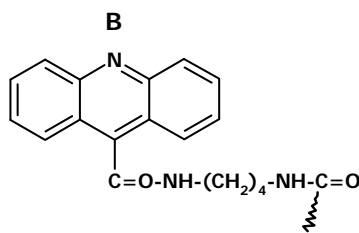
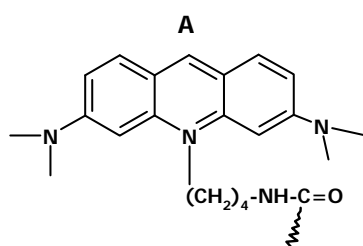
2.7. Conclusões

Como indicado no esquema 2.12, foram sintetizados e caracterizados vários ligandos pirazolo-diamina funcionalizados com diferentes intercaladores, através da posição 4 do anel de pirazolilo, e com ou sem um braço butírico ligado à amina secundária da unidade pirazolo-diamina.

Esquema 2.12



pirazolo-diamina
(as setas indicam os locais de coordenação ao centro metálico)

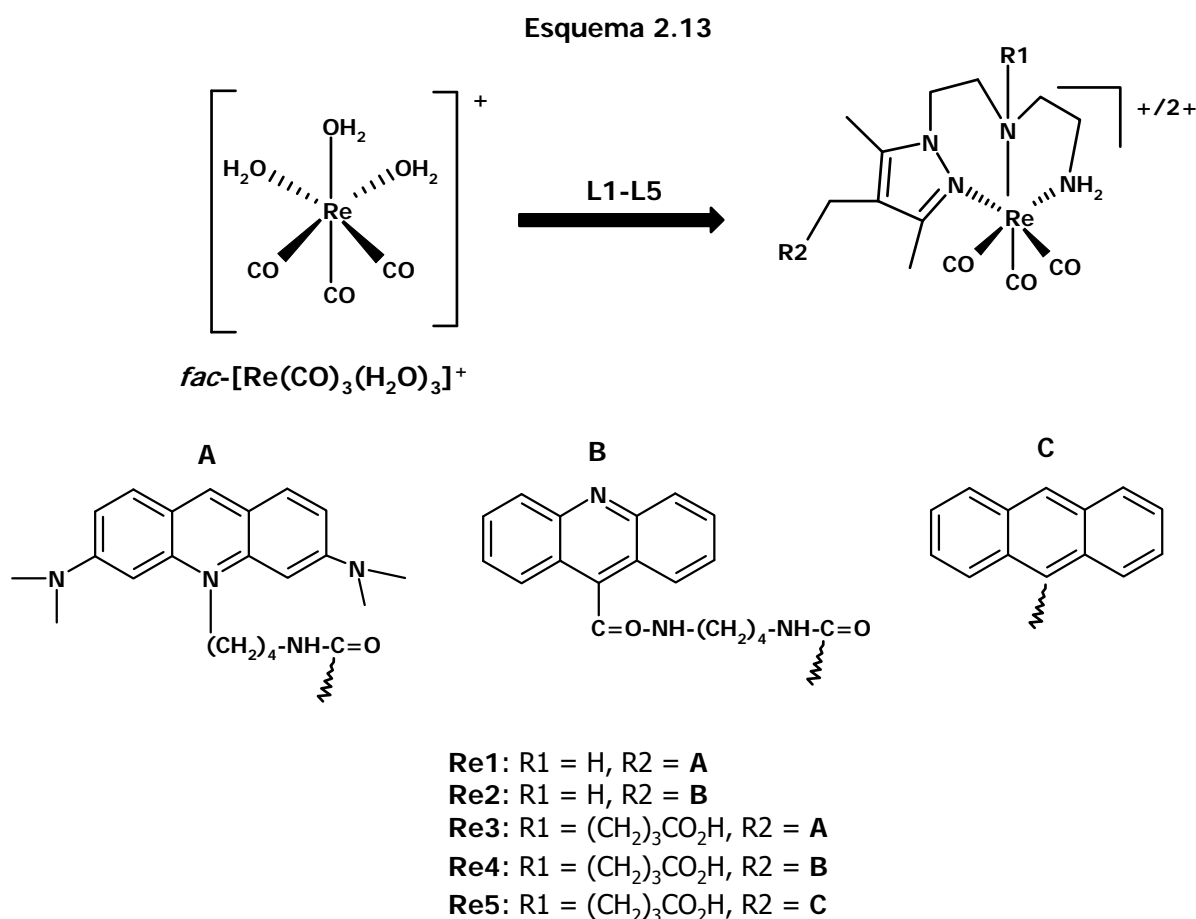


- L1: R1 = H, R2 = A
- L2: R1 = H, R2 = B
- L3: R1 = (CH₂)₃CO₂H, R2 = A
- L4: R1 = (CH₂)₃CO₂H, R2 = B
- L5: R1 = (CH₂)₃CO₂H, R2 = C

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Os intercaladores estudados foram o alaranjado de acridina (AO), o 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA) e o antraceno, cujas características de absorção e emissão permitiram estudar a interação com o ADN de alguns destes compostos e respectivos complexos de rénio, utilizando várias técnicas espectroscópicas. O braço alifático, introduzido na amina secundária da unidade pirazolo-diamina, foi o ácido butírico, cuja função era permitir a ligação da unidade pirazolo-diamina a análogos da bombesina (BBN), como se verá no capítulo 4 desta tese.

Como indicado no esquema 2.13, estudaram-se reacções do precursor *fac*-[Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ com os ligandos L1-L5 e verificámos que se formavam complexos do tipo *fac*-[Re(CO)₃(κ³-L)]⁺²⁺ (L = L1 (Re1), L2 (Re2), L3 (Re3), L4 (Re4), L5 (Re5)). Nestes complexos, caracterizados pelas técnicas normais em química inorgânica, o centro metálico estava estabilizado pelos três ligandos carbonilo e pelos três átomos de azoto da estrutura base pirazolo-diamina dos ligandos L1-L5. Os dados de RMN eram claros quanto à não existência de qualquer interação entre o centro metálico e as unidades intercaladoras (Re1 e Re2) e/ou braço carboxilato (Re3-Re5).



2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

Utilizando diferentes técnicas espectroscópicas estudámos a interacção dos compostos base **L1** e **L2** e dos respectivos complexos de rénio **Re1** e **Re2** com o ADN de timo de vitela. Com base nos dados obtidos por espectroscopia de UV-Visível e fluorescência, CD e LD concluiu-se que os compostos **L1** e **Re1** actuavam como intercaladores do ADN, enquanto os compostos **L2** e **Re2** possuíam menor afinidade para a macromolécula.

Utilizando diferentes modelos matemáticos, os resultados espectroscópicos foram utilizados para calcular as constantes de ligação ao ADN (K). Para **L2** e **Re2** não foi possível ajustar nenhum dos modelos aos dados experimentais, provavelmente devido à fraca interacção destes compostos com o ADN.

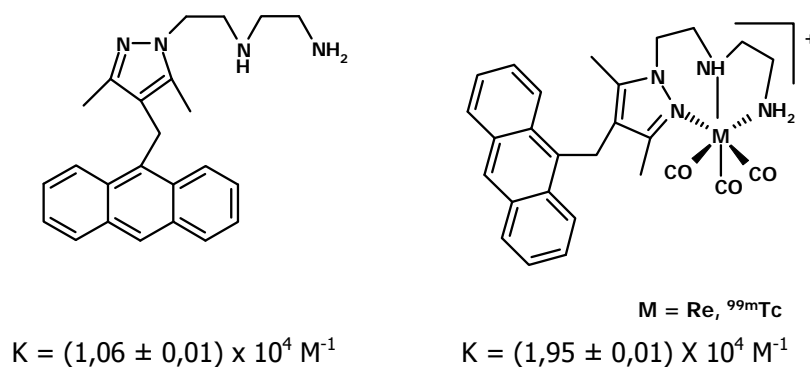
Utilizando os diferentes modelos matemáticos, verificámos que os valores de K para **L1** se situavam entre $(1,53 \pm 0,01) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $(2,04 \pm 0,11) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. No caso concreto do modelo de McGhee von Hippel, encontramos $K = (1,93 \pm 0,86) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $n = 2,7$, valores que são semelhantes e comparáveis aos descritos na literatura para a interacção do AO com o ADN.^{74,85,86}

Para **Re1** o valor de K calculado, utilizando o modelo matemático de McGhee von Hippel, foi $(1,17 \pm 0,68) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ sendo $n = 17,8$. O valor extremamente elevado de n leva-nos a dizer que o valor de K calculado por este modelo deve ser considerado com algum cuidado, uma vez que este parâmetro tão elevado pode indicar que, para além da intercalação, existem outras interacções talvez do tipo electrostático com os grupos fosfato do ADN, devido à elevada carga global de **Re1** (+2). No entanto, a aplicação dos restantes modelos matemáticos aos resultados espectroscópicos obtidos para **Re1** conduziram a valores de K que se situavam numa gama relativamente aceitável: $(2,26 \pm 0,01) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \leq K \leq (2,50 \pm 0,01) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. O facto de termos encontrado para **Re1** valores sempre mais elevados do que os determinados para **L1** pode também estar relacionado com a carga global +2 esperada para o complexo **Re1**.

2. Ligandos e Complexos de Rénio (I) Contendo Unidades Intercaladoras: Síntese, Caracterização e Estudos de Interação com ADN

A interação com o ADN dos compostos base indicados no esquema 2.14 que deram origem a **L5** e **Re5** não foi estudada pois já o tinha sido anteriormente no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.³⁴ No entanto, preparámos **L5** e **Re5** porque pretendíamos ligá-los a péptidos biologicamente activos.

Esquema 2.14



A interação com o ADN dos compostos e complexos descritos neste capítulo que contêm unidades intercaladoras e um braço butírico pendente na amina central da unidade pirazolo-diamina (**L3-L5**, **Re3-Re5**) não foi estudada, pois não fazia qualquer sentido. Como se verá no capítulo 4, a síntese e caracterização dos compostos **L3-L5** foram necessárias para que se preparassem posteriormente conjugados contendo análogos da BBN. A síntese e caracterização dos complexos de rénio correspondentes (**Re3-Re5**) foi efectuada para confirmar que a coordenação dos ligandos não era afectada pela presença de um braço carboxilato livre. Para além disso, como também veremos no capítulo 4, os complexos **Re3-Re5** eram necessários para a síntese de complexos de rénio contendo análogos da BBN.

**3. Avaliação Biológica de Complexos de
Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo
Unidades Intercaladoras**

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

3.1. Introdução

Neste capítulo iremos descrever a síntese de complexos de ^{99m}Tc análogos aos complexos de rénio (**Re1-Re5**) isolados e caracterizados no capítulo 2. Para atingir este objectivo, as estruturas quelantes anteriormente sintetizadas (**L1-L5**) irão reagir com o precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ para formar complexos do tipo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{K}^3\text{-L})]^{+/2+}$ (L = **L1-L5**). A caracterização estrutural dos complexos de ^{99m}Tc é feita comparando o seu perfil cromatográfico, obtido por HPLC, com o dos correspondentes complexos de rénio.

Seguidamente, avaliámos *in vitro* os complexos de rénio (I) e tecnécio (I), isto é, estudámos a sua interacção com ADN plasmídico e com células tumorais. No caso dos estudos com células tumorais avaliámos o efeito cito- e radiotóxico dos compostos e a sua localização celular.

A localização celular dos compostos **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** foi determinada por microscopia de fluorescência, em tempo real, tirando partido das características de emissão das diferentes unidades cromóforas presentes nas estruturas destes compostos.

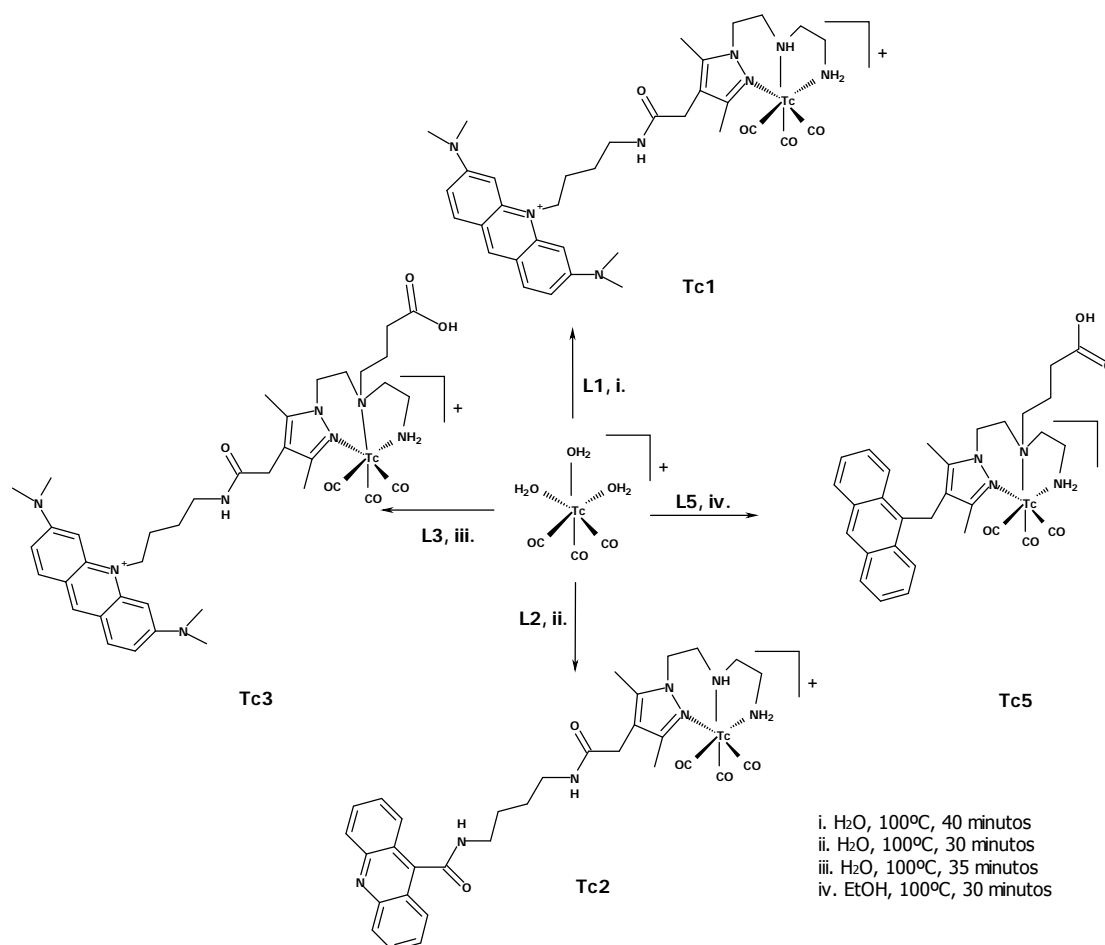
A distribuição celular observada para os complexos de rénio (I), por microscopia de fluorescência, foi quantificada em estudos realizados com os complexos análogos de ^{99m}Tc .

3.2. Síntese e Caracterização de Complexos de ^{99m}Tc (I)

O complexo de partida $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foi obtido por adição de $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, eluído de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ com uma solução de NaCl 0,9%, a um kit liofilizado que contém $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$, $\text{Na}_2(\text{tartarato})$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e Na_2CO_3 . A mistura reaccional foi aquecida a 100°C durante 30 minutos. Ao fim desse tempo, a preparação foi neutralizada com uma solução de HCl 0,1 N e a formação e pureza do complexo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foram confirmadas por HPLC.

Os complexos de ^{99m}Tc foram obtidos fazendo reagir o precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ com soluções aquosas ou etanólicas de **L1**, **L2**, **L3** ou **L5** (esquema 3.1). As condições experimentais utilizadas para a síntese dos complexos encontram-se resumidas na tabela 3.1. Nesta tabela apresentam-se também os tempos de retenção dos complexos de rénio e ^{99m}Tc , bem como os valores de $\log D_{0/w}$ calculados para os complexos radioactivos.

Esquema 3.1



3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

Tabela 3.1: Condições de síntese e características dos complexos **Tc1**, **Tc2**, **Tc3** e **Tc5**.

Complexo	C (M)	t (min)	t _{ret} (min) ^d	log D _{0/w} ± s
Tc1	3,3 × 10 ⁻⁵	40	17,92 ^a (17,69)	0,56 ± 0,02
Tc2	2,0 × 10 ⁻⁴	30	16,17 ^a (15,06)	0,74 ± 0,01
Tc3	1,4 × 10 ⁻⁴	35	16,67 ^b (16,50)	-0,48 ± 0,01
Tc5	1,4 × 10 ⁻⁴	30	19,41 ^c (18,93)	1,36 ± 0,01

^a Nucleosil 100-5 C18, 0,9 mL/min; ^b Nucleosil 100-5 C18, 1,0 mL/min; ^c Nucleosil 100-10 C18, 1,0 mL/min; ^d Os valores entre parêntesis referem-se aos complexos de rénio; C = concentração final de ligando; t = tempo de reacção; t_{ret} = tempo de retenção; log D_{0/w} = lipofilia.

Os complexos radioactivos **Tc1**, **Tc2**, **Tc3** e **Tc5** foram obtidos a pH fisiológico (pH = 7,4) com rendimentos superiores a 97% após reacção a 100°C durante 30 a 40 minutos. A pureza radioquímica dos complexos de ^{99m}Tc foi determinada por HPLC e a sua estrutura foi estabelecida comparando o seu perfil cromatográfico com o dos complexos análogos de rénio. Com base nestes resultados a estrutura proposta para os complexos de ^{99m}Tc foi *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(κ³-L)]⁺²⁺ (L = **L1** (**Tc1**), **L2** (**Tc2**), **L3** (**Tc3**), **L5** (**Tc5**)). A título exemplificativo, na figura 3.1 apresentam-se os cromatogramas de HPLC obtidos quando se procedeu à co-injecção dos complexos **Re3** e **Tc3**.

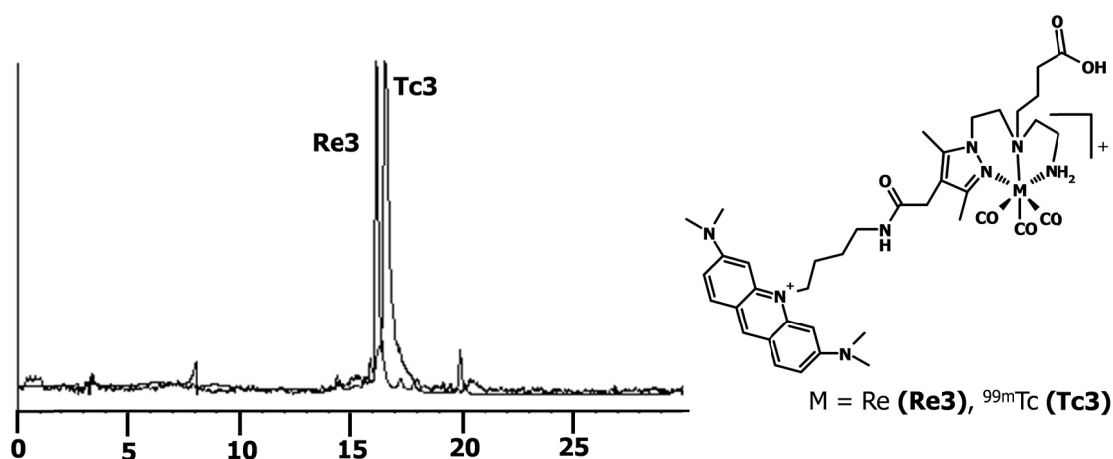


Figura 3.1: Cromatograma de HPLC obtido após co-injecção dos complexos **Re3** e **Tc3**.

(HPLC: coluna Nucleosil 100-5 C18; método: A)

O coeficiente de partição octanol/água ($\log D_{o/w}$, pH 7,4) foi determinado para os complexos de ^{99m}Tc sintetizados utilizando o método de extracções múltiplas descrito na literatura.⁹¹ Em geral, os compostos podem ser agrupados em três categorias, no que diz respeito aos valores de $\log D_{o/w}$:

- baixa lipofilia, $\log D_{o/w} \leq 1,5$
- lipofilia moderada, $1,5 \leq \log D_{o/w} \leq 4$
- lipofilia elevada, $\log D_{o/w} \geq 4$

Para os complexos estudados, **Tc1-Tc3** e **Tc5**, encontramos sempre valores inferiores a 1,5 o que indicava que todos estes complexos apresentavam uma baixa lipofilia, muito provavelmente devido à presença de vários grupos amina que se encontravam protonados ao valor de pH estudado. No caso do complexo **Tc3**, o valor de $\log D_{o/w}$ encontrado foi de $-0,48 \pm 0,01$ o que indicava um carácter hidrofílico significativo para este complexo, possivelmente devido à presença adicional de um grupo carboxilato livre.

3.3. Estudos *in vitro* de Complexos de Rénio (I) e de Tecnécio (I) com ADN Plasmídico e com Células Tumorais

3.3.1. Estudos com ADN Plasmídico

Como descrito no capítulo 2, o complexo **Re1** demonstrou ter uma elevada afinidade para o ADN pelo que se decidiu avaliar se os e^- Auger emitidos pelo complexo análogo **Tc1** provocavam danos no ADN plasmídico. Para tal, amostras dos complexos **Re1**, **Tc1** e $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ foram incubadas com ADN plasmídico (puc19) e a formação de quebras na cadeia do ADN foi avaliada por electroforese em gel de agarose. A acção do complexo **Re1** foi avaliada utilizando uma concentração de composto 10^{-8} M, uma vez que este valor corresponde aproximadamente à concentração molar do complexo **Tc1**, cujo potencial terapêutico como emissor Auger pretendemos avaliar. Desta forma poderemos excluir quaisquer efeitos de massa provocados pelo complexo **Tc1** no ADN. O composto $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ foi também avaliado para comparação visto

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

que, ao contrário de **Re1** e **Tc1**, não possui uma unidade intercaladora necessária a uma possível interacção com o ADN. Assim, comparando os resultados obtidos para **Tc1** e $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ poderemos inferir se eventuais danos provocados pelo composto **Tc1** são ou não devidos à presença do intercalador. Os compostos **Tc1** e $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ foram estudados utilizando a mesma concentração radioactiva para ambos (310 μCi e 150 μCi).

Como se pode observar na figura 3.2, para além da banda correspondente à forma superenrolada (FSE), só se observava uma outra que, por comparação com o marcador de peso molecular de ADN (*1Kb plus DNA ladder*), foi atribuída à forma circular (FC). Esta banda era mais intensa para o complexo **Tc1** (C e D) do que para o complexo inactivo **Re1** (G) ou para $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (E + F). Contudo, quer para **Re1** quer para $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ foi possível observar algum efeito, ainda que ligeiro, em relação ao que se observou para o controlo (B).

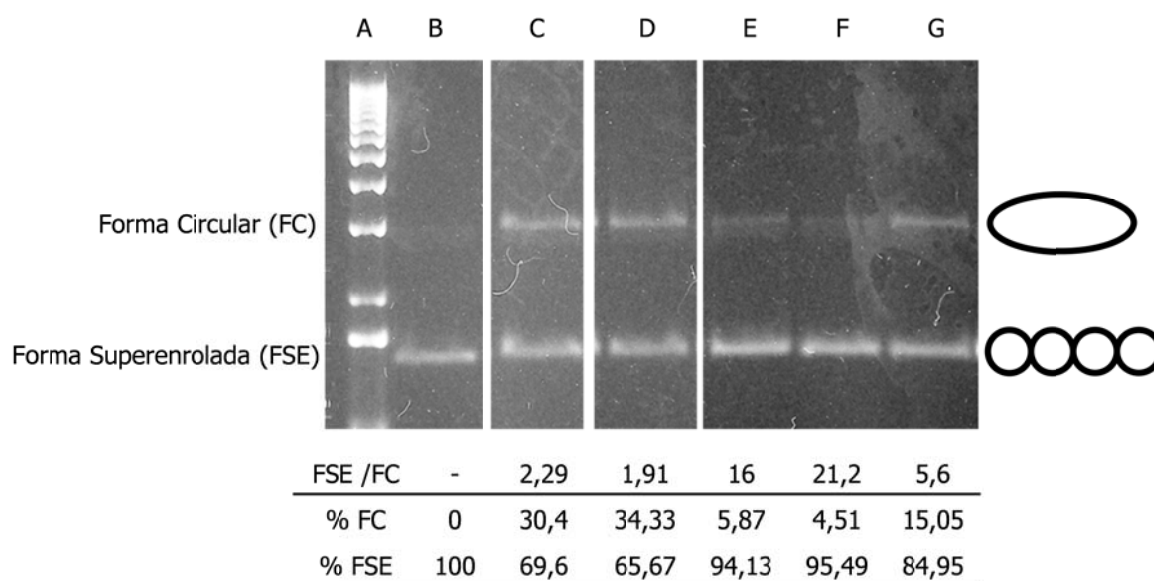


Figura 3.2: Clivagem de ADN plasmídico (puc19) após 48 horas de incubação com diferentes compostos à temperatura ambiente e em tampão Tris (pH 7,4): **A** – marcador de peso molecular de ADN – 1 Kb; **B** – controlo (ADN + tampão); **C** – ADN + **Tc1** (310 μCi); **D** – ADN + **Tc1** (150 μCi); **E** – ADN + $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (310 μCi); **F** – ADN + $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (150 μCi); **G** – ADN + **Re1** (10^{-8} M).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

Para cada um dos compostos foi quantificada a percentagem total de ADN na forma superenrolada (FSE) que se converteu na forma circular (FC) por densitometria, utilizando o programa AlphaView Software (Alpha Innotech). Dessa análise concluímos que a forma circular (FC) correspondia a mais de 30% para **Tc1**, cerca de 15% para **Re1** e menos do que 6% para $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$. Pensamos que a forma circular (FC) encontrada para $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (E e F) é muito baixa e que o seu aparecimento poderá ser devido à agitação ocasional das amostras durante o período de incubação com o ADN.

Concluiu-se então que o complexo **Tc1** apresentou uma maior facilidade para induzir quebras simples no ADN plasmídico o que pode reflectir a sua elevada afinidade para o ADN e a sua capacidade para funcionar como um intercalador perfeito, conforme concluímos no capítulo 2, quando estudámos a interacção de **Re1** com ADN por espectroscopia de UV-Visível e fluorescência, CD e LD. Contudo, **Tc1** não foi capaz de induzir duplas quebras no ADN. Provavelmente, o comprimento da cadeia butilénica entre o intercalador e o fragmento metálico favorece uma boa intercalação mas é demasiado longo para que o efeito dos e^- Auger, emitidos pelo ^{99m}Tc , se faça sentir de um modo eficiente nas bases nucleotídicas, impedindo a indução de duplas quebras na cadeia.

Estudos anteriores com compostos marcados com ^{125}I demonstraram que a proporção de quebras simples ou duplas era significativamente afectada pela distância entre o local onde decorria o decaimento e as bases do ADN.²³

3.3.2. Estudos com Células Tumoriais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1)

3.3.2.1. Estudos de Citotoxicidade e Radiotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade têm como objectivo calcular a concentração de complexo de rénio (I) que se deve utilizar na microscopia de fluorescência. Esta concentração deverá permitir visualizar claramente o percurso dos compostos, mas não deverá provocar a morte das células. Estes estudos deverão ainda garantir que os complexos de ^{99m}Tc (I), na gama de

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

concentrações utilizadas (10^{-9} – 10^{-10} M), não têm qualquer efeito citotóxico. Os estudos de citotoxicidade e radiotoxicidade foram realizados utilizando células murinas B16-F1 de melanoma e/ou células humanas PC-3 de tumor da próstata.

3.3.2.1.1. Citotoxicidade de Complexos de Rénio (I)

O efeito citotóxico dos diferentes compostos foi avaliado pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este método baseia-se na redução do MTT a formazan (cristais de cor azul insolúveis) por uma enzima presente nas mitocôndrias das células metabolicamente activas.⁹²

Soluções dos compostos em estudo em meios de cultura, com diferentes concentrações, foram adicionadas às células tumorais. Após 36 horas a 37°C, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com solução de PBS e uma solução de MTT foi adicionada. Após 3 horas a 37°C, os cristais de formazan formados foram solubilizados com DMSO e medida a absorvância das soluções a 570 nm. O número de células viáveis é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados, sendo o valor estimado com base na absorvância medida.

A título de exemplo, apresentamos nas figuras 3.3 e 3.4 os resultados obtidos para os compostos **Re1**, **L2**, e **Re2** em células B16-F1 e/ou PC-3.

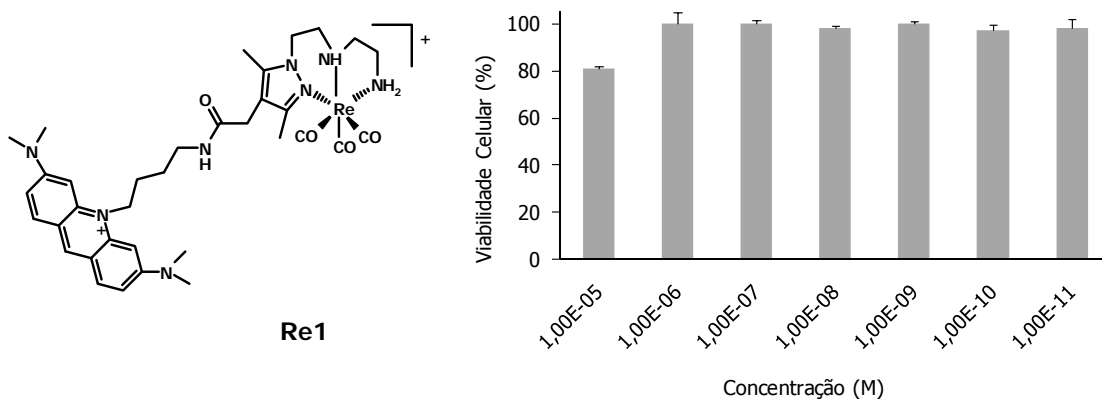


Figura 3.3: Viabilidade das células PC-3 na presença de diferentes concentrações de **Re1** após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rênio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

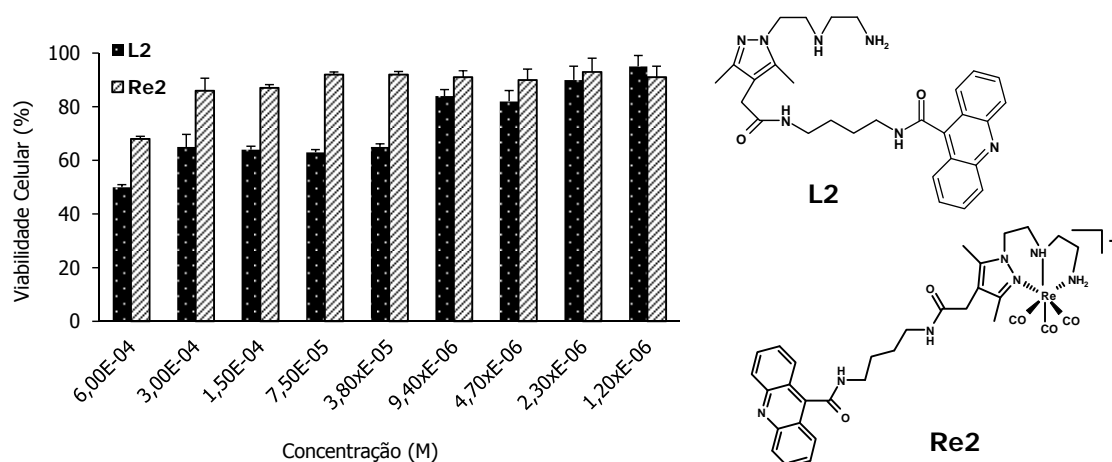


Figura 3.4: Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações de L2 e Re2 após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).

A análise destes resultados permite-nos concluir que os compostos avaliados não apresentam qualquer efeito citotóxico (viabilidade celular aproximadamente 100%) para concentrações iguais ou inferiores a 10^{-6} M. Convém ainda referir que estes resultados foram obtidos após períodos de incubação muito mais longos (36 horas) do que os que irão ser utilizados nos ensaios de microscopia de fluorescência (3 horas). De qualquer modo, avaliámos também a viabilidade das células B16-F1 e PC-3 após 3 horas de incubação com os compostos L1, L2, Re1 e Re2 utilizando uma concentração de 7×10^{-5} M. Nestas condições, que correspondem ao valor máximo de concentração a utilizar nos ensaios de microscopia de fluorescência, também não verificámos qualquer morte celular.

3.3.2.1.2. Radiotoxicidade de Complexos de Tecnécio (I)

A radiotoxicidade dos complexos Tc1 e Tc2 foi estudada nas linhas celulares B16-F1 e/ou PC-3 após 36 horas de incubação dos compostos com as células. Como exemplo, apresentam-se na figura 3.5 os resultados obtidos nos estudos realizados com as células B16-F1. Como se pode observar, o complexo Tc1 não provocava a morte das células mesmo quando eram utilizadas concentrações radioactivas relativamente elevadas (30 μ Ci). Estudos

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

semelhantes com células PC-3 mostraram um comportamento idêntico para este complexo. Para o complexo Tc2 verificou-se que existia uma aparente morte celular, ainda que ligeira, quando se utilizavam actividades superiores a 3,8 μCi (Fig. 3.5).

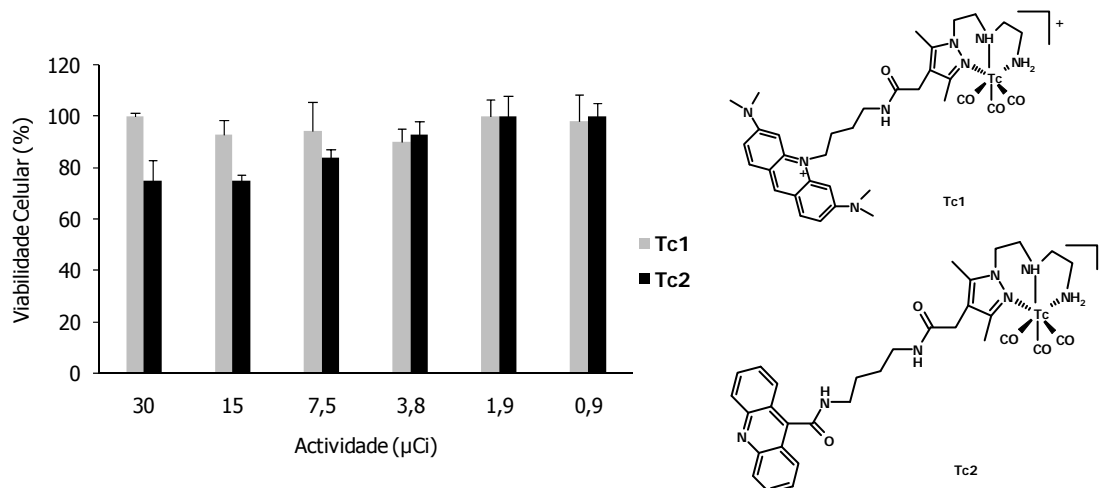


Figura 3.5: Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações radioactivas de Tc1 e Tc2 após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).

Tendo em conta os resultados de interacção dos compostos Re1 e Re2 com o ADN, descritos no capítulo 2, esperaríamos que a viabilidade celular provocada pelo complexo Tc1 fosse inferior à observada para Tc2. Embora as diferenças encontradas para Tc1 e Tc2 não sejam muito significativas, a viabilidade celular é elevada para ambos não podendo ser estabelecida qualquer relação com os resultados descritos no capítulo 2 para Re1 e Re2.

Como já referimos, no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas foram estudados complexos de rénio (I) e tecnécio (I) estabilizados por um ligando pirazolo-diamina contendo como intercalador um derivado do antraceno (Fig. 3.6 a).⁹³ Estudos com ADN mostraram que o composto de rénio (I) interactuava ligeiramente com a macromolécula, por um processo diferente da intercalação, e que a essa interacção correspondia uma constante de ligação relativamente fraca ($1,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).⁹³ Apesar disso, os estudos realizados com o composto análogo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Fig. 3.6 A) e células B16-F1 conduziram a uma morte celular significativa ($\sim 90\%$) para actividades da ordem dos 30 μCi (Fig. 3.6 b).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

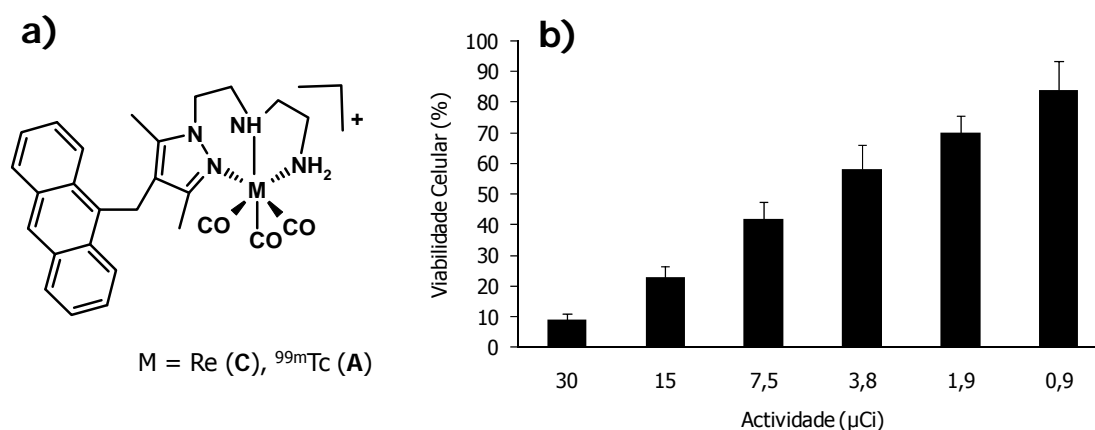


Figura 3.6: b) Viabilidade das células B16-F1 na presença de diferentes concentrações radioactivas do complexo representado em a) após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).⁹³

Como discutido no capítulo 2 o complexo **Re1** (e o complexo análogo **Tc1**) intercala de um modo perfeito no ADN, parecendo ainda estabelecer interações do tipo electrostático com a macromolécula. A constante de ligação calculada foi de $\sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, isto é cerca de dez vezes superior à encontrada para os compostos com antraceno indicados na figura 3.6 a). Uma explicação possível para o facto do derivado do antraceno provocar uma morte celular muito mais elevada do que o complexo **Tc1** poderá ser o comprimento da cadeia entre a unidade intercaladora e o C4 do anel de pirazolilo que é curto no caso do complexo com o antraceno e longo em **Tc1**. No caso de **Tc1** esta cadeia por ser longa colocará o radionuclídeo relativamente afastado das bases nucleotídicas. Esta distância, sendo superior ao percurso dos e^- Auger emitidos pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, não permitirá que o efeito dos e^- Auger se faça sentir nas bases do ADN sendo por isso elevada a viabilidade celular.

3.3.2.2. Distribuição Celular de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I)

3.3.2.2.1. Microscopia de Fluorescência com Complexos de Rénio (I)

De modo a determinar qual a localização celular dos compostos e complexos de rénio (I) utilizámos as propriedades fluorescentes das diferentes unidades intercaladoras em estudo e recorremos à microscopia de fluorescência. Foi necessário assegurar uma concentração de cromóforo que permitisse a aquisição de imagens mas que não compromettesse a viabilidade das células. Este parâmetro foi estabelecido com base nos estudos de citotoxicidade descritos na secção anterior (3.3.2.1.1.).

Como já referido, para os ensaios de microscopia de fluorescência utilizámos uma concentração de ligandos e de complexos de rénio igual a 7×10^{-5} M. Soluções dos compostos **L1/Re1** ou **L2/Re2** em DMSO foram adicionadas a células B16-F1. Após 3 horas a 37°C, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com PBS, fixadas numa solução a 3% de paraformaldeído e expostas a compostos que coram o núcleo. Estes compostos emitem fluorescência a c.d.o. conhecidos mas diferentes dos c.d.o. da emissão dos compostos em estudo, sendo utilizados como referência. Para os compostos **L1/Re1** utilizou-se o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que emite fluorescência azul, e para os compostos **L2/Re2** utilizou-se o 1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}-4,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona (DRAQ5), que emite fluorescência vermelha. Devido ao desaparecimento rápido da fluorescência por parte dos compostos **L2/Re2**, que se verificou ao longo dos ensaios, foi necessário adicionar uma solução de galato de propilo à lamela que continha as células, para impedir este efeito. Verificou-se então a co-localização dos corantes de referência e dos compostos em estudo. Os compostos **L1** e **Re1** foram detectados pela emissão de fluorescência verde e os compostos **L2** e **Re2** foram detectados pela emissão de fluorescência azul (Fig. 3.7).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rênio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

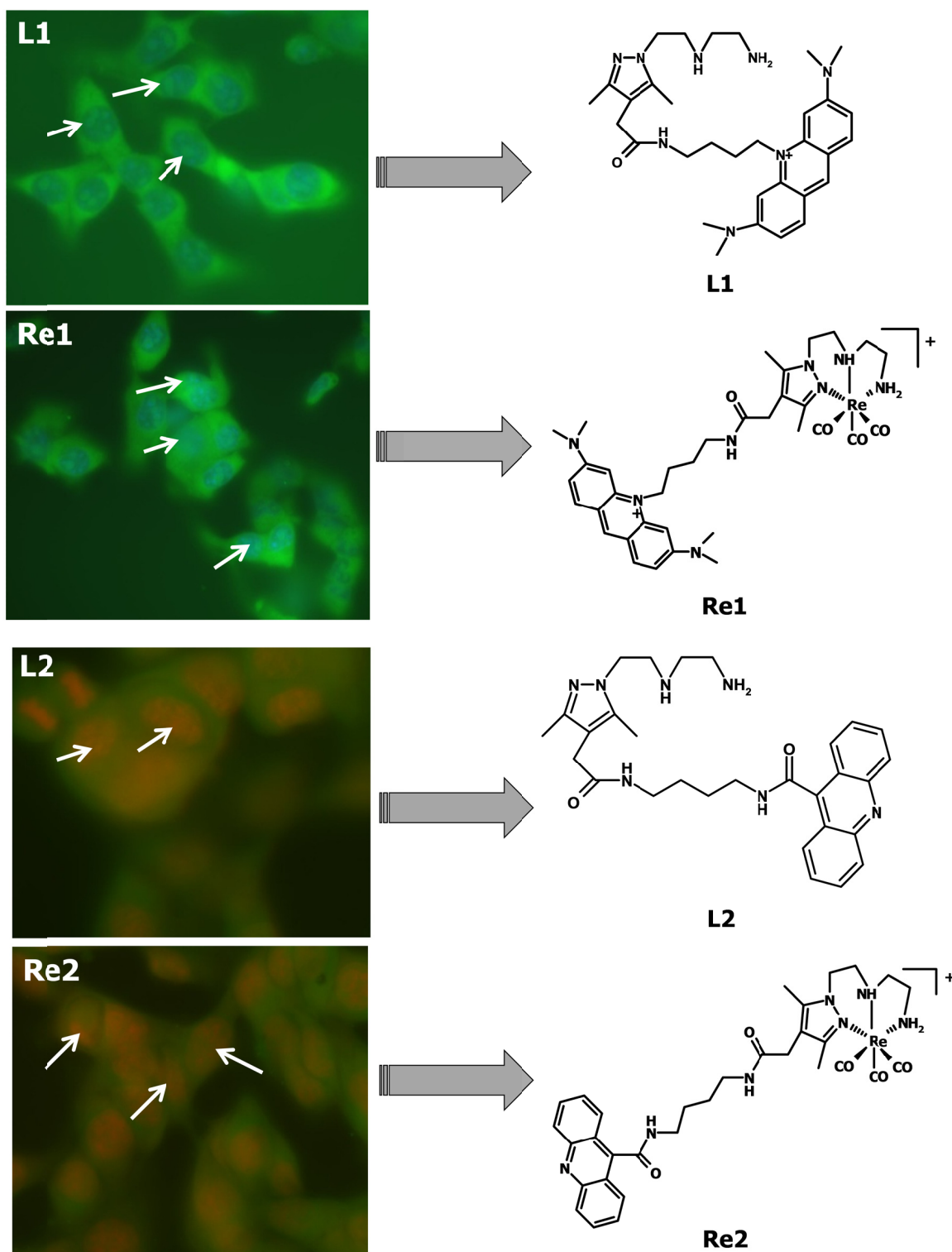


Figura 3.7: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 7×10^{-5} M de **L1** e **Re1** (verde), após incubação com DAPI (azul), e **L2** e **Re2** (azul), após incubação com DRAQ5 (vermelho). As setas indicam os nucléolos onde se verifica a acumulação dos compostos.

Como se pode verificar pela análise das imagens apresentadas na figura 3.7, foi detectada fluorescência verde (para **L1/Re1**) ou fluorescência azul (para **L2/Re2**) no citoplasma e no núcleo das células. Estas observações indicavam que os diferentes compostos conseguiam atravessar as membranas celular e nuclear. Verificou-se também que os compostos se acumulavam preferencialmente nos nucléolos que estão assinalados pelas setas a branco na figura 3.7.

Embora os compostos **L2** e **Re2** também tenham sido detectados no citoplasma e núcleo das células verificou-se que a intensidade da emissão era inferior à observada para os compostos **L1** e **Re1**. A menor intensidade da emissão por parte dos compostos **L2** e **Re2** exigiu um maior tempo de exposição para a obtenção das imagens, diminuindo a resolução das mesmas.

Para determinarmos o efeito do braço butírico, introduzido na amina central da unidade pirazolo-diamina, fomos também analisar a distribuição celular dos compostos **L3/Re3** nas células B16-F1 utilizando microscopia confocal de fluorescência. A vantagem desta técnica reside no facto de ser possível fazer a aquisição de imagens com elevada resolução espacial. As imagens obtidas para estes compostos são apresentadas na figura 3.8.

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

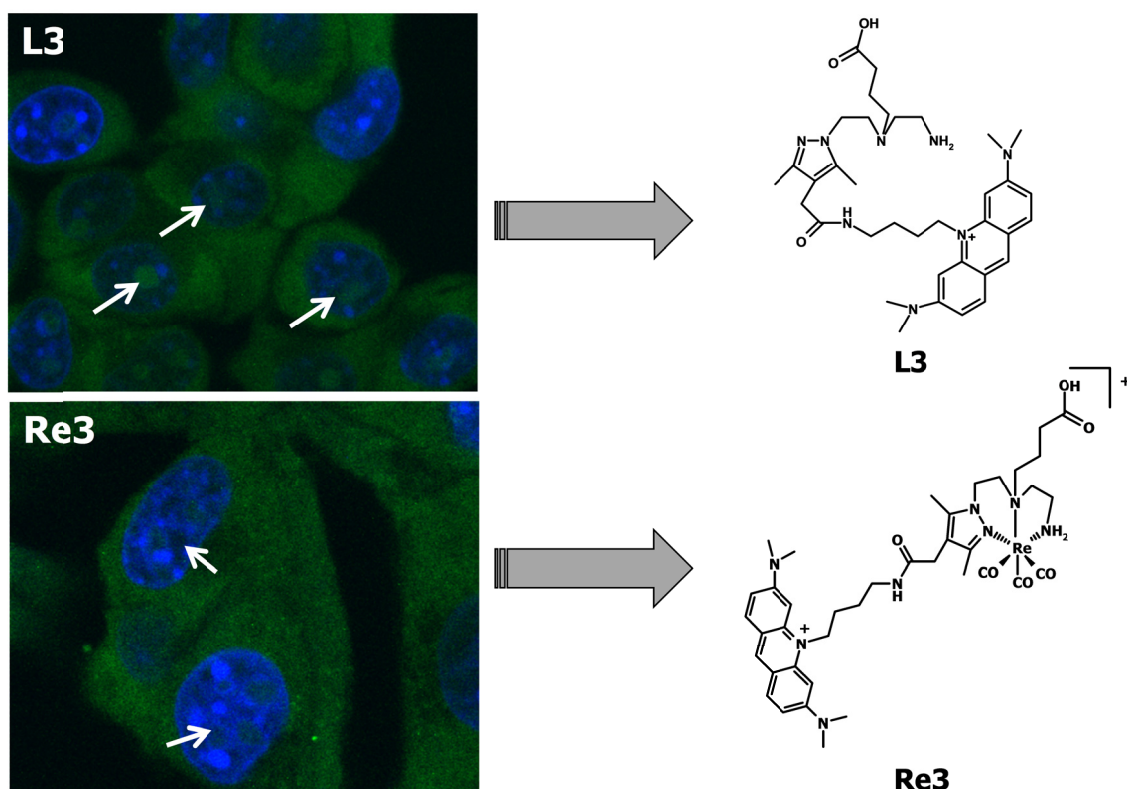


Figura 3.8: Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 7×10^{-5} M de **L3** e **Re3** (verde) após incubação com DAPI (azul). As setas indicam os nucléolos onde se acumulam os compostos.

Os compostos **L3/Re3** foram detectados no citoplasma e núcleo das células pela emissão de fluorescência verde. Verificou-se que estes compostos (**L3/Re3**) internalizavam menos nas células do que **L1/Re1**, embora possuam a mesma unidade intercaladora. O comportamento encontrado para os compostos **L3/Re3** é certamente devido à presença do braço butírico que os torna mais hidrofílicos. A internalização de **L1/Re1** e **L3/Re3** nas células B16-F1 não é específica dependendo por isso da lipofilia dos compostos.

No capítulo 2 descreveu-se a síntese de compostos pirazolo-diamina contendo uma unidade intercaladora derivada do antraceno e um braço butírico na amina central (**L5/Re5**). À semelhança do que se fez com os compostos **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2**, dever-se-ia também ter analisado a distribuição celular do complexo de rénio e do respectivo ligando, contendo um

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

derivado do antraceno, mas sem o braço butírico (Fig. 3.9). Este estudo não foi realizado porque já o tinha sido anteriormente no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.³⁴ Como se pode verificar na figura 3.9, a presença de fluorescência azul devido ao cromóforo permitiu localizar os compostos no núcleo e no citoplasma das células.³⁴

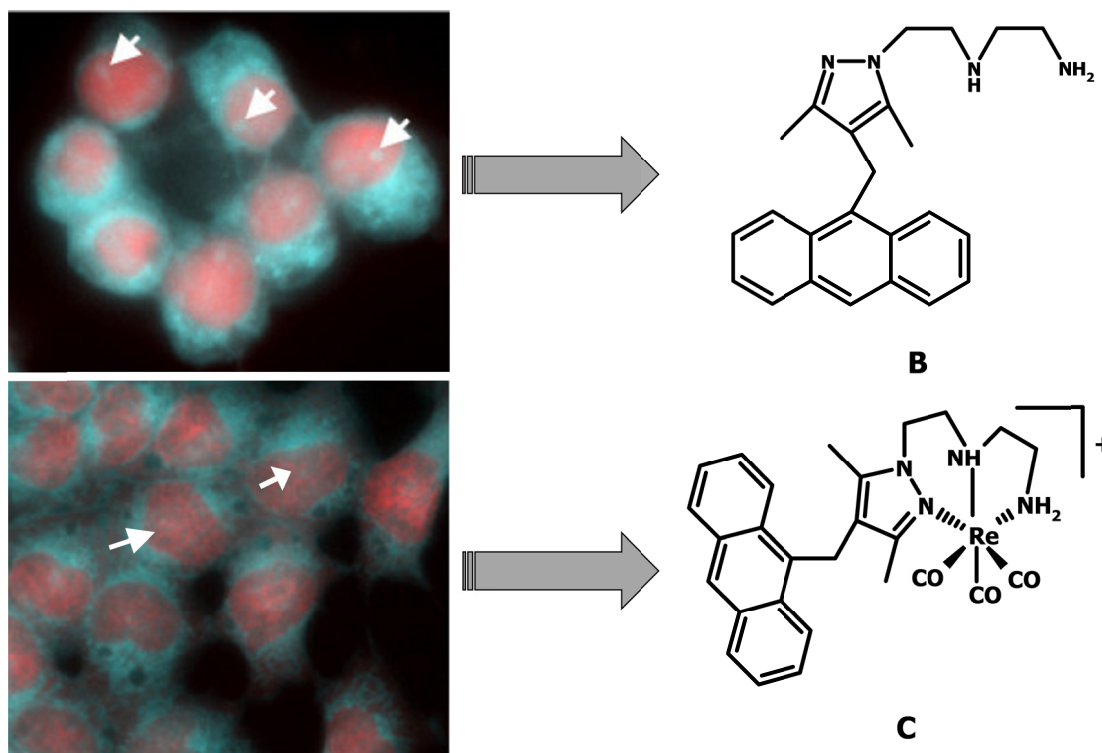


Figura 3.9: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células B16-F1 incubadas durante 3 horas com 8×10^{-5} M do ligando pirazolo-diamina com antraceno (**B**) (azul) e do respectivo complexo de rénio (I) (**C**) (azul), após incubação com DRAQ5 (vermelho). As setas a branco indicam os compostos.³⁴

3.3.2.2.2. Estudos Celulares Dinâmicos com Complexos de Rénio (I)

Para avaliar a cinética de internalização do composto **Re1** realizámos estudos dinâmicos com células humanas PC-3 por microscopia confocal. Nestes ensaios as células PC-3 foram primeiramente incubadas, durante 20 minutos a 37°C, com o corante de referência do núcleo, dihidroetídio, que emite fluorescência vermelha. Após esse tempo, as células foram lavadas e foi adicionada uma solução aquosa do composto **Re1**, com uma concentração igual a

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rênio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

$1,5 \times 10^{-5}$ M. De seguida foram obtidas imagens sequenciais minuto a minuto durante 1 hora. Na figura 3.10 apresentamos as imagens obtidas nestes estudos.

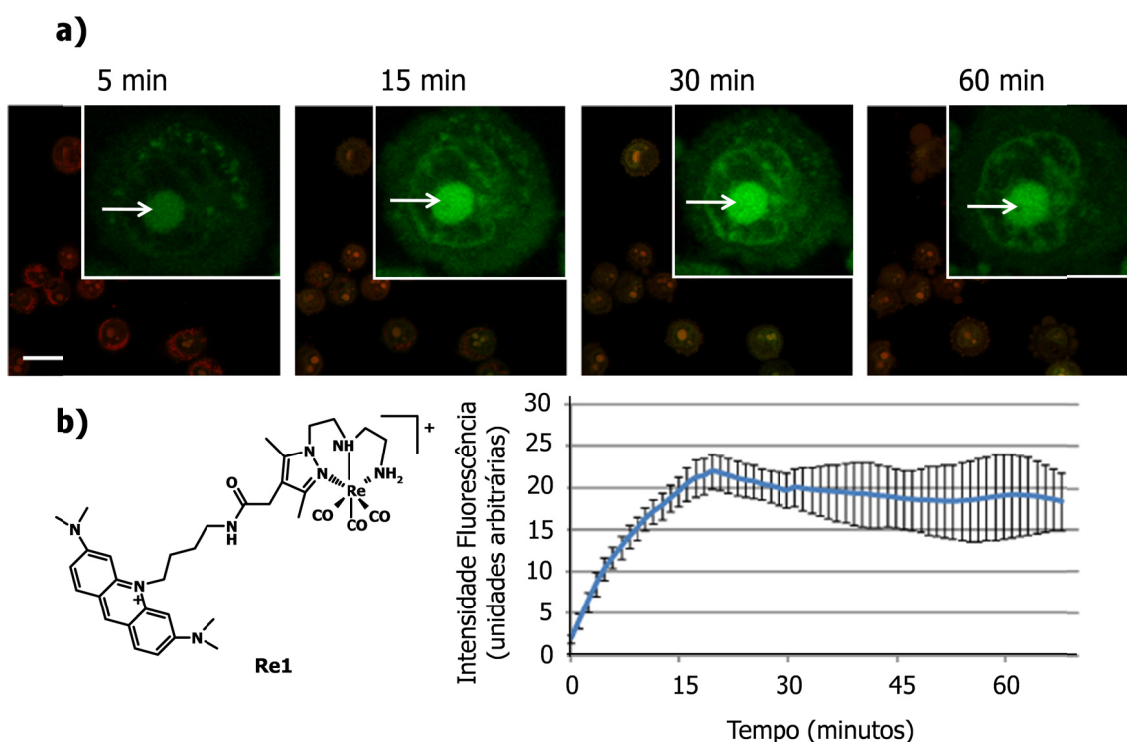


Figura 3.10: a) Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de células PC-3 na presença de $1,5 \times 10^{-5}$ M de **Re1** (verde) Vermelho: dihidroetídio. Imagens adquiridas a 5, 15, 30 e 60 minutos após adição dos compostos. Insert: distribuição celular da fluorescência para uma única célula aos mesmos tempos. Barra: 20 μ m. As setas a branco indicam a localização dos compostos. b) Gráfico representativo da intensidade de fluorescência em função do tempo.

Na figura 3.10 A apresentam-se imagens recolhidas ao longo do tempo que mostram a cinética rápida de internalização do complexo **Re1** nas células humanas PC-3. Na figura 3.10 B mostra-se de um modo esquemático o modo como a intensidade de fluorescência variou ao longo do tempo de aquisição das imagens.

Os resultados que se obtiveram são semelhantes aos anteriormente descritos nos estudos com células B16-F1. O composto internalizava rapidamente nas células acumulando-se

nos nucléolos. Ao fim de 15 minutos a intensidade de fluorescência emitida por **Re1** atingiu um patamar após o que se mantêve mais ou menos constante.

Prolongando o ensaio para além dos 60 minutos verificou-se a fragmentação das membranas celulares, indicando o início de um processo apoptótico, provavelmente devido à presença do corante de referência do núcleo (dihidroetídio) que é agressivo para as células.

3.3.2.2.3. Captação Celular, Internalização Nuclear e Efluxo de Complexos de Tecnécio (I)

Nos ensaios de microscopia de fluorescência apenas obtivemos informação qualitativa relativamente à localização celular dos compostos. Para que possamos quantificar quanto dos compostos e/ou complexos atinge o citoplasma ou o núcleo é necessário recorrer aos complexos de ^{99m}Tc , uma vez que a medida da actividade presente em cada fracção celular (citoplasma e núcleo) permite quantificar a fracção de complexo que fica no citoplasma e que fica no núcleo.

Antes de se iniciarem os estudos com células determinámos a estabilidade dos compostos radioactivos nos meios de cultura das diferentes linhas celulares. Para as células B16-F1 o meio utilizado foi o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen) e para as células PC-3 o meio utilizado foi o RPMI (Invitrogen). Os compostos purificados foram incubados com meio de cultura a 37°C e fomos retirando, ao longo do tempo, alíquotas das misturas que fomos analisando por cromatografia em camada fina (TLC). Verificámos que os compostos **Tc1**, **Tc2** e **Tc5** eram estáveis nos respectivos meios de cultura, uma vez que nos cromatogramas só se observava um único pico correspondente à espécie inicial.

Nos estudos com células B16-F1 verificámos que, após 4 h de incubação, os complexos **Tc1** e **Tc2** internalizavam 43% e 1,1%, respectivamente (Fig. 3.11). Ao fim do mesmo tempo de incubação a internalização nuclear era 23% e 0,19% para **Tc1** e **Tc2**, respectivamente (Fig. 3.11).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

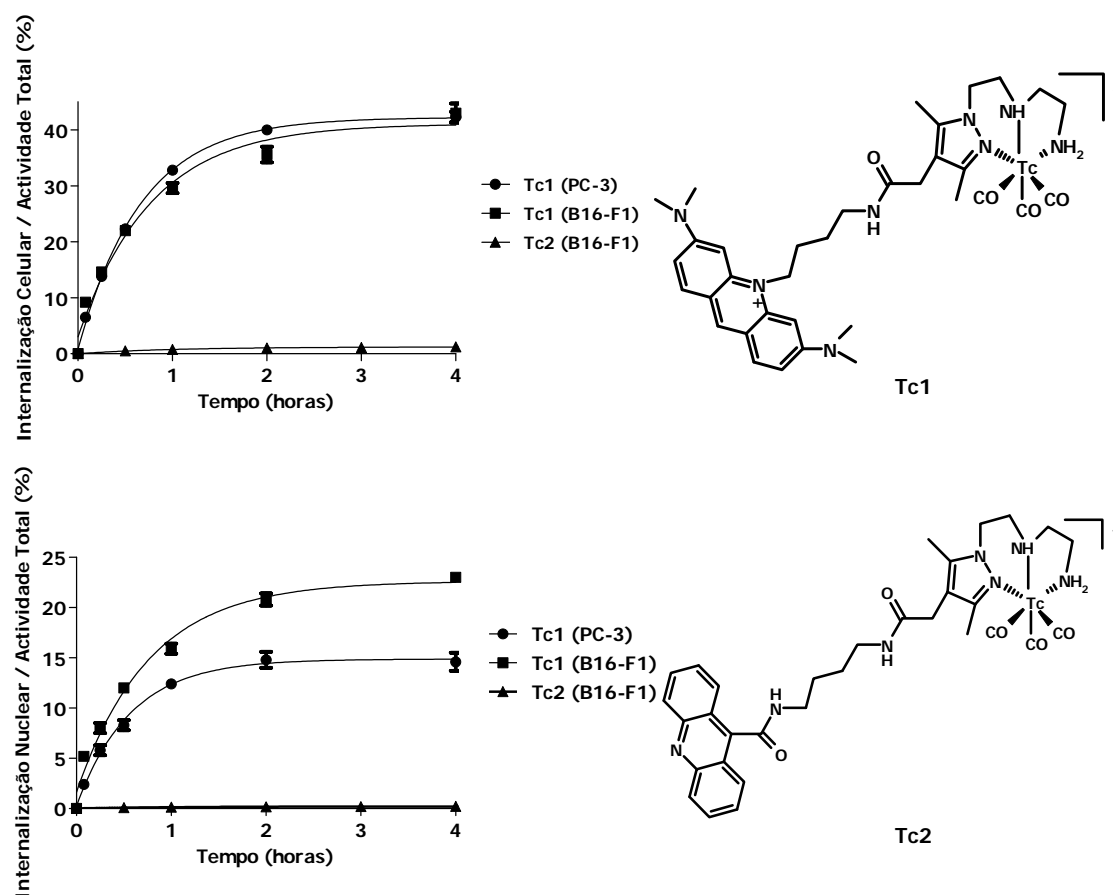


Figura 3.11: Em cima: Internalização celular de Tc1 e Tc2 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 ou B16-F1. A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, $n = 3$). Em baixo: Internalização nuclear de Tc1 e Tc2 após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 ou B16-F1. A internalização nuclear é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Os valores mais elevados, para a captação celular e internalização nuclear, encontrados para o complexo Tc1 podem estar relacionados com os resultados obtidos nos estudos de interação com o ADN por diferentes técnicas espectroscópicas, descritos no capítulo 2. Efectivamente, o complexo Re1 mostrou ter uma afinidade razoável para o ADN, aparentemente devida à presença do intercalador. Esta poderá também ser uma razão para o complexo análogo Tc1 internalizar significativamente nas células. A fraca afinidade da unidade

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

intercaladora presente na estrutura de **Tc2** poderá não favorecer a internalização deste complexo nas células. Como se pretende introduzir na estrutura de **Tc1** análogos peptídicos da BBN, com afinidade para receptores sobreexpressos em células PC-3, fomos estudar **Tc1** com células humanas PC-3. Observámos que, após 4 h de incubação, 42,3% do complexo entrava nas células (Fig. 3.11). Para o mesmo tempo de incubação registou-se uma internalização nuclear correspondente a 14,8% do complexo (Fig. 3.11). A internalização celular foi similar à observada com células B16-F1. Contudo, nas células PC-3 o complexo **Tc1** apresentava uma internalização nuclear ligeiramente inferior à que apresentou nas células B16-F1.

Fomos então avaliar a retenção de **Tc1** nas células B16-F1 e PC-3. Como se pode ver na figura 3.12, ao fim de 4 h de efluxo cerca de 14,8% do complexo **Tc1** estava ainda retido nas células PC-3 enquanto nas células B16-F1 essa retenção correspondia a 22% de composto.

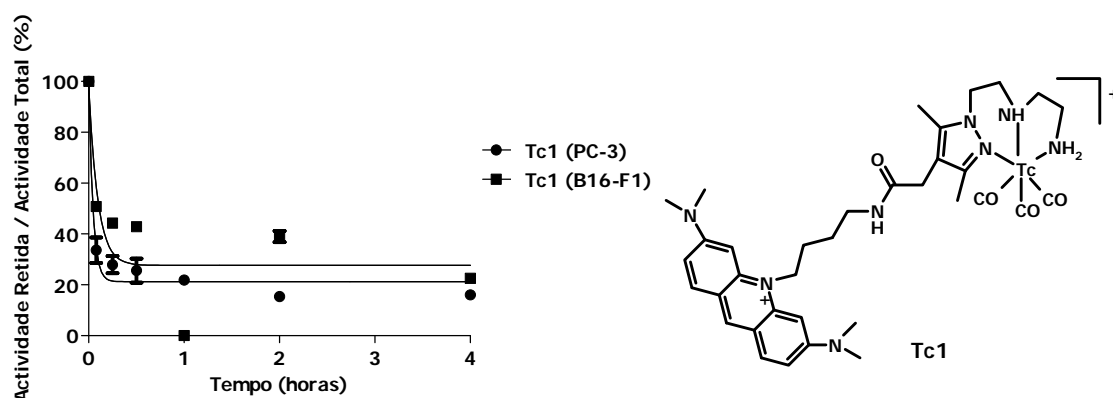


Figura 3.12: Retenção celular de **Tc1** em células PC-3 ou B16-F1 após 1 hora de internalização e 4 horas de efluxo a 37°C (média \pm desvio padrão, n=3).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

Como foi referido, um dos objectivos desta tese era funcionalizar o complexo indicado na figura 3.13 A com análogos da bombesina, para que o complexo final reconhecesse de um modo específico as células PC-3. Para podermos à *posteriori* estabelecer o efeito da introdução dos péptidos nesse reconhecimento, fomos estudar o comportamento do complexo base (Fig. 3.13 A) com células PC-3, uma vez que ele só tinha sido anteriormente estudado com células B16-F1.⁹³

O complexo indicado na figura 3.13 A, internalizava nas células PC-3. Verificámos que nestas células a internalização era mais elevada (32%, 4 h após incubação) do que nas células B16-F1 (8,6%, 4 h após incubação).³³ No que diz respeito à internalização nuclear, a situação que encontrámos foi inversa da anteriormente descrita. Verificámos que, após 4 h de incubação com células PC-3, a internalização nuclear do composto indicado na figura 3.13 A era de cerca de 2,9%. Nas células B16-F1 o valor anteriormente registado, ao fim do mesmo tempo de incubação, era superior (4,4%).³³ A retenção nas células PC-3 era moderada: 16% do composto ainda estava internalizado, após 2 h de incubação e 4 h de efluxo (Fig. 3.14).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

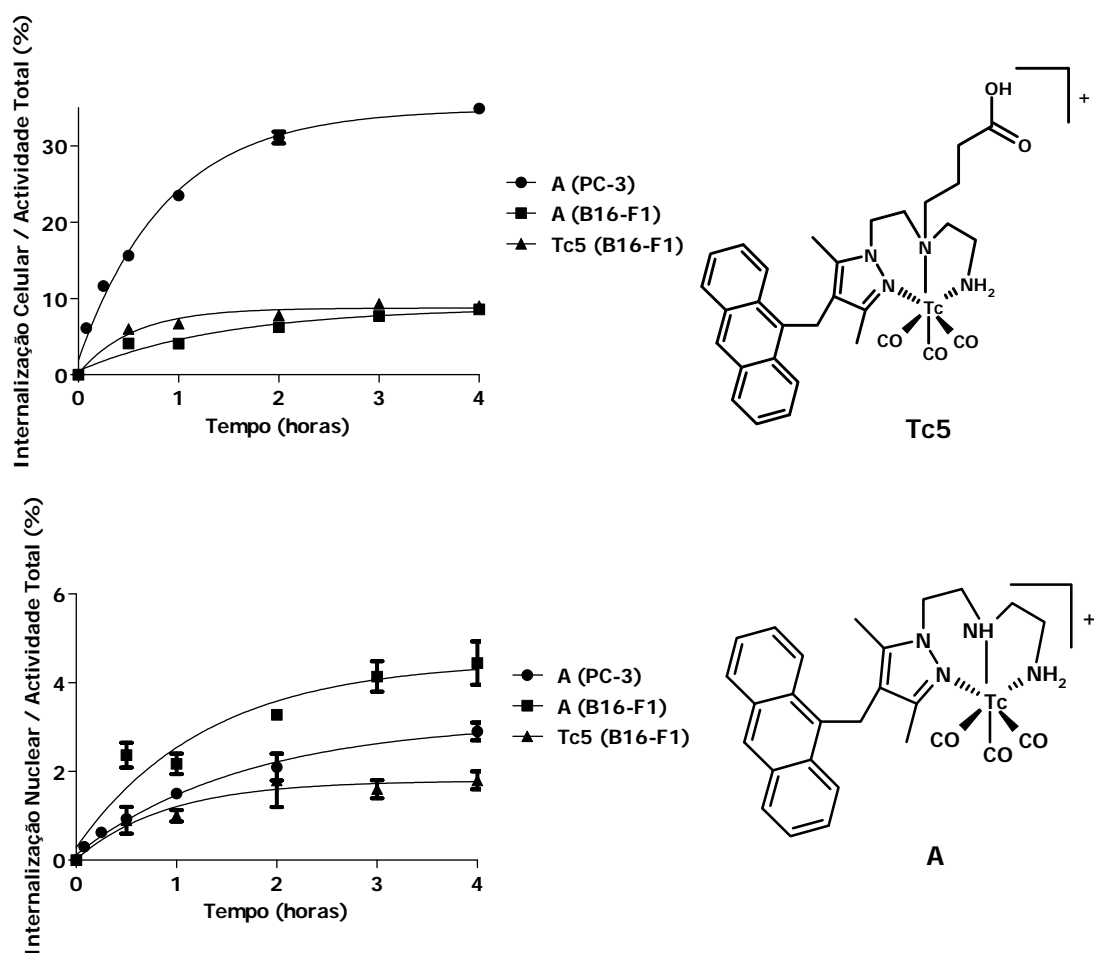


Figura 3.13: Em cima: Internalização celular de Tc5 e A após 4 horas de incubação a 37°C com células B16-F1 ou PC-3. A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3). Em baixo: Internalização nuclear de Tc5 e A após 4 horas de incubação a 37°C com células B16-F1 ou PC-3. A internalização nuclear é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, n = 3).

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

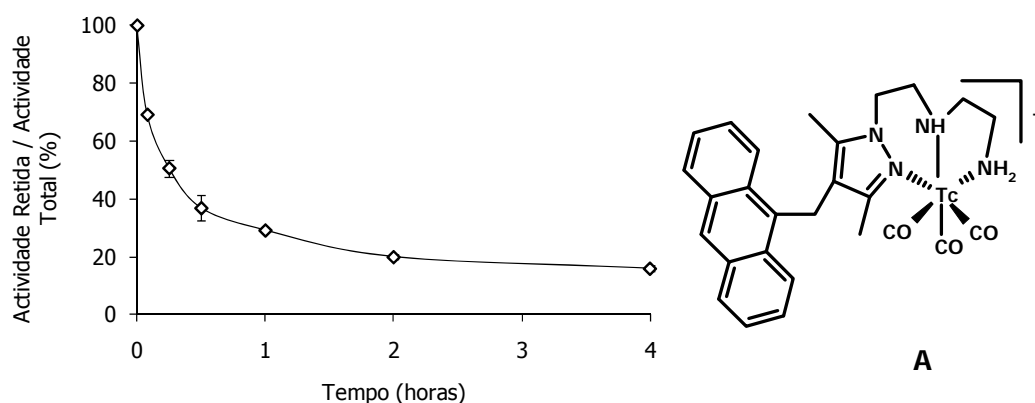


Figura 3.14: Retenção celular do complexo **A** após 2 horas de internalização e 4 horas de efluxo em células PC-3 a 37°C (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

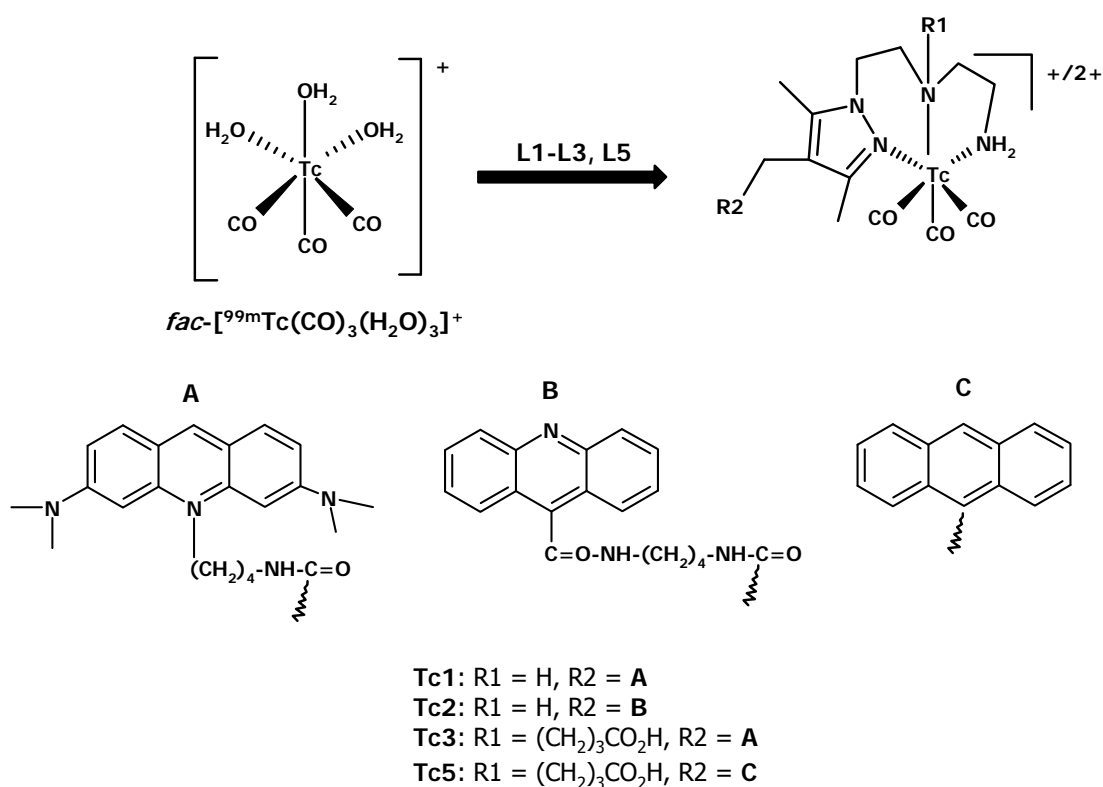
O complexo **Tc5** análogo do composto anterior, mas com o braço butírico na amina central da unidade pirazolo-diamina, foi estudado com células B16-F1. Nestes estudos verificou-se uma internalização celular de 9% do composto após 4 h de incubação (Fig. 3.13). Verificámos que este valor era semelhante ao determinado para o complexo análogo sem o braço carboxilato (**A**) (8,6%).⁹³

Nos estudos com células B16-F1, após 4 h de incubação, verificámos que cerca de 1,5% do composto **Tc5** se encontrava no núcleo das células (Fig. 3.13), sendo este valor inferior ao determinado para o complexo **A** nas mesmas condições experimentais (4,4%).⁹³ A presença de um grupo carboxilato livre em **Tc5** pode ser responsável pelo facto da internalização nuclear deste composto ser inferior à do complexo sem o grupo carboxilato (**A**). A entrada destes compostos nas células é um processo não específico e deve depender da lipofilia dos compostos. O composto **Tc5** ($\log D_{o/w} = 1,36 \pm 0,01$) tem um carácter mais hidrofílico do que o composto **A** ($\log D_{o/w} = 2,04$)⁹³ provavelmente devido à presença do grupo carboxilato livre.

3.4. Conclusões

Utilizando os ligandos pirazolo-diamina funcionalizados com unidades intercaladoras (L1-L3, L5), descritos no capítulo 2, foram isolados vários complexos de ^{99m}Tc (I) por reacção destes com o precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (esquema 3.2).

Esquema 3.2



Os complexos de ^{99m}Tc do tipo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\kappa^3\text{-L})]^{+/2+}$ (L = L1 (Tc1); L = L2 (Tc2); L = L3 (Tc3); L = L5 (Tc5)) foram caracterizados por comparação do seu perfil cromatográfico, obtido em HPLC, com o dos complexos análogos de rénio (I) (Re1-Re3, Re5) sintetizados e caracterizados no capítulo 2.

Todos os complexos de ^{99m}Tc apresentavam uma baixa lipofilia com valores de $\log D_{o/w}$ inferiores a 1,5, provavelmente devido à protonação das amins alifáticas ao valor de pH fisiológico. Um desses complexos (Tc3) era bastante mais hidrofílico certamente devido à presença adicional de um braço carboxilato livre que a pH fisiológico (7,4) deve estar ionizado.

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

A interacção de **Tc1** com ADN plasmídeo foi estudada por electroforese em gel de agarose. Neste estudo concluímos que este composto provocava quebras simples no ADN plasmídeo transformando o ADN na forma enrolada (FE) em ADN na forma circular (FC) e que essa conversão correspondia a cerca de 30%. Este valor era mais elevado do que os encontrados para **Re1** (15%) ou $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (~6%). Estes compostos foram utilizados como comparação para excluir efeitos de massa e avaliar o efeito da ausência da unidade intercaladora.

Estudou-se a interacção de alguns dos complexos de rénio e tecnécio com células tumorais murinas B16-F1 e/ou humanas PC-3. Verificámos que **L1**, **Re1**, **L2**, e **Re2** não apresentavam qualquer efeito citotóxico para concentrações iguais ou inferiores a 10^{-6} M. Os estudos de radiotoxicidade com **Tc1** e **Tc2** também mostraram uma viabilidade celular $\geq 70\%$, mesmo para actividades da ordem dos 30 μCi . Os estudos de citotoxicidade permitiram determinar as concentrações a utilizar nos estudos de microscopia de fluorescência e ainda garantir que nos estudos com os complexos de ^{99m}Tc não existia qualquer efeito de massa na viabilidade das células.

A interacção de **L1** e **Re1**, descrita no capítulo 2, mostrou que estes compostos interagem com o ADN por intercalação, parecendo ainda existir uma outra interacção adicional do tipo electrostático entre **Re1** e a macromolécula. Para os compostos **L2** e **Re2** verificou-se uma fraca afinidade para o ADN. No entanto, os ensaios de cito- e radiotoxicidade realizados com **Re1/Tc1** e **Re2/Tc2** não evidenciaram qualquer morte celular, mesmo para **Re1/Tc1**, que interactuavam mais significativamente com o ADN. Estes resultados parecem indicar que o comprimento e natureza da cadeia butilénica entre a unidade intercaladora e a estrutura pirazolo-diamina, nos compostos **L1** e **Re1**, favorece uma intercalação perfeita mas é demasiado longo para permitir a localização do radionuclídeo perto do ADN das células. Desta forma o efeito dos e^- Auger emitidos pelo ^{99m}Tc parece não se fazer sentir no ADN das células

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

PC-3 ou B16-F1 e daí a elevada viabilidade celular encontrada nos estudos de cito- e radiotoxicidade.

No entanto, a elevada viabilidade celular encontrada para as células, quando em presença dos complexos **Re1** e **Tc1**, poderia também dever-se ao facto de estes complexos não serem capazes de atravessar as membranas celular e nuclear. Para eliminar esta hipótese estudámos a distribuição celular dos complexos de rénio (I) por microscopia de fluorescência e quantificou-se essa distribuição realizando estudos com os compostos análogos de ^{99m}Tc .

Nos estudos de microscopia de fluorescência verificámos que os compostos **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** conseguiam atravessar as membranas celular e nuclear das células B16-F1 e/ou PC-3, acumulando-se preferencialmente nos nucléolos. Nestes estudos verificámos também que a internalização nas células de **L2** e **Re2** era menor do que a de **L1** e **Re1**. Avaliámos também por esta técnica a distribuição celular dos compostos **L3** e **Re3** que possuem a mesma unidade intercaladora de **L1** e **Re1** e um braço carboxilato livre. Verificou-se que **L3** e **Re3** mantinham a capacidade de atravessar as membranas celular e nuclear localizando-se nos nucléolos, embora menos do que **L1** e **Re1**, devido certamente ao carácter mais hidrofílico de **L3** e **Re3**, conferido pela presença do carboxilato livre.

A quantificação da distribuição celular, observada por microscopia de fluorescência, foi realizada utilizando os complexos análogos de ^{99m}Tc . Nos estudos com células B16-F1, verificou-se que o complexo **Tc2** apresentava uma internalização celular (1,1%) e nuclear (0,2%) muito baixas, após 4 h de incubação. **Tc1** revelou valores muito mais elevados de internalização celular (~42%) e nuclear (23% e 14,8%), tanto em células B16-F1 como em células PC-3, após o mesmo tempo de incubação.

A elevada internalização celular e nuclear encontrada para **Re1/Tc1**, bem como a elevada afinidade de **Re1** para o ADN, levaram-nos a escolher os compostos **L3** e **Re3** para

3. Avaliação Biológica de Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Contendo Unidades Intercaladoras

prosseguir os estudos de ligação a péptidos biologicamente activos (capítulo 4). Com efeito, os compostos **L3** e **Re3** possuem como unidade intercaladora o AO, tal como **L1** e **Re1**, e têm um grupo carboxilato livre na amina central para conjugação a moléculas biologicamente activas.

Os compostos **L4** e **Re4** não foram seleccionados para serem funcionalizados com péptidos biologicamente activos devido à baixa internalização celular e fraca interacção com o ADN dos compostos que lhes deram origem (**L2** e **Re2**).

Os compostos **L5** e **Re5/Tc5** foram também seleccionados para posterior ligação a péptidos biologicamente activos (capítulo 4) porque os compostos base que lhes deram origem (esquema 2.14), apesar de interagirem moderadamente com o ADN, internalizavam em células B16-F1 e PC-3 promovendo uma morte celular significativa.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I)

Estabilizados por Ligandos Contendo uma

Unidade Intercaladora e Análogos da

Bombesina

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

4.1. Considerações Gerais

Os péptidos são pequenas cadeias de aminoácidos (aa) que desempenham vários papéis biológicos importantes, entre os quais a regulação de factores de crescimento em tecidos normais e tumorais. Estudos de biologia molecular e celular demonstraram que os receptores de certos péptidos reguladores se encontram sobreexpressos em tecidos tumorais. Esta característica tem sido explorada com vista à concepção de ferramentas para diagnóstico precoce e/ou tratamento clínico de certos tumores.^{6,94} No caso concreto das ciências radiofarmacêuticas tem sido intensamente estudada a possibilidade de ligar radionuclídeos, emissores de radiação e/ou de partículas, a esses péptidos com o objectivo de direccionar *in vivo* a radiação e/ou partículas emitidas a alvos relacionados com certas patologias. Com este objectivo vários têm sido os radionuclídeos e os péptidos explorados.

A ligação de um péptido a um radionuclídeo pode ter impacto no seu comportamento biológico, uma vez que os péptidos são, normalmente, pequenas cadeias de aa e os locais disponíveis para ligação ao radionuclídeo são reduzidos. Assim, a ligação ao péptido deve realizar-se num local da sequência peptídica bem definido, que não corresponda à zona biologicamente activa: zona responsável pela afinidade e selectividade para o respectivo receptor.

Para que um péptido possa ter interesse clínico ele deve ligar-se quantitativamente a um radionuclídeo, manter uma elevada afinidade para o receptor e ser, preferencialmente, um agonista para que a sua internalização nas células alvo seja mediada pelo receptor. Contudo, recentemente alguns grupos de investigação demonstraram que para alguns péptidos a utilização de antagonistas pode constituir uma outra via promissora para o desenvolvimento de compostos radioactivos dirigidos a receptores.⁹⁵⁻¹⁰¹ O péptido após marcação com o radionuclídeo deverá apresentar ainda uma farmacocinética adequada: fixação elevada nos

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

orgãos alvo e baixa nos órgãos não alvo bem como uma rápida eliminação, de preferência por via renal.

Devido à baixa densidade dos receptores nos tecidos tumorais, os péptidos radioactivos com os quais pretendemos alvejar esses receptores têm de ser preparados com elevada actividade específica, para evitar a saturação dos receptores com produto não radioactivo que diminuiria a qualidade da imagem final.

Relativamente à utilização de anticorpos, os péptidos apresentam algumas vantagens, tais como: facilidade de síntese, resistência às condições reaccionais necessárias para ligação a diferentes radionuclídeos e rápida depuração sanguínea. Estas características permitem que, uma vez identificada a sequência de aa responsável pela ligação ao receptor, seja possível modificar regiões do péptido que não participam nessa interacção, de modo a permitir a ligação ao radionuclídeo ou a modular a farmacocinética do composto final. No que respeita à farmacocinética, ela pode ser modulada utilizando grupos funcionais que podem ser introduzidos entre o péptido e o radionuclídeo ou pela adição de determinados aa à sequência peptídica biologicamente activa.^{6,102}

A maioria dos péptidos reguladores tem uma semi-vida biológica curta, pois normalmente são metabolizados por enzimas (peptidases e/ou proteases) endógenas. Por este motivo na concepção de compostos baseados em péptidos nunca se utiliza como vector o péptido endógeno mas sim análogos peptídicos que deverão ser concebidos por forma a serem metabolicamente estáveis. Esta estabilidade é conseguida pela adição ou remoção de aa na sequência biologicamente activa e/ou por alterações nas cadeias laterais do péptido ou ainda por ciclização.⁴⁵

A exploração de péptidos reguladores, para a concepção de sondas radioactivas, foi iniciada com análogos da somatostatina (SST). Uma vez verificada a capacidade da SST em regular a proliferação celular, este péptido foi explorado com vista a uma possível aplicação na

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

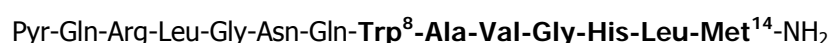
imagiologia e tratamento de tumores neuroendócrinos. Para tal, análogos da SST foram marcados com vários radionuclídeos, tais como ^{111}In , ^{90}Y e ^{177}Lu . Estudos clínicos, com esses compostos radioactivos, demonstraram a sua eficácia para a detecção cintigráfica de tumores neuroendócrinos e para o seu tratamento. Estes resultados viabilizaram a utilização no meio clínico de análogos da SST, marcados com radionuclídeos, para aplicações de diagnóstico. Para terapia dirigida encontram-se ainda em avaliação clínica os candidatos propostos.^{6,103-108}

No entanto, a utilização de análogos da SST a nível clínico só é útil para os tumores neuroendócrinos que expressam os seus receptores. Por esta razão, conceber e sintetizar novos radiofármacos contendo análogos peptídicos que reconheçam outros tumores de forma selectiva é de extrema importância.^{109,110}

A bombesina (BBN) é um outro péptido regulador que também tem sido extensamente estudado como se verá de seguida.⁶

4.1.1. Bombesina

A bombesina (BBN) é um péptido com 14 aa análogo do péptido humano libertador da gastrina (GRP, *gastrin releasing peptide*) e possui a seguinte constituição:



A sequência de aa, Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met (resíduos 8-14 da BBN) está directamente implicada na interacção específica com o receptor do GRP (GRPr) e todas as modificações a realizar no péptido deverão ter em conta este facto. Para além disso, modificações ou supressões na posição 14 (posição ocupada pela metionina, Met) são importantes para que o péptido final tenha propriedades agonistas ou antagonistas.¹⁰²

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Actualmente são conhecidos quatro subtipos de receptores da BBN: o receptor da neuromedina B (subtipo 1, BB1), o receptor do GRP (GRPr, subtipo 2, BB2), o receptor órfão (subtipo 3, BB3) e o receptor anfíbio da BBN (subtipo 4, BB4).¹¹¹⁻¹¹⁴

O desenvolvimento de radiofármacos direccionados para os receptores da BBN tem como base a sobreexpressão destes receptores em vários tipos de tumores, nomeadamente: próstata, pâncreas, mama, tracto gastrointestinal, pulmão (carcinoma de pequena célula) e em carcinomas coloreticais.¹¹⁵

Inicialmente, esta sobreexpressão foi verificada para o subtipo BB2 (GRPr), mas continuam a ser concebidos e avaliados conjugados direccionados para os subtipos BB1 e BB3, de modo a alvejar diferentes tipos de tumores.^{116,117} Uma vez que os tumores humanos têm tendência a sobreexpressar o GRPr (BB2), têm sido feitos esforços para a concepção e síntese de agentes específicos que reconheçam este subtipo de receptores e que portanto possam permitir a visualização de tumores humanos que os sobreexpressam.¹¹⁸

4.1.2. Análogos da Bombesina Marcados com Radiometais

A marcação de análogos da BBN com radiolantanídeos e com outros radiometais trivalentes ou divalentes tais como ¹⁷⁷Lu, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ^{67/68}Ga ou ⁶⁴Cu tem sido explorada com vista a uma possível aplicação em radioterapia ou imagiologia. A concretização deste objectivo exige a utilização de ligandos bifuncionais que uma vez ligados aos péptidos deverão estabilizar os diferentes iões metálicos.¹¹⁹⁻¹²¹

Os ligandos acíclicos e cíclicos poliaminopolicarboxílicos, tais como derivados de ácido dietilenotriaminopenta acético (DTPA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA) ou ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), que se encontram representados na figura 4.1, têm sido os mais explorados para a marcação de péptidos com os iões metálicos acima referidos.¹²²⁻¹²⁵

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

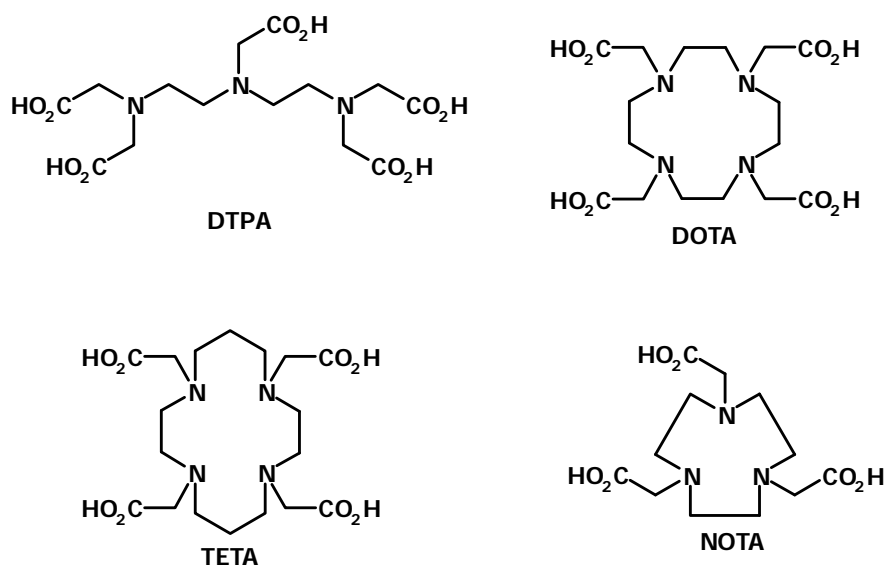


Figura 4.1: Ligandos acíclicos e cíclicos poliaminocarboxílicos.¹¹⁹⁻¹²²

Nesta família de ligandos, um dos braços carboxílicos é normalmente ligado ao péptido. Esta ligação é feita geralmente através da formação de uma ligação amida com as aminas primárias de Lys existentes na cadeia peptídica ou com o N-terminal dessa cadeia.^{6,126} Em alternativa, grupos funcionais para ligação ao péptido podem ser introduzidos na estrutura metilénica do ligando bifuncional. Desta forma, todos os braços carboxílicos presentes no ligando ficam disponíveis para estabilização do metal.^{127,128} A ligação ao péptido não deve comprometer a estabilidade dos complexos formados.

As estruturas macrocíclicas originam complexos metálicos mais estáveis termodinamicamente e com maior inércia cinética do que os complexos formados com ligandos acíclicos do tipo DTPA, devido ao facto dos macrociclos adoptarem uma estrutura pré-organizada.⁴⁵ Na tabela 4.1 encontram-se sumariamente apresentadas as constantes de estabilidade (K_{ML}) para complexos de alguns dos iões metálicos acima referidos com ligandos acíclicos ou macrocíclicos poliaminocarboxílicos (Fig. 4.1).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Tabela 4.1: Constantes de estabilidade (K_{ML})^a para complexos de poliaminocarboxilatos com íons metálicos divalentes e trivalentes.⁴⁵

Ligando Bifuncional	Íon Metálico				
	Cu (II)	Ga (II)	In (III)	Y (III)	Lu (III)
DTPA	21,5	25,5	29,5	22,5	-
DOTA	22,3	21,3	23,9	24,3	25,5
TETA	21,7	19,7	21,8	14,8	15,3
NOTA	21,63	31,0	26,2	-	-

^a $K_{ML} = [ML]/[M][L]$

Por si só, os valores de K_{ML} podem indicar a afinidade relativa dos diferentes ligandos bifuncionais para um dado metal. Contudo, é necessário ter em conta que pode ser difícil comparar constantes de estabilidade para ligandos com diferente basicidade. Para ultrapassar esta dificuldade, têm de se considerar os valores de pM.⁴⁵

A marcação de péptidos com ^{67/68}Ga tem sido estudada utilizando derivados do DOTA ou do NOTA.¹²⁹⁻¹³¹ Um derivado do DOTA ligado a um análogo da BBN foi marcado com ⁶⁸Ga, ⁶⁸Ga-DOTABOM. Este composto foi submetido a ensaios clínicos tendo permitido a detecção de lesões malignas de cancro da próstata em 13 de 15 pacientes.¹³²

A química do gálio e do índio em meio aquoso encontra-se limitada ao estado de oxidação (III).^{133,134} Uma vez que o raio iónico do Ga³⁺ (47-62 pm) é inferior ao do In³⁺ (62-92 pm) o número máximo de coordenação dos complexos de Ga (III) é geralmente 6, enquanto para o In (III) pode ser 7 ou 8.^{1,135}

Para o In (III) o NOTA não possui locais de coordenação em número suficiente para estabilizar este íon metálico. Por esta razão, derivados do DTPA e do DOTA têm sido explorados para marcação de análogos da BBN com ¹¹¹In.^{45,136-138}

O análogo da BBN ligado ao DTPA, que se encontra representado na figura 4.2, foi marcado com ¹¹¹In. O complexo final revelou uma boa acumulação em tumores PC-3 induzidos em ratinhos. Este estudo demonstrou que o complexo ¹¹¹In-[DTPA¹, Lys³, Tyr⁴]-BBN[2-14] pode ser um potencial agente para imagiologia de tumores que expressam o GRPr.¹³⁸

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

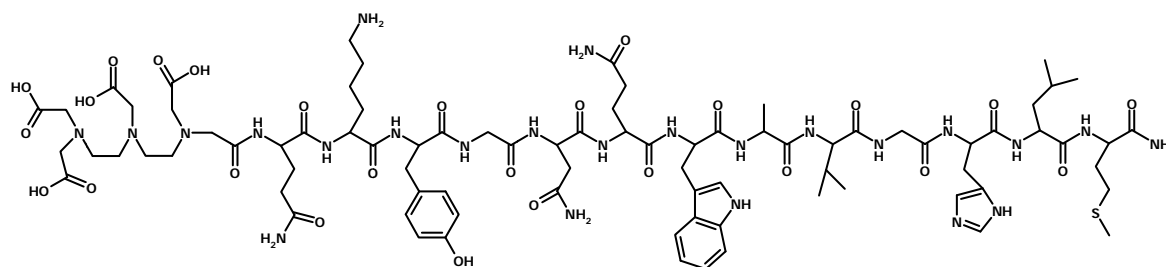


Figura 4.2: Estrutura de [DTPA¹, Lys³, Tyr⁴]-BBN[2-14].¹³⁸

A química de coordenação em meio aquoso do ítrio e do lutécio é comparável dada a semelhança do raio iônico destes íons metálicos e da sua carga. O número de coordenação dos complexos formados com estes metais é geralmente 8 ou 9 pelo que os derivados do DOTA têm sido explorados para a marcação de análogos da BBN com ⁹⁰Y e ¹⁷⁷Lu.^{45,130,136,139-141} A elevada estabilidade destes complexos metálicos pode ser explicada pelo ajuste entre a dimensão da cavidade do macrociclo e o raio iônico destes íons.

O ¹⁷⁷Lu é um radionuclídeo emissor de partículas β e de radiação γ. Na figura 4.3 mostra-se a estrutura de um análogo da BBN que foi marcado com este radionuclídeo utilizando um derivado do DOTA. Com base na emissão de partículas β, este radiopéptido foi avaliado na clínica para terapia do cancro da próstata. Em estudos de fase I, tirando partido da emissão de radiação γ pelo ¹⁷⁷Lu, utilizando este complexo radioactivo foi possível detectar lesões em 5 de 7 pacientes por imagiologia SPECT.¹⁴⁰⁻¹⁴³

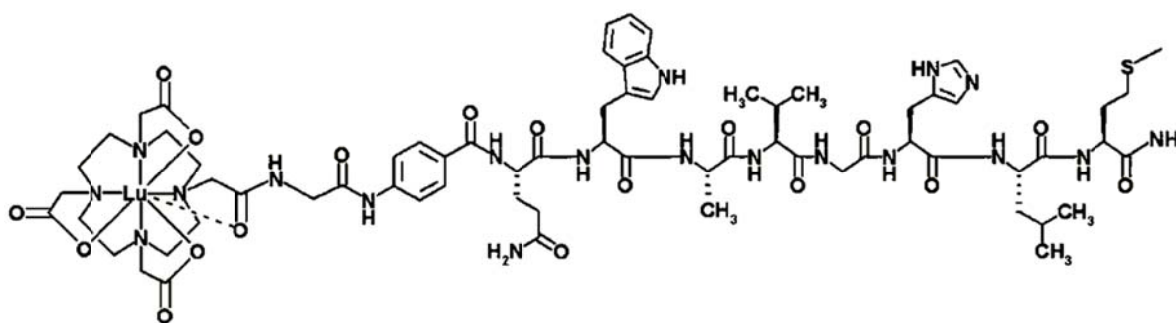


Figura 4.3: Estrutura de ¹⁷⁷Lu-AMBA (AMBA = DOTA-Gly-(4-aminobenzoyl)-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂).¹³⁹

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Na concepção de complexos de Cu (II), com potencial para aplicação em medicina nuclear, deverão escolher-se ligandos que evitem a redução de Cu (II) a Cu (I) uma vez que a presença de Cu (I) aumenta a probabilidade da libertação do radiometal *in vivo*. Os complexos de Cu (II) devem ainda resistir a reacções de trans-quelatação com proteínas existentes em organismos vivos e envolvidas no transporte e armazenamento do metal.^{120,123}

O cobre (II) tem um raio iónico pequeno (57-73 pm) originando complexos com números de coordenação entre 4 e 6, sendo mais indicado na formação de anéis quelantes com cinco membros.¹²⁰

O DOTA e o TETA têm sido utilizados como agentes quelantes para marcação de péptidos com ⁶⁴Cu.¹²⁶ Contudo, estes ligandos bifuncionais não são os mais adequadas para estabilizar o radiometal, uma vez que os complexos formados apresentam uma certa instabilidade *in vivo*, sofrendo reacções de transquelatação com proteínas do sangue.¹⁴⁴ Por esta razão, o NOTA tem sido explorado para a marcação de análogos da BBN com ⁶⁴Cu, tendo sido visível a capacidade deste ligando bifuncional para formar complexos de cobre estáveis *in vivo*.^{131,145,146}

Na figura 4.4 são apresentados exemplos de complexos de ⁶⁴Cu, com análogos da BBN, estabilizados pelo NOTA.

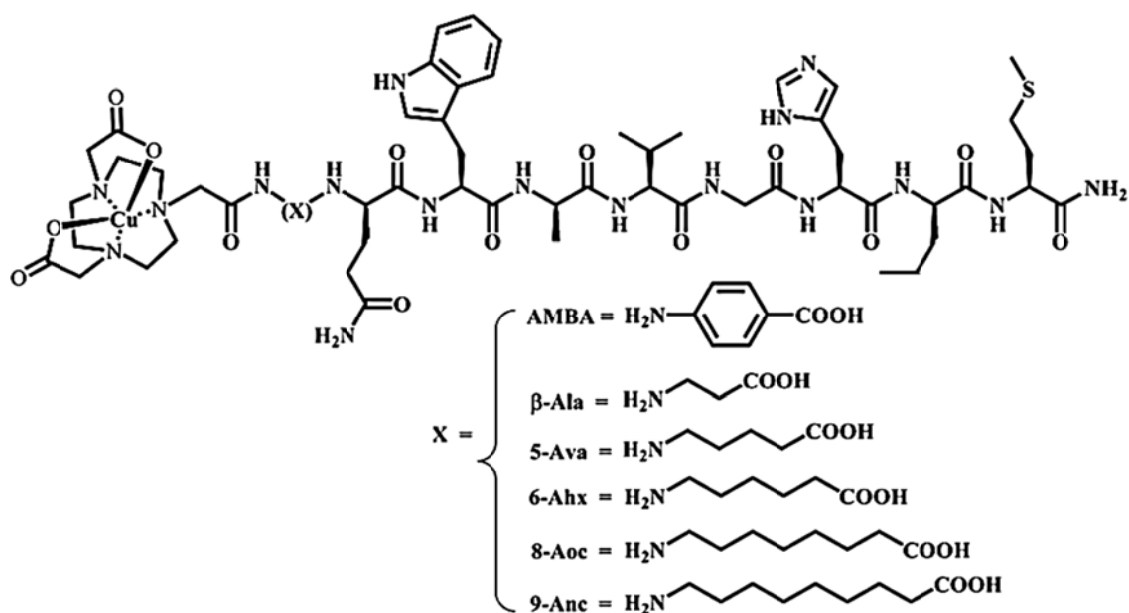


Figura 4.4: Estrutura de complexos do tipo $[\text{}^{64}\text{Cu-NO}_2\text{A-(X)-BBN(7-14)NH}_2]$.^{146,147}

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Como foi referido no capítulo 2, tirando partido da química diversificada do ^{99m}Tc diferentes estratégias têm sido utilizadas para marcação de análogos da BBN com Tc (V), Tc (III) ou Tc (I). Estas estratégias envolveram a exploração do potencial das unidades Tc-HYNIC, $[\text{TcO}]^{3+}$, $\text{trans-}[\text{TcO}_2]^+$, $\text{fac-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ e da aproximação "4+1" em combinação com uma grande variedade de ligandos bifuncionais para estabilização do centro metálico (Fig. 2.1).^{118,121}

Os complexos de Tc (V) são geralmente estabilizados por ligandos que contêm átomos doadores de azoto, oxigénio ou enxofre. Sempre que esses complexos contêm a unidade $[\text{TcO}]^{3+}$ são estabilizados por ligandos tetradentado do tipo $\text{N}_x\text{S}_{(4-x)}$.^{102,118,148,149} Quando os complexos de Tc (V) contêm a unidade $\text{trans-}[\text{TcO}_2]^+$ são estabilizados por tetraaminas acíclicas. Na aproximação Tc-HYNIC, a molécula HYNIC pode coordenar como ligando mono ou bidentado, sendo necessária a utilização de co-ligandos para satisfazer a esfera de coordenação do metal. Estes co-ligandos têm como átomos doadores azoto e oxigénio tais como o ácido etilenodiamino diacético (EDDA), gluconato, ácido nicotínico ou tricina, por exemplo.^{150,151} Contudo, a verdadeira natureza da ligação Tc-N envolvida na coordenação do HYNIC ao metal permanece desconhecida.^{1,2,3}

Para Tc (III) foi desenvolvida uma aproximação designada por "4+1" para estabilizar o centro metálico. Nesta aproximação é utilizado um ligando tetradentado do tipo NS_3 e um co-ligando monodentado.¹⁵² Os complexos formados apresentam uma estrutura do tipo indicado na figura 4.5.

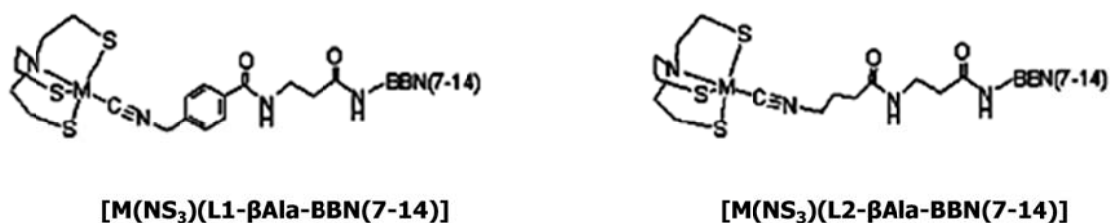


Figura 4.5: Aproximação "4+1" para marcação de análogos da bombesina (BBN) com Tc (III).¹⁵²

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

A avaliação de diversos conjugados da BBN marcados com ^{99m}Tc levou a resultados encorajadores, mas apenas alguns desses compostos foram testados a nível clínico.

O radiopéptido cuja estrutura se mostra na figura 4.6, normalmente designado por ^{99m}Tc -RP-527, contém uma estrutura quelante do tipo N_3S ligada à BBN[7-14] por um ácido Gly-5-aminovalérico, e a sua utilização permitiu a identificação de tumores primários da mama e da próstata e das respectivas metástases.^{153,154}

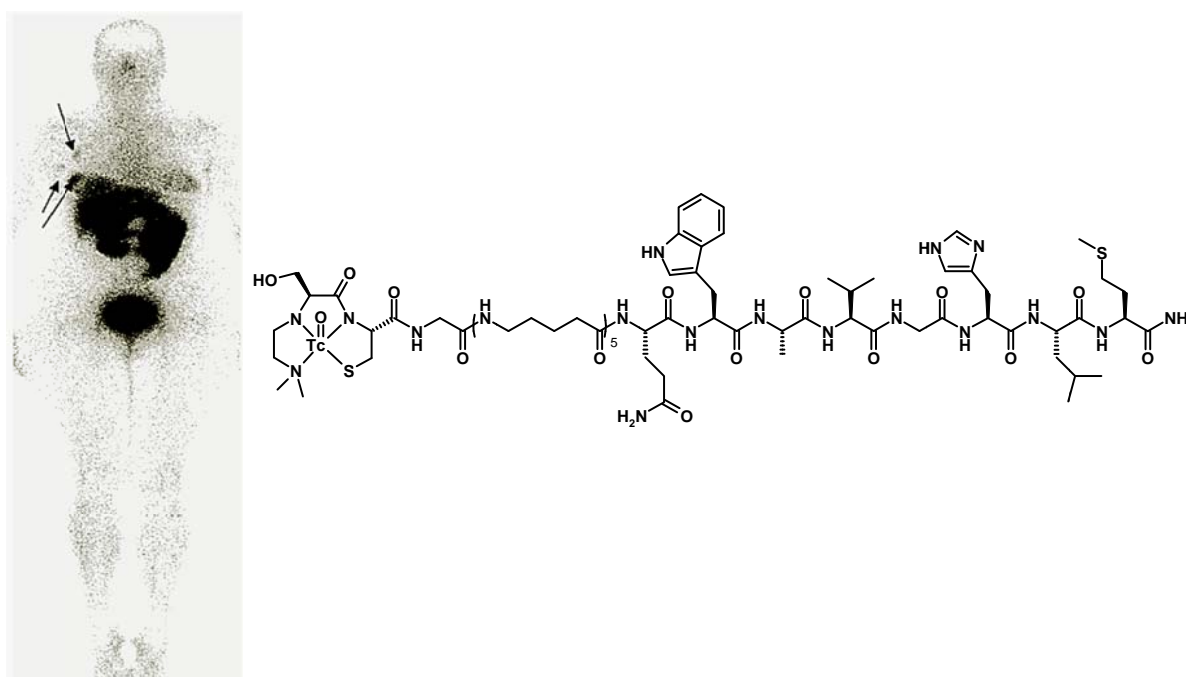


Figura 4.6: Estrutura de ^{99m}Tc -RP-527 e imagem SPECT de um paciente obtida após injeção deste composto (as setas indicam metástases ósseas).¹⁵⁴

Foi desenvolvido o composto ^{99m}Tc -Demobesina-1 ($[\text{}^{99m}\text{Tc-N}_4\text{-bzlgl}^0, (\text{D})\text{Phe}^6, \text{Leu-NHEt}^{13}, \text{des-Met}^{14}]\text{BBN}(6-14)$), que contém a unidade $\text{trans-}[\text{TcO}_2]^+$ e uma tetraamina linear (bzlgl = 6- $\{p$ -[(carboximetoxi)acetil] aminobenzil}-1,4,8,11-tetraundecano) como ligando bifuncional (Fig. 4.7).¹⁵⁵ Este composto radioactivo exibiu a mais elevada acumulação tumoral descrita na literatura em ratinhos com tumores PC-3 induzidos. Este radiopéptido apresentava

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

ainda uma elevada estabilidade *in vivo*, um perfil farmacocinético favorável e um carácter antagonista.^{155,156}

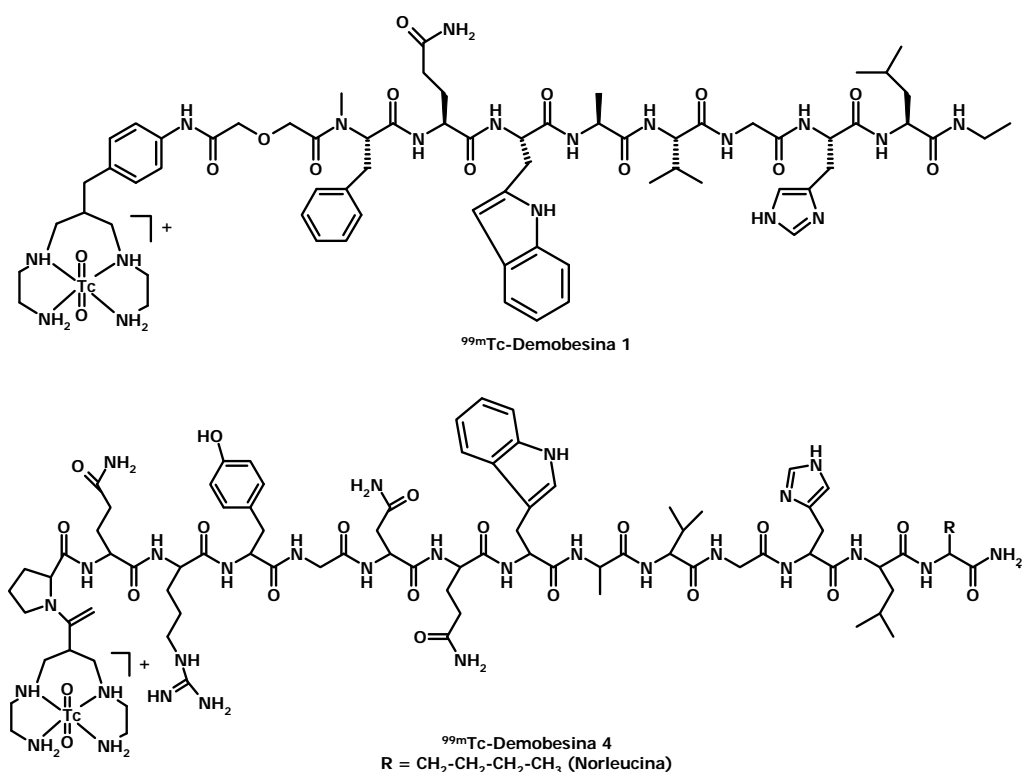


Figura 4.7: Estruturas de ^{99m}Tc-Demobesina-1 e ^{99m}Tc-Demobesina-4.¹⁰⁹

Os resultados anteriores serviram de base para novos estudos que levaram à síntese do complexo ^{99m}Tc-Demobesina-4 (^{99m}Tc-[N₄,Pro¹,Tyr⁴,Nle¹⁴]BBN) (Fig. 4.7).¹⁰⁹ Este composto possui carácter agonista, uma elevada internalização em células PC-3 e apresenta uma elevada retenção em tumores PC-3 induzidos em ratinhos. Os resultados pré-clínicos favoráveis para este composto foram suficientes para validar a realização de ensaios clínicos. Actualmente estão a decorrer ensaios clínicos de fase I com este composto para imagiologia de pacientes com cancro da próstata.¹⁵⁷

Como já referido, a introdução do complexo *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ por Alberto e colaboradores^{41,42} abriu novas possibilidades para o desenvolvimento de estruturas biológicas específicas marcadas com ^{99m}Tc (I). A marcação de péptidos, com base nesta aproximação

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

organometálica, tem sido descrita por vários grupos de investigação que têm recorrido a ligandos bifuncionais bi ou tridentados.^{34,36,37,158-161} Com base nos dados conhecidos os complexos estabilizados por ligandos tridentados são mais estáveis *in vivo* do que os que envolvem agentes bifuncionais bidentados. Isto sucede porque na presença de agentes quelantes tridentados todos os locais de ligação disponíveis no fragmento metálico *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ficam ocupados, minimizando-se a possibilidade de ocorrência de reacções de trans-metalação quando em presença de proteínas séricas e minimizando a acumulação do composto radioactivo em tecidos não alvo.¹⁶²

No Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas, estudos efectuados com ligandos bifuncionais tridentados contendo uma unidade pirazolo-diamina mostraram que estes podiam ser facilmente ligados a análogos da BBN e utilizados para estabilizar a unidade *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$.^{36,37} Os complexos resultantes possuíam uma elevada estabilidade cinética *in vivo* e, a introdução de uma cadeia espaçadora, de natureza peptídica, entre o metal e o péptido, demonstrou afectar a via de excreção, a acumulação nos tecidos não alvo e a especificidade de ligação aos receptores.^{36,37}

No seguimento destes estudos escolhemos os ligandos pirazolo-diamina para funcionalizar com moléculas que interagem com o ADN como foi discutido no capítulo 2. Com base nos resultados obtidos (capítulos 2 e 3) continuámos a funcionalização desses ligandos com análogos da BBN, para introduzir especificidade para células que expressam receptores deste péptido nos complexos a estabilizar com estes ligandos.

Neste capítulo iremos descrever a ligação de diferentes análogos da BBN a ligandos bifuncionais pirazolo-diamina contendo uma unidade intercaladora (Fig. 4.8). Descrever-se-ão ainda reacções destas estruturas quelantes com o precursor *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ para obtenção de complexos de ^{99m}Tc (I) (Fig. 4.8).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

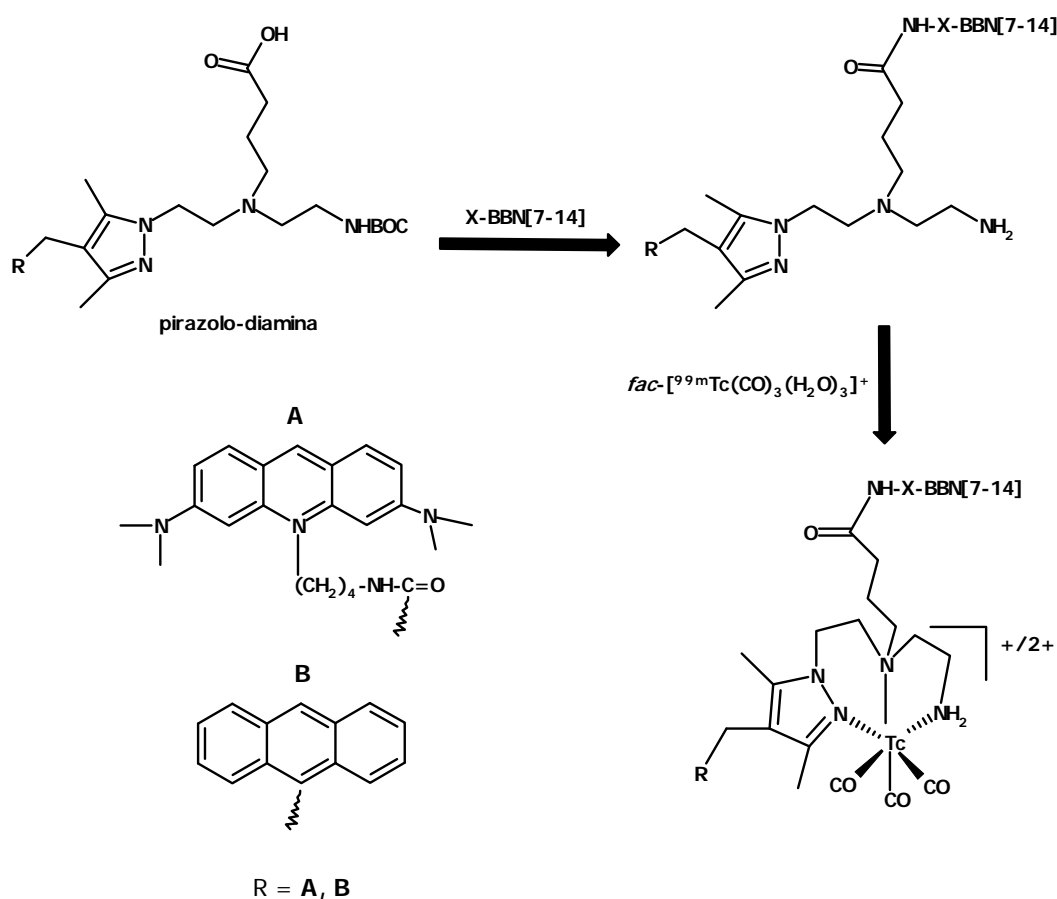


Figura 4.8: Estruturas pirazolo-diamina contendo análogos da bombesina (BBN) e uma unidade intercaladora do ADN (R).

Tendo em conta que pretendemos explorar o potencial terapêutico do ^{99m}Tc, como emissor Auger, seria desejável obter complexos de ^{99m}Tc com elevada capacidade de internalização nuclear. Com este objectivo estudámos também a possibilidade de ligar às estruturas anteriores uma sequência peptídica localizadora do núcleo (NLS, *nuclear localizing sequence*). Pensa-se que o NLS se liga a substâncias a translocar do citoplasma para o núcleo, acompanha-as através dos poros nucleares (PN) até ao núcleo, liberta-as e regressa novamente ao citoplasma, como se exemplifica na figura 4.9.¹⁶³⁻¹⁶⁵

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

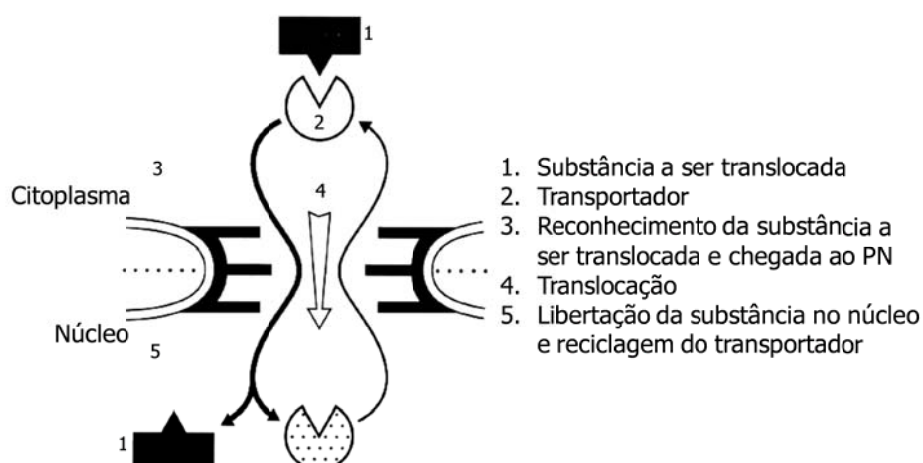


Figura 4.9: Transporte nucleocitoplasmático promovido pelo NLS (PN = poro nuclear).¹⁶⁴

As sequências NLS contêm aa básicos tal como o antígeno LT do vírus símio 40 (SV40, ¹²⁶Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val¹³²).¹⁶⁶ Pretendíamos assim determinar se a acção conjunta do análogo da BBN e do NLS fornecia especificidade aos complexos de ^{99m}Tc e favorecia a internalização nuclear do complexo radioactivo.

4.2. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS)

Todos os análogos da BBN explorados nesta tese, assim como a sequência NLS, foram obtidos com base no princípio da síntese peptídica, que consiste na formação de uma ligação amida entre uma amina primária de um aa e um grupo carboxilato do aa seguinte, com eliminação de uma molécula de água. Esta síntese foi realizada em fase sólida (SPPS, *solid phase peptide synthesis*) utilizando o Fmoc como grupo protector num sintetizador automático.

167

A síntese em fase sólida é vantajosa uma vez que o péptido vai crescendo ligado a um suporte insolúvel, o que permite separá-lo facilmente de quaisquer outros reagentes e impurezas existentes em solução. Este procedimento pode ser automatizado e as relações molares utilizadas permitem que as reacções prossigam até serem completas num período de

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

tempo mínimo, sendo possível obter péptidos com elevada pureza. O suporte sólido é uma resina que deve ser estável e insolúvel nos solventes utilizados na síntese peptídica e deve ter um grupo funcional que permita a sua ligação ao primeiro aa da sequência.¹⁶⁸

A escolha da resina é extremamente importante para a síntese peptídica. No trabalho apresentado nesta tese foi utilizada a resina rink amide MBHA que se encontra representada na figura 4.10. Este tipo de resina consiste numa matriz de poliestireno com 1% de divinilbenzeno e é utilizada na síntese de péptidos com uma função amida no C-terminal da sequência.

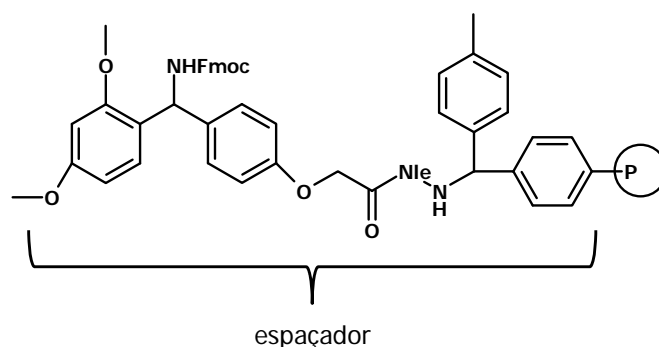


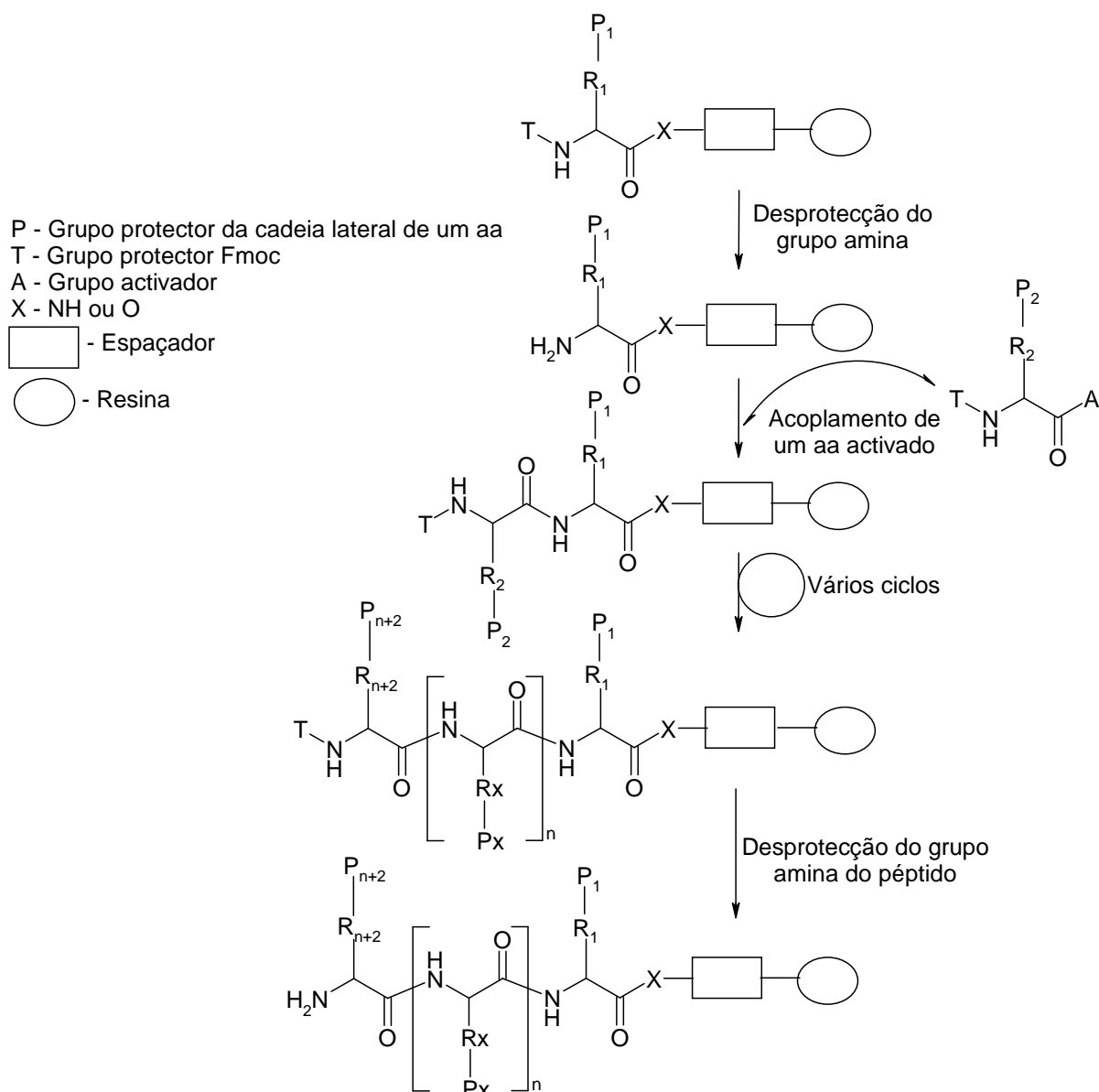
Figura 4.10: Resina rink amide MBHA (P = matriz de poliestireno).

Como se exemplifica no esquema 4.1, o péptido a construir liga-se à resina pelo terminal -COOH e terá o terminal -NH₂ protegido com um grupo Fmoc. O passo seguinte consiste na remoção do grupo protector Fmoc, com uma solução que contém cerca de 20 a 25% de piperidina em DMF, para realizar o acoplamento do aa seguinte.¹⁶⁸

O acoplamento do aa seguinte requer a activação da sua função -COOH. A escolha do activador deve ter em conta a facilidade de utilização, rapidez das reacções e ausência de reacções secundárias. Um dos activadores mais utilizados é o hexafluoro-fosfato de o-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronium (HBTU). Também é habitual incluir um nucleófilo auxiliar, tal como o 1-hidroxibenzotriazolo (HOBT). Estes reagentes são referidos como reagentes de activação *in situ*. Os passos anteriormente descritos são então repetidos até ser obtida a sequência peptídica desejada.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Esquema 4.1



O último passo consiste na remoção da sequência peptídica da resina e na desprotecção selectiva dos grupos protectores das cadeias laterais dos aa que a constituem. As condições de reacção dependem do número e sequência dos aa presentes, dos grupos protectores que possam existir nas cadeias laterais e do tipo de espaçador que liga o péptido à resina. A quebra da ligação à resina é tipicamente realizada com uma solução de TFA contendo sequestrantes apropriados. Estes são utilizados para rodear os grupos protectores das cadeias laterais dos aa evitando que reajam com a cadeia peptídica. Neste trabalho, foi utilizada uma

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

mistura constituída por tioanisolo:H₂O:etanoditiol:TFA, na proporção 2:1:1:36.¹⁵⁹ Contudo, antes de remover a sequência peptídica da resina é necessário lavá-la com CH₂Cl₂ para eliminar alguma DMF residual e garantir a acidólise por parte do TFA.

Após a quebra da ligação à resina, a mistura que contém a resina e o péptido é filtrada, obtendo-se no filtrado o péptido livre. A adição lenta de Et₂O gelado ao filtrado leva à precipitação do péptido sob a forma de flocos brancos. Este sólido é separado por centrifugação, lavado várias vezes com Et₂O gelado e seco sob vácuo. O sólido obtido pode ainda ter que ser purificado por HPLC, para remover alguns dos agentes sequestrantes ou outras pequenas moléculas. Após purificação, os péptidos são caracterizados por HPLC e espectrometria de massa.

4.2.1. Síntese de Análogos da Bombesina em Fase Sólida

As sequências peptídicas exploradas nesta tese foram preparadas num sintetizador automático utilizando a química de protecção Fmoc e a técnica SPPS descrita anteriormente. Estes análogos peptídicos possuem a sequência de aa [7-14] da BBN natural, responsável pela ligação ao GRPr. A esta sequência, BBN[7-14], foram adicionados os tripéptidos **SGS** (Ser-Gly-Ser) ou **GGG** (Gly-Gly-Gly) como possíveis modeladores da farmacocinética e/ou como forma de evitar a conjugação directa da BBN[7-14] ao ligando bifuncional. Para além disso, ao péptido BBN[7-14] adicionou-se também uma sequência **NLS** (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val) e uma sequência **GGG-NLS** (Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val). Resumidamente, os análogos da BBN estudados nesta tese foram os seguintes:

- Ser-Gly-Ser-BBN[7-14]: **SGS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-BBN[7-14]: **GGG-BBN**
- Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **NLS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **GGG-NLS-BBN**

A caracterização das diferentes sequências peptídicas foi feita por ESI-MS e HPLC, encontrando-se os resultados obtidos na tabela 4.2.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Tabela 4.2: Caracterização por ESI-MS e HPLC das diferentes sequências peptídicas.

Análogo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método*	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
SGS-BBN	A/C	13,78	1171,54 586,28	1171,6 [M] ⁺ 586,3 [M+H] ²⁺	C ₅₁ H ₇₇ N ₁₅ O ₁₅ S ₁
GGG-BBN	A/C	13,91	1111,52	1111,54 [M] ⁺	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₁
NLS-BBN	A/C	13,38	1806,06	1805,62 [M] ⁺	C ₈₃ H ₁₄₀ N ₂₆ O ₁₇ S ₁
GGG-NLS-BBN	A/C	11,00	989,07 659,71 495,04	989,3 [M+H] ²⁺ 659,9 [M+2H] ³⁺ 495,3 [M+3H] ⁴⁺	C ₈₉ H ₁₄₉ N ₂₉ O ₂₀ S ₁

*Método de HPLC utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (capítulo 6)

4.3. Conjugação de Análogos da Bombesina a Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo Unidades Intercaladoras

Dos ligandos sintetizados e caracterizados que descrevemos nos capítulos anteriores só escolhemos os que se encontram apresentados na figura 4.11 para prosseguir os estudos de conjugação a análogos da BBN. Estes compostos, **23** (L3-BOC) e **32** (L5-BOC), correspondem aos ligandos **L3** e **L5** protegidos na amina terminal com um grupo BOC.

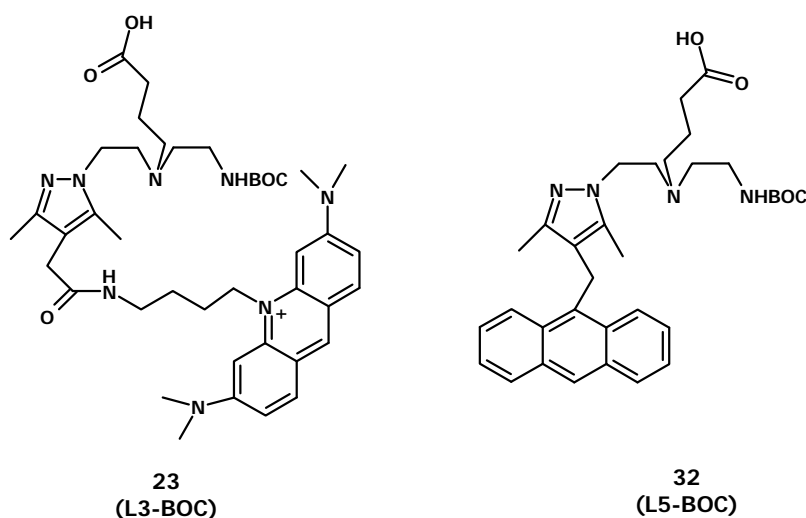
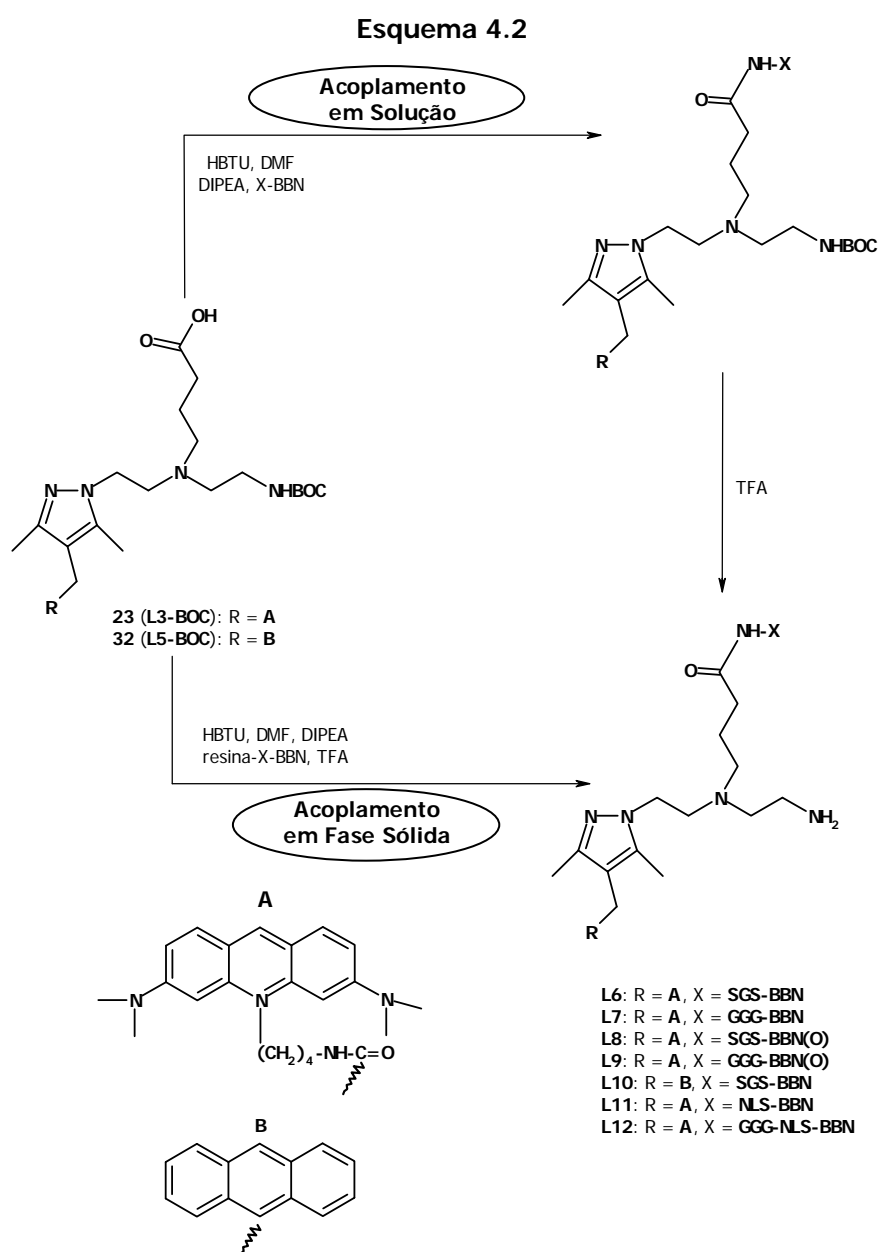


Figura 4.11: Estruturas dos compostos **23** e **32**.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Esta escolha deveu-se ao facto de os compostos base que lhes deram origem (compostos sem o braço butirico e sem o grupo protector BOC) serem aqueles que por si só ou após coordenação à unidade *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc) mostraram ter uma maior interacção com o ADN e/ou provocaram uma morte celular mais significativa.

Neste capítulo descreve-se a conjugação dos compostos **23** e **32** a análogos da BBN. Como se indica no esquema 4.2, esta conjugação fez-se por reacção do grupo carboxilato, presente na amina central das unidades pirazolo-diamina, com o grupo -NH₂ terminal das sequências peptídicas descritas na secção 4.2.1. deste capítulo.



4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Como também se encontra indicado no esquema 4.2, a conjugação das estruturas pirazolo-diamina, contendo unidades intercaladoras (**23** e **32**), às sequências peptídicas pode ser realizada em solução ou em fase sólida. Tendo em conta o número de passos reaccionais envolvidos, a conjugação em fase sólida seria preferível. No entanto, os vários estudos realizados mostraram que a conjugação para algumas sequências só era possível em solução.

Contudo, mesmo em solução as dificuldades experimentais encontradas exigiram que explorássemos diferentes condições reaccionais, nomeadamente: diferentes solventes e agentes activadores e de acoplamento e atmosfera normal ou de azoto. Na tabela 4.3 apresentamos, de um modo resumido, as diferentes combinações exploradas.

Tabela 4.3: Resumo das condições reaccionais estudadas para ligação de **23** às sequências peptídicas.

Reagentes/Solventes	Procedimento Experimental							
	A	B	C	D	E	F	G	H
X-BBN	√	√	-	√	-	√	√	√
X-BBN-Resina	-	-	√	-	√	-	-	-
H ₂ O	√	-	-	-	-	-	-	-
DMF	-	√	√	√	√	√	√	√
NHS/EDC	√	√	√	-	-	-	-	-
N-Sulfo-NHS/EDC	-	√	-	-	-	-	-	-
HBTU	-	-	-	√	√	-	√	√
HATU	-	-	-	-	-	√	-	-
DIPEA	-	-	-	√	√	√	√	√
Fmoc-Met-OH	-	-	-	-	-	-	√	
2-(metiltio)etanol	-	-	-	-	-	-	-	√

Como referido detalhadamente na parte experimental, o produto desejado só foi obtido quando a reacção de conjugação se processou em solução, utilizando as condições reaccionais indicadas na coluna D da tabela 4.3.

Os estudos iniciaram-se com o ligando pirazolo-diamina **23** e com a sequência **SGS-BBN**. O produto final obtido, após remoção do grupo BOC, foi analisado por espectrometria de

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

massa (MALDI-TOF). No espectro obtido foi possível observar a existência de vários picos sendo dois deles os mais proeminentes. Um desses picos correspondia ao ião molecular esperado (**L6**: $m/z = 900,48$ para $[M+H]^{2+}$) e o outro tinha uma massa que diferia em 16 unidades da do ião molecular do composto desejado **L6**. Esta diferença levou-nos a pensar que esta segunda espécie poderia corresponder ao conjugado peptídico desejado mas oxidado (**L8**: $m/z = 908,48$ para $[M+H]^{2+}$). A primeira análise por HPLC do produto obtido nestas reacções de conjugação não foi conclusiva, pois o cromatograma obtido apresentava um único pico maioritário com um pequeno ombro com tempo de retenção inferior (Fig. 4.12 A).

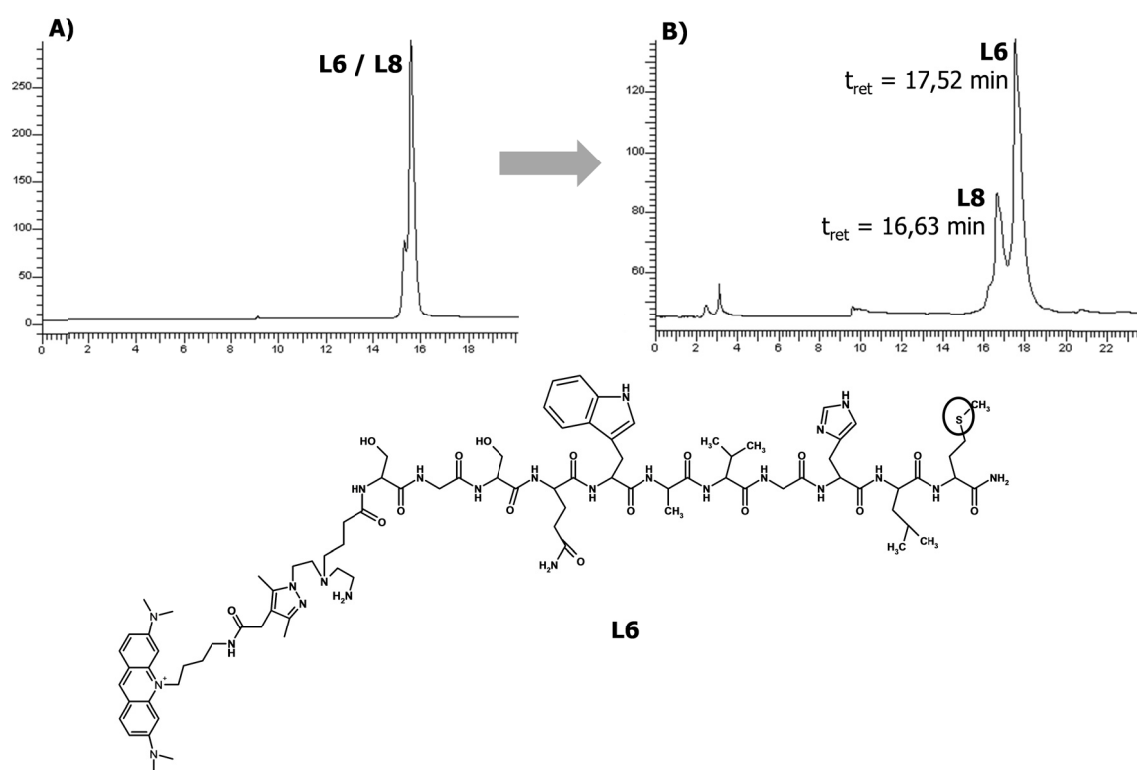


Figura 4.12: Cromatogramas de HPLC da mistura reaccional resultante da conjugação de **23** a **SGS-BBN**, obtidos com diferentes gradientes. (HPLC: coluna nucleosil 100-5 C18)

Pensou-se então que o facto de o cromatograma de HPLC não mostrar a presença inequívoca das duas espécies, identificadas na espectrometria de massa, se poderia dever aos solventes e/ou gradiente utilizado na análise de HPLC.

Efectivamente, pelo ajuste do método de eluição foi possível separar as duas espécies (Fig. 4.12 B). Cada uma dessas espécies foi recolhida separadamente e analisada novamente

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

por ESI-MS. Da análise de ESI-MS de cada uma delas, verificou-se que o pico com menor tempo de retenção (16,63 min) correspondia à espécie oxidada (**L8**) e que o pico com maior tempo de retenção (17,52 min) correspondia à espécie pretendida (**L6**).

Com base no que se encontra descrito na literatura, pensamos que a oxidação observada deverá ocorrer na Met da sequência peptídica. Resultados descritos na literatura indicam que este aa se oxida facilmente originando um derivado sulfóxido (Fig. 4.13). Este derivado peptídico é normalmente mais hidrofílico do que o péptido original.¹⁶⁹

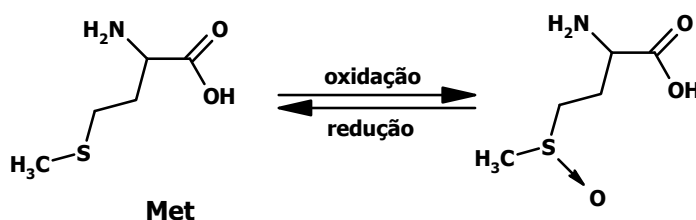
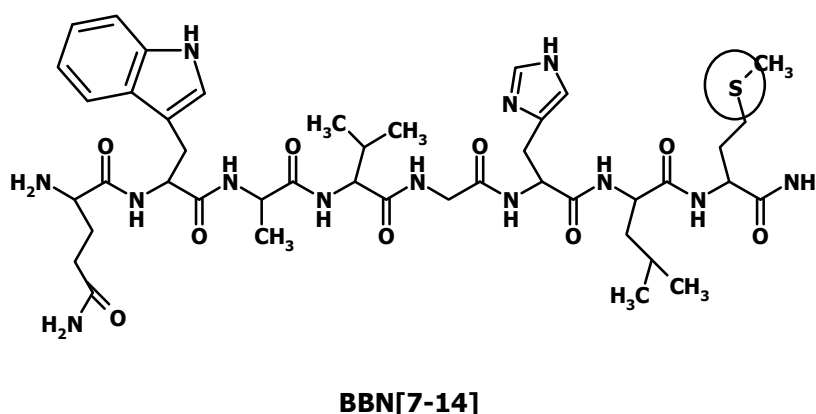


Figura 4.13: Metionina e respectivo produto de oxidação.

Na tentativa de evitar ou minimizar a oxidação observada, realizámos a reacção de conjugação de acordo com o procedimento D da tabela 4.3, na presença de Met livre ou do captador de radicais, (2-(metiltio)etanol). Em ambos os casos obtivemos sempre a espécie não oxidada e oxidada. Decidimos então realizar a síntese em atmosfera inerte, na presença de DMF seca. Nestas condições, embora tivéssemos observado alguma oxidação, o produto final obtido apresentava-se mais limpo. Por esta razão foi esta a metodologia aplicada na reacção de ligação de **23** às outras sequências peptídicas **GGG-BBN** e **NLS-BBN** e do ligando bifuncional **32** à sequência peptídica **SGS-BBN**.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

A caracterização por HPLC e ESI-MS dos diferentes conjugados peptídicos encontra-se, indicada de uma forma resumida, na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos conjugados peptídicos **L6-L12**.

Conjugado	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método**	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
L6 (L3-SGS-BBN)	C	17,52	900,48 600,66	900,1 [M+H] ²⁺ 600,3 [M+2H] ³⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₇ S ₁
L7 (L3-GGG-BBN)	C	17,22	870,47 580,65	869,8 [M+H] ²⁺ 580,4 [M+2H] ³⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₅ S ₁
L8* (L3-SGS-BBN(O))	C	16,63	605,99 908,48	605,7 [M+2H] ³⁺ 908,0 [M+H] ²⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₈ S ₁
L9* (L3-GGG-BBN(O))	C	16,54	585,98 878,47	585,8 [M+2H] ³⁺ 878,1 [M+H] ²⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₆ S ₁
L10 (L5-SGS-BBN)	A	15,92	806,91	807,3 [M+2H] ²⁺	C ₇₉ H ₁₀₉ N ₁₉ O ₁₆ S ₁
L11 (L3-NLS-BBN)	A	14,70	811,83 609,12	811,5 [M+2H] ³⁺ 609,2 [M+3H] ⁴⁺	C ₁₁₉ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₁₉ S ₁
L12 (L3-GGG-NLS-BBN)	C	14,14	868,85 651,89 521,71	868,8 [M+2H] ³⁺ 651,9 [M+3H] ⁴⁺ 521,7 [M+4H] ⁵⁺	C ₁₂₅ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₂ S ₁

*Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met; **Método de HPLC utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (capítulo 6).

Nas reacções de ligação da sequência **GGG-BBN** a **23 (L3-BOC)** os resultados foram semelhantes aos anteriormente descritos, pois obtivemos o conjugado não oxidado **L7** e o conjugado oxidado **L9**.

Verificou-se também que, após separação das espécies oxidada e não oxidada, os conjugados não oxidados (**L6** e **L7**) tinham tendência para se oxidarem lentamente durante o seu armazenamento originando as espécies oxidadas **L8** e **L9**, respectivamente.

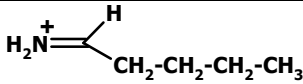
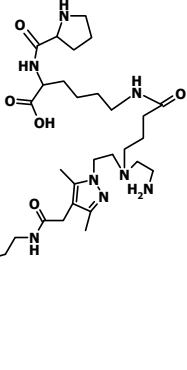
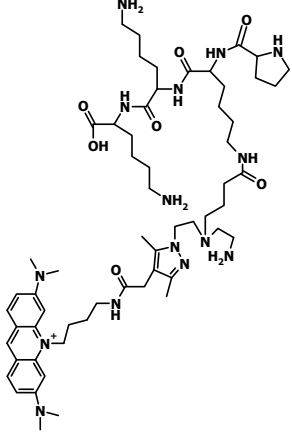
A ligação da sequência **NLS-BBN** ao composto **23 (L3-BOC)** foi também realizada em solução, utilizando o procedimento indicado na coluna D da tabela 4.3, e atmosfera de azoto. Ao contrário do que foi observado para as sequências **SGS-BBN** ou **GGG-BBN**, durante esta reacção não teve lugar qualquer oxidação da Met tendo resultado unicamente o composto **L11**,

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Para clarificar esta situação analisou-se o conjugado **L11** por MS-MS. Nesses espectros identificámos vários fragmentos que verificámos corresponder às espécies indicadas na tabela

4.5.

Tabela 4.5: Análise de MS-MS por MALDI do conjugado **L11**.

Espécie	Fragmento Teórico (Da)	Fragmento Observado (Da)
 <p>Pro (ião imónio)</p>	70,1	70,0
 <p>Pro-Lys(L3) (L3-PK)</p>	852,6	852,6
 <p>Pro-Lys(L3)-Lys-Lys (L3-PKKK)</p>	1108,9	1108,8

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Como se pode verificar, pela análise dos dados apresentados na tabela 4.5, não foi possível isolar um fragmento correspondente a **L3-Pro**, o que mostra que o composto **L3-BOC (23)** se ligou à cadeia lateral de uma Lys da sequência **NLS-BBN**. Mais especificamente, ligou-se à Lys que segue a Pro.

Tendo em conta os bons resultados *in vitro* que tínhamos obtido, nos estudos que realizámos com o complexo de ^{99m}Tc (I) que continha a sequência peptídica **GGG-BBN** (secção 4.5.1.1. deste capítulo), decidimos escolher esta sequência peptídica para ligar o NLS, isto é preparar o péptido **GGG-NLS-BBN**. Desta forma pretendia-se potenciar a internalização nuclear específica já observada para os complexos de ^{99m}Tc que continham a sequência **GGG-BBN**.

Para garantirmos a ligação do NLS à BBN através da Val e à sequência GGG através da Pro, preparámos a sequência peptídica **GGG-NLS-BBN** por SPPS e procedemos à sua conjugação ao composto **23 (L3-BOC)** também em fase sólida.

Esta síntese foi realizada seguindo o procedimento indicado na coluna D da tabela 4.3. Como todos os aa presentes tinham as suas cadeias laterais protegidas, assegurou-se que o único aa disponível para a formação da ligação amida com **23** era a Gly do N-terminal.

Após clivagem do conjugado, analisou-se a mistura por HPLC e verificou-se a formação de uma única espécie que foi caracterizada por ESI-MS como correspondendo ao conjugado **L12** (Fig. 4.16).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

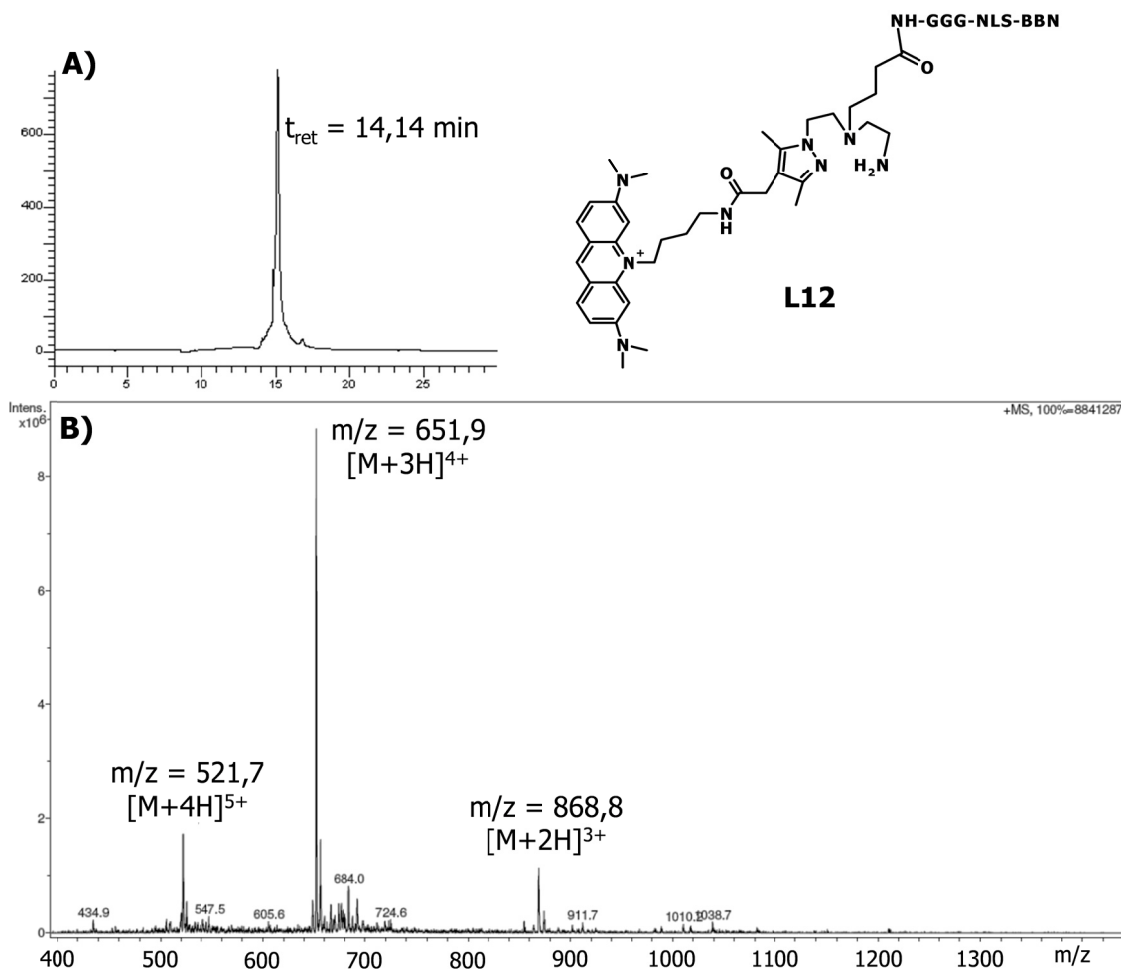


Figura 4.16: Cromatograma de HPLC (A) e espectro de massa de **L12** (B: ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna nucleosil 100-5 C18; método: C)

O conjugado **L12** foi também analisado por MS-MS (tabela 4.6).

Tabela 4.6: Análise de MS-MS por MALDI do conjugado **L12**.

Espécie	Fragmento Observado (Da)	Fragmento Teórico (Da)
L3-G	684,4	684,0
L3-GG	741,5	741,0
L3-GGG	798,5	798,1
L3-GGGP	895,6	895,1
L3-GGGPK	1023,7	1023,2
L3-GGGPKK	1151,8	1151,3
L3-GGGPKKK	1279,9	1279,4

G – Gly; P- Pro; K – Lys

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Como se pode ver na tabela 4.6, encontraram-se vários fragmentos que confirmaram que:

- a ligação de **L3** se fez ao grupo amina da Gly (**L3-G**) do N-terminal da sequência peptídica;
- o fragmento **L3-GGG** ligou-se à Pro da sequência NLS (**L3-GGGP**);
- a Pro encontra-se ligada ao grupo KKK subsequente (**L3-GGGPKKK**).

A ligação do composto **32 (L5-BOC)** à sequência **SGS-BBN** também foi realizada em solução utilizando o procedimento indicado na coluna D da tabela 4.3 em atmosfera de azoto. Nesta reacção observou-se a formação de uma única espécie que, após remoção do grupo BOC e análise por ESI-MS se confirmou corresponder ao conjugado desejado **L10** (Fig. 4.17). Durante esta síntese, não observámos qualquer oxidação da Met.

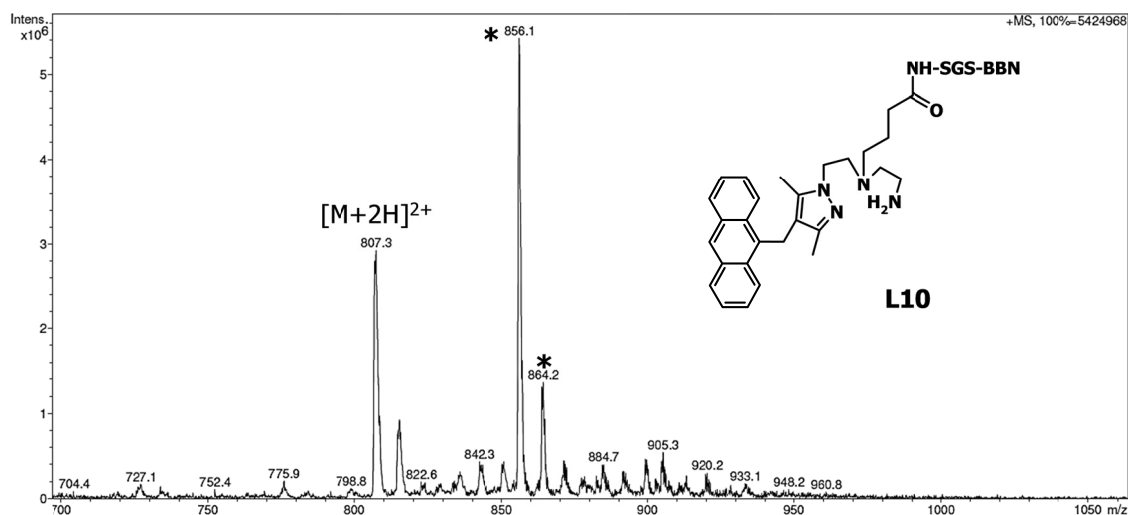
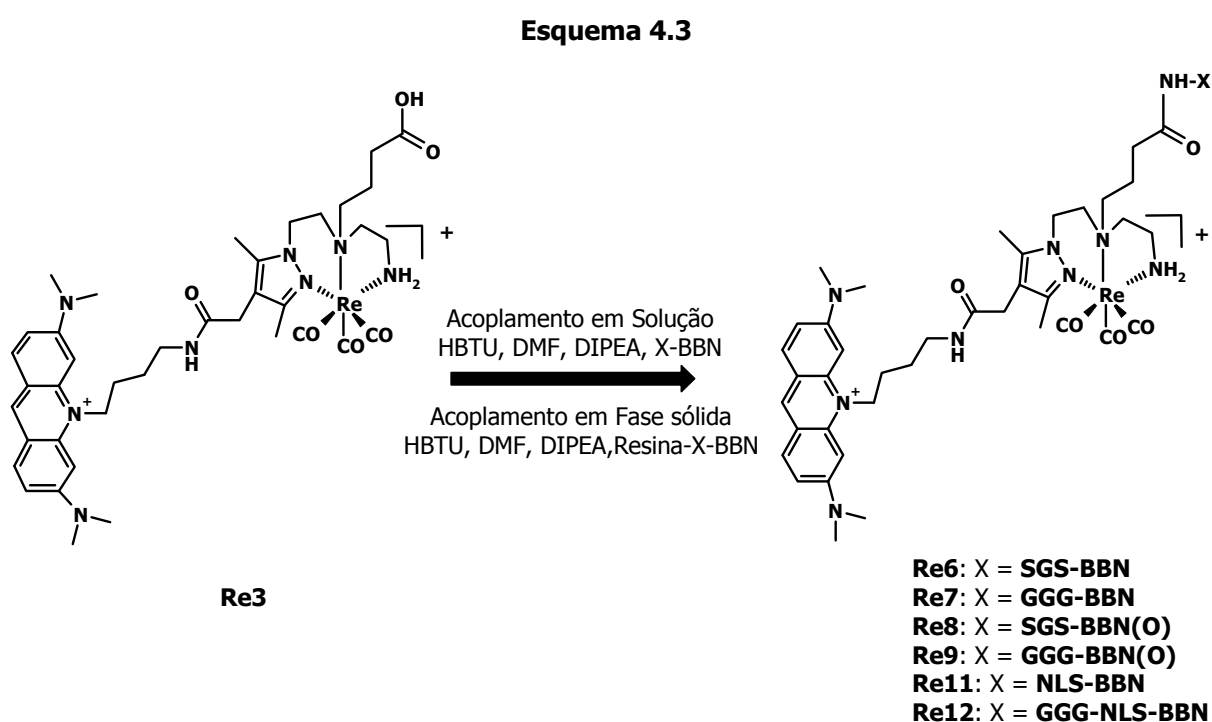


Figura 4.17: Espectro de massa de **L10** (ESI-MS; modo positivo) (* - pico não identificado).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

4.4. Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Os complexos de rénio (I) estabilizados por ligandos pirazolo-diamina contendo uma unidade intercaladora e análogos da BBN foram preparados conforme indicado no esquema 4.3.



Como se pode ver no esquema 4.3, em primeiro lugar sintetizámos o complexo de rénio **Re3**, conforme indicado no capítulo 2. Em seguida, este complexo reagiu com as diferentes seqüências peptídicas. A reacção teve lugar em DMF e o grupo carboxilato livre do complexo de rénio foi activado com HBTU na presença de DIPEA.

As reacções para obtenção dos complexos **Re6**, **Re7** e **Re11** foram feitas em solução, A reacção para obtenção de **Re12** decorreu em fase sólida. Destas reacções resultou sempre uma única espécie correspondente aos produtos desejados. Apesar destes compostos serem obtidos numa forma pura, durante o seu armazenamento verificámos existir alguma oxidação

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

da Met. Esta oxidação ocorria unicamente para **Re6** e **Re7**. Quando tal acontecia os compostos oxidados **Re8** e **Re9** eram separados por HPLC dos correspondentes complexos não oxidados **Re6** e **Re7**. Na tabela 4.7 encontra-se, de uma forma resumida, a caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos de rénio (I), bem como dos complexos oxidados **Re8** e **Re9**.

Tabela 4.7: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos **Re6-Re9**, **Re11** e **Re12**.

Complexo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método**	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
Re6 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L6)] ²⁺)	C	20,48	1034,94 690,30	1034,5 [M] ²⁺ 690,1 [M+H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₀ Re ₁ S ₁
Re7 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L7)] ²⁺)	C	20,63	1004,94 670,29	1004,7 [M] ²⁺ 670,3 [M+H] ³⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₈ Re ₁ S ₁
Re8* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L8)] ²⁺)	C	19,00	695,63 1042,95	695,9 [M+H] ³⁺ 1043,0 [M] ²⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₁ Re ₁ S ₁
Re9* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L9)] ²⁺)	C	20,04	675,63 1012,94	675,6 [M+H] ³⁺ 1012,6 [M] ²⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₉ Re ₁ S ₁
Re11 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L11)] ²⁺)	A	15,04	1809,94	1809,1 [2M+Na-2H] ³⁺	C ₁₂₂ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₂₂ Re ₁ S ₁
Re12 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L12)] ²⁺)	C	16,88	958,83 719,37 575,70	958,3 [M+H] ³⁺ 719,3 [M+2H] ⁴⁺ 575,7 [M+3H] ⁵⁺	C ₁₂₈ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₅ Re ₁ S ₁

*Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met; **Método de HPLC utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (capítulo 6).

A título de exemplo, mostram-se na figura 4.18 os cromatogramas de HPLC e os espectros de ESI-MS obtidos para o complexo **Re7** e para o complexo correspondente oxidado **Re9**.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

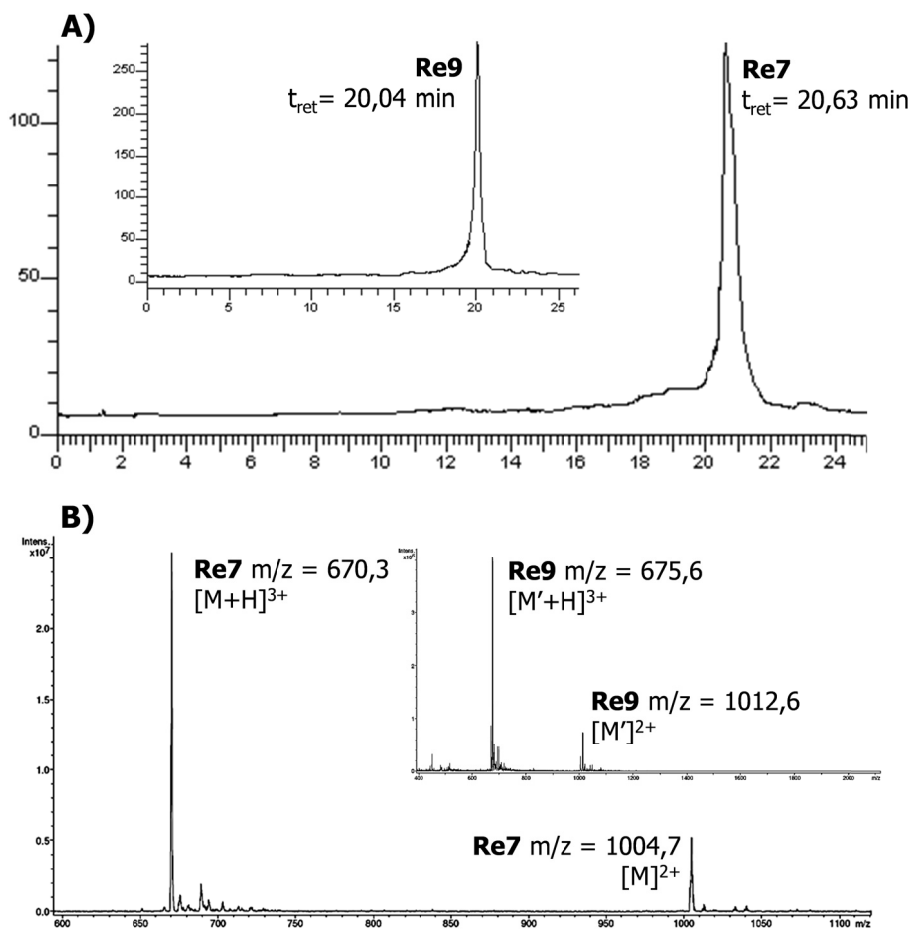


Figura 4.18: Cromatogramas de HPLC (A) e espectros de massa (B) de **Re7** e **Re9** (ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna 100-5 C18: método: C)

A reação entre **Re3** e a sequência **NLS-BBN** originou o complexo **Re11** (esquema 4.3). No entanto, o espectro de ESI-MS de **Re11** era mais complexo (Fig. 4.19) do que os observados para os restantes complexos metálicos.

Por observação do espectro de ESI-MS de **Re11** (Fig. 4.19 A) verificou-se a presença de um pico de fraca intensidade com $m/z = 1809,1$ que correspondia ao ião molecular de **Re11** ($[2M+Na-2H]^{3+}$). Também identificámos um pico com m/z igual a 593,3 correspondente ao complexo de rénio, com a unidade pirazolo-diamina e a sequência peptídica, mas sem o fragmento intercalador (**18**). A perda do intercalador poderá ter ocorrido durante a análise de

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

ESI-MS, uma vez que no cromatograma de HPLC, do produto purificado, apenas se observava a presença de uma única espécie bem definida (Fig. 4.19 B).

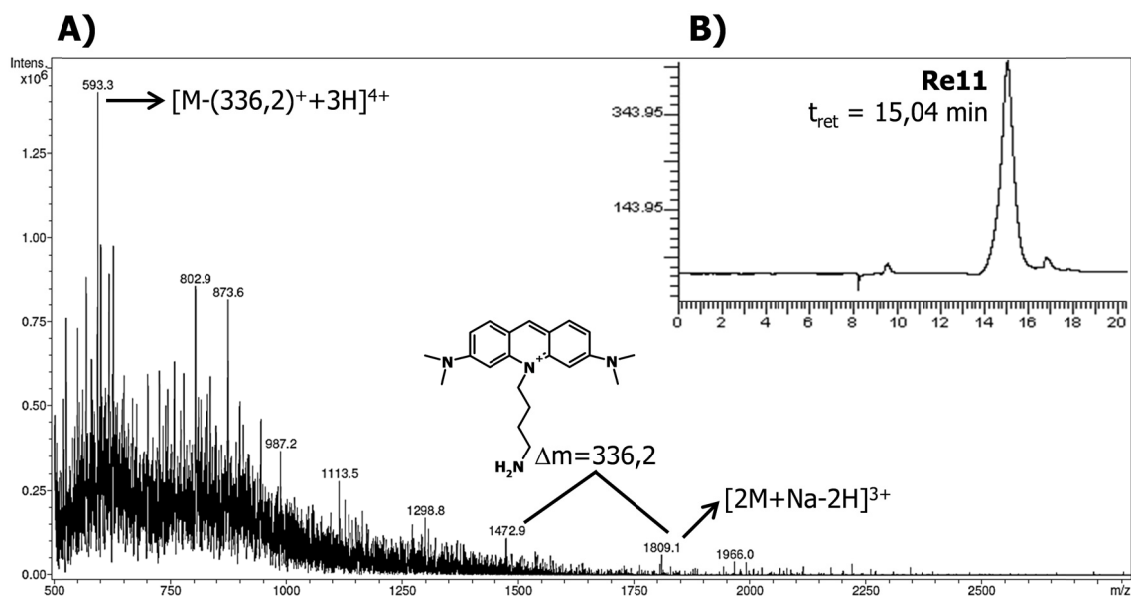


Figura 4.19: Espectro de massa (A: ESI-MS; modo positivo) e cromatograma de HPLC (B) de **Re11**. (HPLC: coluna 100-5 C18; método: A)

Da reacção entre **Re3** e a sequência **GGG-NLS-BBN**, que decorreu em fase sólida, resultou uma única espécie, cuja caracterização por HPLC e ESI-MS mostrou corresponder a **Re12** (Fig. 4.20).

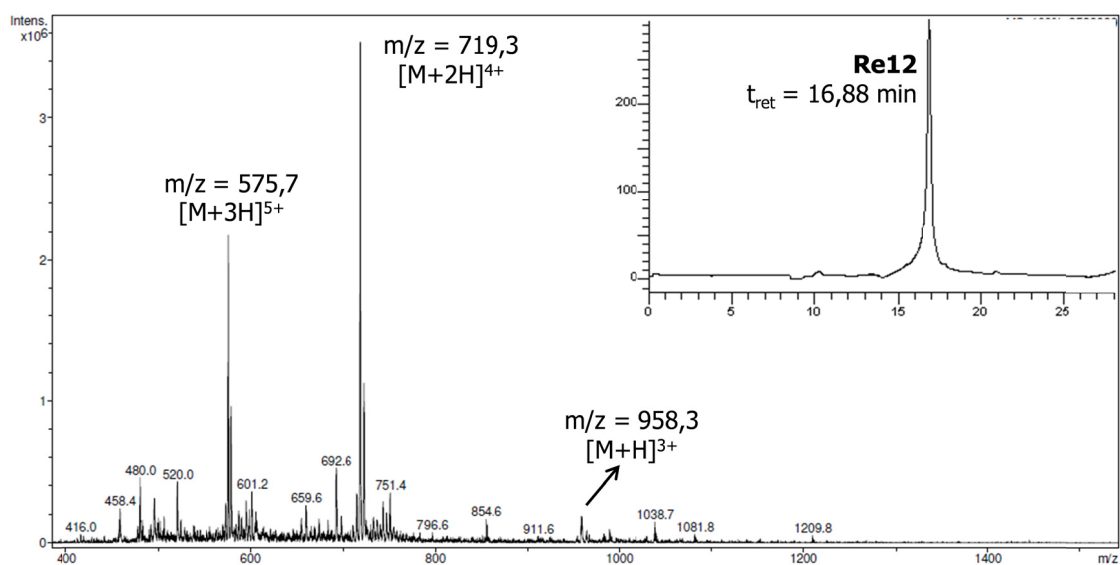


Figura 4.20: Cromatograma de HPLC e espectro de massa de **Re12** (ESI-MS; modo positivo). (HPLC: coluna 100-5 C18; método: C)

4.4.1. Estudos Celulares Dinâmicos com Complexos de Rénio (I)

Para avaliar a cinética de internalização e a localização celular dos complexos de rénio (I), contendo análogos da BBN, fizemos o estudo desses complexos com células humanas PC-3 por microscopia confocal de fluorescência. Para isso, utilizámos as propriedades fluorescentes das unidades intercaladoras presentes nas estruturas dos complexos.

Os compostos com que iniciámos estes estudos foram **Re6** e **Re7**. Soluções aquosas destes compostos de concentração igual a $1,5 \times 10^{-5}$ M foram adicionadas às células PC-3, previamente incubadas com um corante de referência para o núcleo (dihidroetídio). Após adição dos compostos de rénio às células, fomos registando imagens sequenciais das células durante 1 hora. Os compostos **Re6** e **Re7** foram detectados pela emissão de fluorescência verde.

Na figura 4.21 apresentam-se as imagens obtidas nos estudos dinâmicos de microscopia confocal de fluorescência para os compostos **Re6** e **Re7**. A análise das imagens obtidas ao longo do tempo permite-nos ter uma ideia sobre a cinética de internalização dos complexos **Re6** e **Re7** nas células humanas PC-3.

Verificámos que ambos os compostos entravam nas células PC-3 e chegavam ao núcleo das mesmas. Qualitativamente, observou-se que o complexo **Re7** que contém a sequência **GGG-BBN**, apresentava uma internalização mais lenta embora mais elevada do que o complexo **Re6**. A quantificação destes resultados foi efectuada estudando as mesmas células (PC-3) com os correspondentes complexos de ^{99m}Tc (secção 4.5.1.1. deste capítulo).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

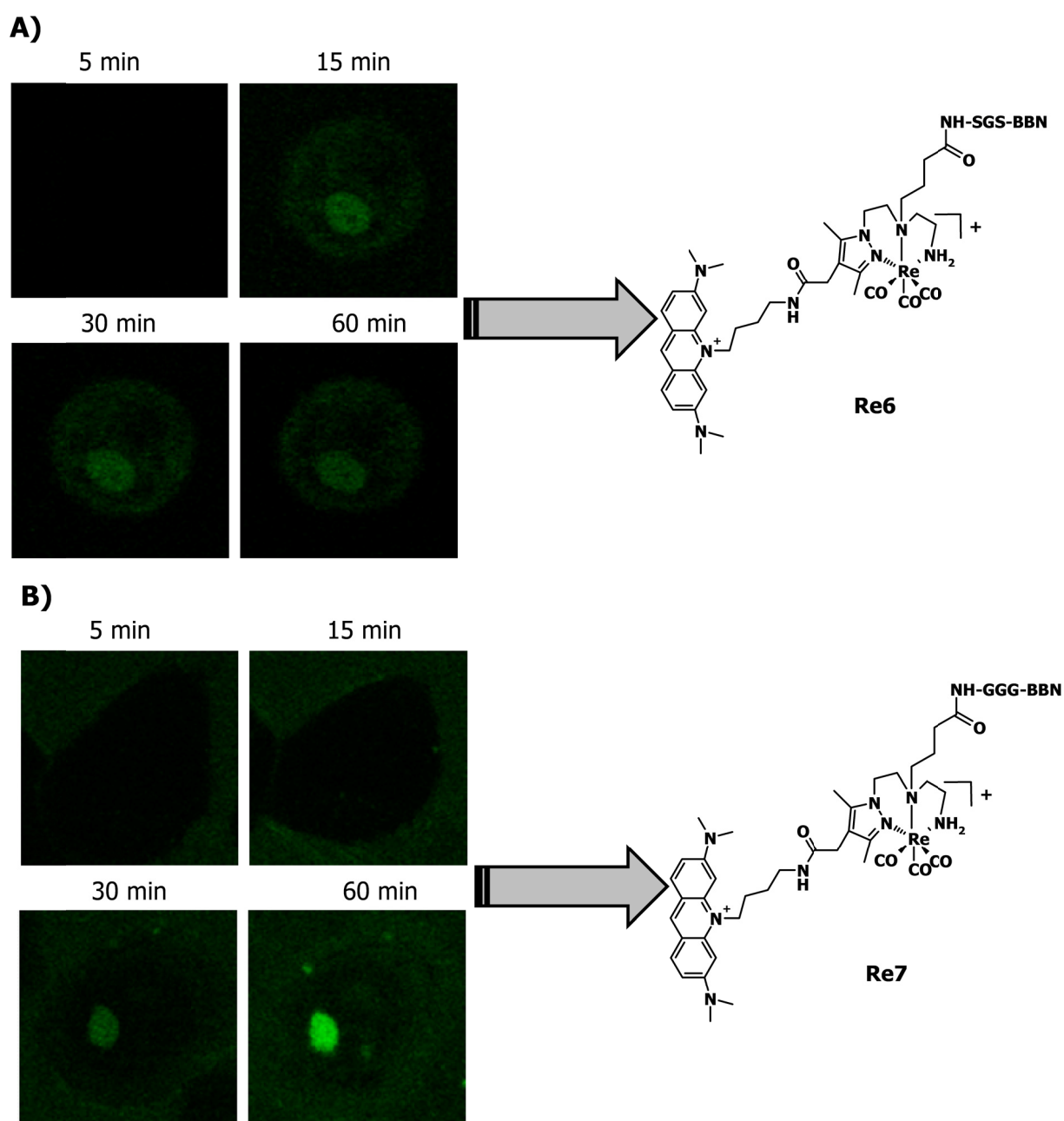


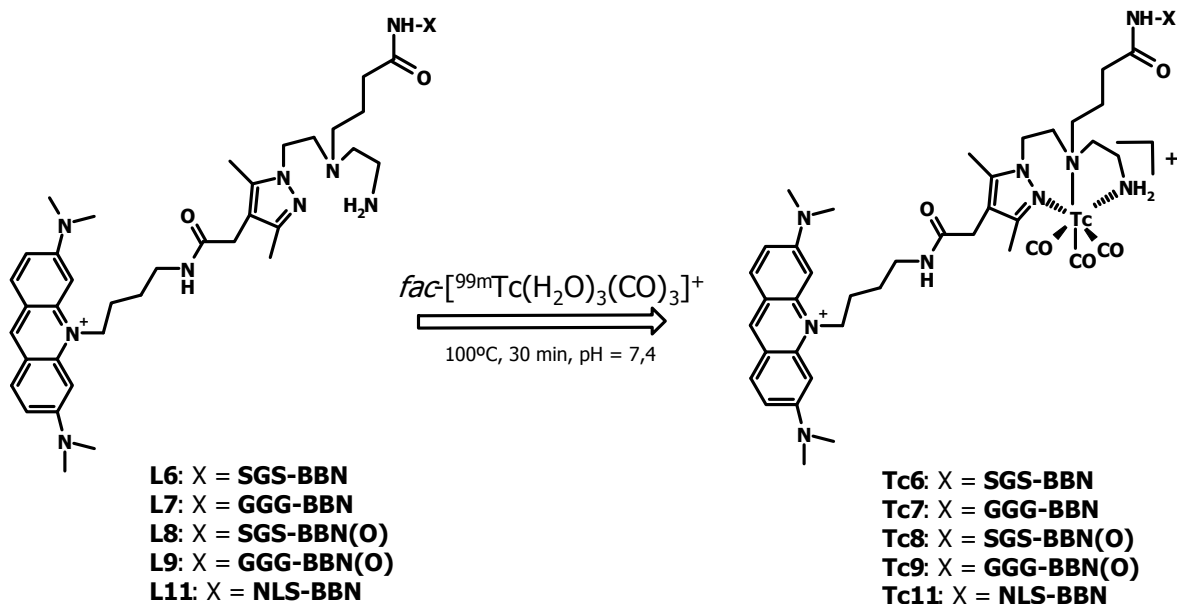
Figura 4.21: Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência de uma célula PC-3 na presença de $1,5 \times 10^{-5}$ M de **Re6** (A) e **Re7** (B). Verde: compostos. Imagens adquiridas a 5, 15, 30 e 60 min após adição dos compostos.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

4.5. Síntese e Caracterização de Complexos de Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

A síntese dos complexos de ^{99m}Tc estabilizados por ligandos pirazolo-diamina, contendo uma unidade intercaladora e análogos da BBN, foi feita por reacção do precursor $\text{fac}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ com alíquotas de soluções aquosas dos conjugados **L6-L9** e **L11**. Os conjugados oxidados **L8** e **L9**, que foram separados dos conjugados não oxidados **L6** e **L7** por HPLC, foram aqui utilizados para a preparação dos respectivos complexos de ^{99m}Tc , **Tc8** e **Tc9**. As reacções eram completas após 30 minutos a 100°C e a pH 7,4 (esquema 4.4). As condições reaccionais para formação dos diferentes complexos foram optimizadas e encontram-se resumidas na tabela 4.8.

Esquema 4.4



4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Tabela 4.8: Condições de síntese e características dos complexos **Tc6-Tc9** e **Tc11**

Complexo	C (M)	t _{ret} (min) ^a	η	log D _{o/w} ± s
Tc6	2,4 x 10 ⁻⁵	20,67 (20,48)	82%	-0,68 ± 0,07
Tc7	2,5 x 10 ⁻⁵	20,88 (20,63)	97%	-1,91 ± 0,05
Tc8 *	2,9 x 10 ⁻⁵	19,04 (19,00)	99%	-0,83 ± 0,11
Tc9 *	2,2 x 10 ⁻⁵	20,08 (20,04)	99%	-1,70 ± 0,02
Tc11	2,3 x 10 ⁻⁵	15,75 (15,04)	96%	-1,51 ± 0,03

^a Os valores entre parêntesis referem-se aos complexos de rénio; * Complexos oxidados; C = concentração final de ligando; t_{ret} = tempo de retenção; log D_{o/w} = lipofilia.

Para que os complexos de ^{99m}Tc se formem é necessário utilizar concentrações dos respectivos conjugados da ordem 10⁻⁵ M. Esta é a mesma ordem de grandeza da concentração utilizada para preparar o complexo base **Re1** em que utilizámos o ligando pirazolo-diamina com o intercalador sem o conjugado peptídico (ver tabela 3.1 no capítulo 3). Desta forma verifica-se que a introdução das sequências peptídicas não afectou a capacidade de coordenação dos ligandos pirazolo-diamina face à unidade *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺.

A título exemplificativo, na figura 4.22 encontram-se representados os cromatogramas de HPLC referentes à co-injecção dos complexos **Re7** e **Tc7**.

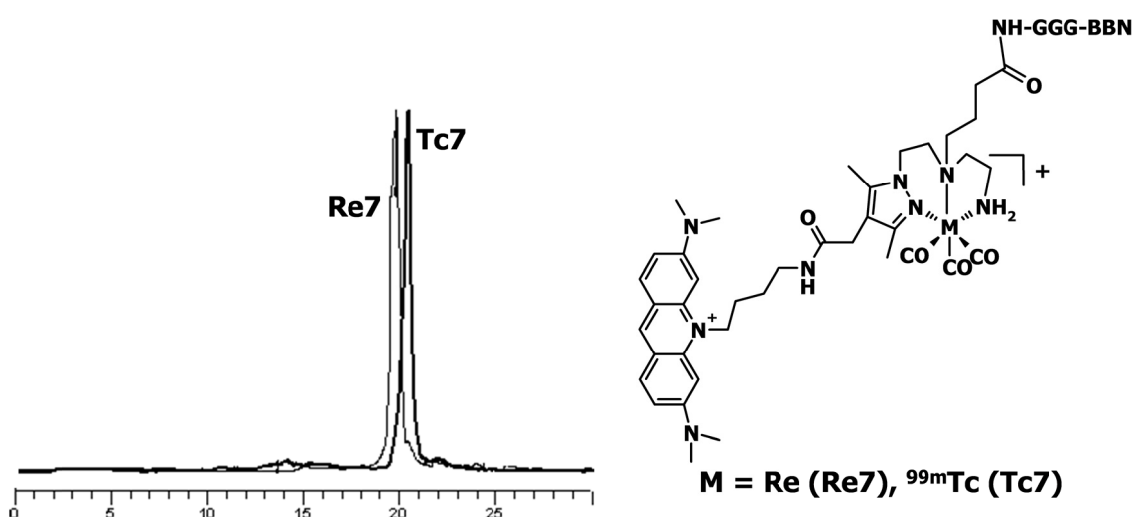


Figura 4.22: Cromatograma de HPLC obtido após a co-injecção dos complexos **Re7** e **Tc7**.

(HPLC: coluna Nucleosil 100-5 C18; método C)

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

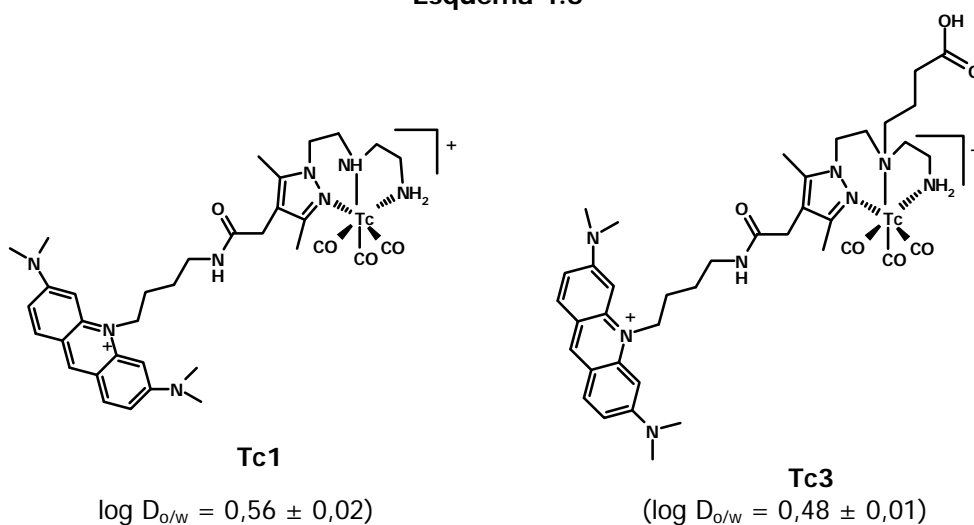
Quando se prepararam os complexos de ^{99m}Tc com as sequências peptídicas verificou-se que esses compostos tinham tendência para ficar parcialmente adsorvidos às paredes dos recipientes onde decorriam as reacções. Tentámos então encontrar condições experimentais que fossem capazes de minimizar ou eliminar esta tendência. Tentámos preparar os complexos de ^{99m}Tc adicionando 10% de EtOH às soluções aquosas dos ligandos. Quando utilizámos estas condições experimentais para preparar **Tc6** e **Tc7** verificámos que se formavam as espécies oxidadas **Tc8** e **Tc9** correspondentes em proporções muito significativas.

Tendo em conta este resultado, decidimos preparar o complexo **Tc6** em solução unicamente aquosa. Após formação do complexo, arrefecemos a mistura reaccional até à temperatura ambiente e então adicionámos um pouco de EtOH. Nestas condições verificámos que o complexo **Tc6** não se oxidava e que minorávamos a sua adsorção às paredes do frasco onde decorreu a reacção. Esta metodologia foi então adoptada na síntese dos restantes complexos de ^{99m}Tc .

Determinou-se o coeficiente de partição octanol/água ($\log D_{o/w}$) para os complexos **Tc6-Tc9** e **Tc11** (tabela 4.8). Os valores obtidos indicaram que todos os complexos possuíam um carácter hidrofílico significativo. Comparando os valores encontrados com o valor de $\log D_{o/w}$ determinado para o complexo base **Tc3** ($-0,48 \pm 0,01$), que possui um grupo $-\text{COOH}$ livre (esquema 4.5), verificou-se que a introdução das diferentes sequências peptídicas acentuou o carácter hidrofílico já observado para **Tc3**. A comparação com o valor de $\log D_{o/w}$ de **Tc1** ($0,56 \pm 0,02$), que contém apenas o intercalador, mostra ainda um efeito mais acentuado das sequências peptídicas na hidrofília dos complexos finais.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Esquema 4.5



4.5.1. Ensaio Com Células Tumorais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1)

Para quantificar a internalização celular e nuclear dos complexos em estudo e para avaliar a sua selectividade para o GRPr, fomos determinar a captação celular, a internalização nuclear e o efluxo dos complexos **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** em células B16-F1 e PC-3.

Estes estudos foram também realizados para os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9** e os valores encontrados comparados com os obtidos para os complexos análogos não oxidados **Tc6** e **Tc7**, respectivamente. Sabendo que a presença da Met é fundamental para o reconhecimento dos receptores do GRP, estes resultados permitir-nos-iam confirmar a hipótese considerada de que a oxidação de **Tc6** e **Tc7** tinha ligar na Met.

Os estudos em paralelo com as linhas celulares B16-F1 e PC-3 possibilitariam avaliar a selectividade dos complexos **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** para os receptores do GRP sobreexpressos nas células PC-3 e ausentes nas células B16-F1.

Nesta secção também se fará a avaliação da radiotoxicidade dos complexos **Tc6** e **Tc7** em células humanas PC-3.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Antes de se iniciarem os estudos com células avaliou-se a estabilidade dos complexos de ^{99m}Tc nos meios de cultura dessas células. Após purificação, os complexos **Tc6-Tc9** e **Tc11** foram incubados a 37°C com os meios de cultura das células B16-F1 (DMEM) e PC-3 (RPMI). Ao longo de 3 horas retirámos alíquotas das misturas que fomos analisando por TLC (eluente: 5% HCl 6N em MeOH). Verificámos que os radiocomplexos eram estáveis em ambos os meios de cultura.

4.5.1.1. Captação Celular, Internalização Nuclear e Efluxo

Os receptores do GRP sofrem internalização quando ocorre *in vivo* ligação ao seu ligando natural endógeno. Nos ensaios de captação celular que apresentamos nesta tese pretendia-se avaliar se a unidade organometálica ligada ao análogo da BBN poderia afectar a capacidade deste para reconhecer o receptor do GRP e para formar um complexo ligando-receptor que deveria internalizar nas células PC-3. Também é conveniente que o conjugado peptídico permaneça retido nas células durante o tempo suficiente para a aquisição de uma imagem de qualidade ou de uma terapêutica efectiva. Por este motivo, foi também avaliada a cinética de efluxo dos complexos **Tc6-Tc9** e **Tc11**, após internalização. Estes estudos foram efectuados com as preparações purificadas dos compostos radioactivos.

Tendo em conta o nosso interesse na aplicação terapêutica do ^{99m}Tc , determinou-se também a internalização nuclear para os diferentes complexos em estudo.

Para os complexos **Tc6** e **Tc7**, em células PC-3, observou-se uma internalização celular de 12,6% e 17,9% do composto inicial após 4 h de incubação (Fig. 4.23). Para a internalização nuclear foram registados valores de 2% e 10,4% de complexo internalizado para **Tc6** e **Tc7** respectivamente, após 4 h de incubação (Fig. 4.24). Da análise dos valores encontrados concluímos que o complexo **Tc7** atravessava mais facilmente as membranas celular e nuclear, acumulando-se muito significativamente no núcleo das células PC-3.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

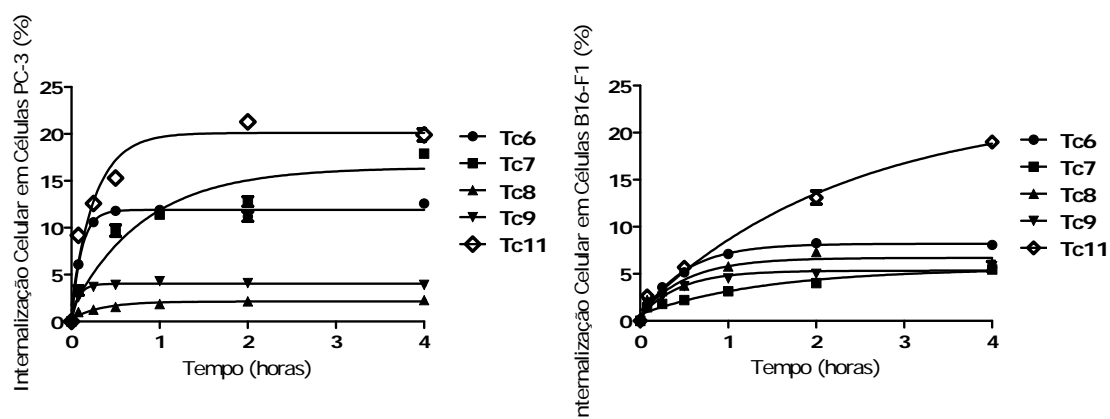


Figura 4.23: Internalização celular de **Tc6-Tc9** e **Tc11** após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 (esquerda) e B16-F1 (direita). A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

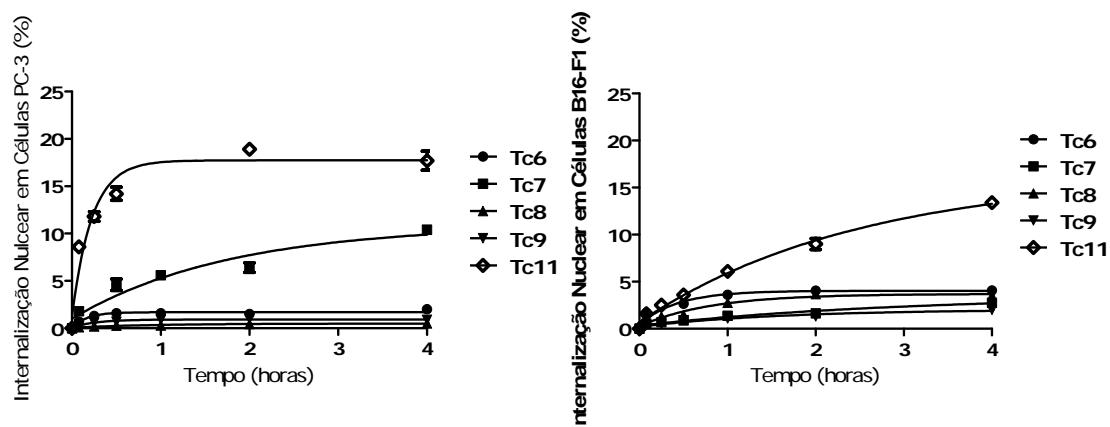


Figura 4.24: Internalização nuclear de **Tc6-Tc9** e **Tc11** após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 (esquerda) e B16-F1 (direita). A internalização nuclear é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

O estudo realizado com o complexo **Tc11** e com células PC-3 mostrou que, após 4 h de incubação 19,9% do composto inicial era internalizado (Fig. 4.23). A internalização nuclear deste complexo era também significativa pois, 4 h após incubação, 17,7% do composto inicial estava no núcleo das células (Fig. 4.24).

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Os valores de internalização celular e nuclear observados para **Tc11**, em células PC-3, são muito mais elevados do que os valores encontrados para os complexos **Tc6** ou **Tc7**. Este resultado confirma que a presença da sequência NLS na estrutura do complexo **Tc11** favorece a sua entrada no núcleo das células.

Para os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9**, nas células PC-3, observou-se uma internalização celular de apenas 2,29% e 3,9% do composto inicial, após 4 h de incubação (Fig. 4.23). Estes valores são muito inferiores aos registados para os complexos análogos não oxidados **Tc6** (12,6%) e **Tc7** (17,9%). Para os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9** observámos também valores muito baixos de internalização nuclear (**Tc8**: 0,5%; **Tc9**: 0,9%, após 4 h de incubação) (Fig. 4.24).

A baixa internalização nas células PC-3 encontrada para os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9** pode ser explicada com base na perda de actividade biológica dos análogos da BBN para interactuar com os receptores do GRP, sobreexpressos nestas células. Pensamos que este resultado confirma a nossa hipótese de que a oxidação das sequências peptídicas ocorria na Met. A cadeia lateral da Met é bastante flexível, o que permite ao grupo tioéter adaptar-se a estruturas não polares de regiões de reconhecimento existentes noutras proteínas. Esta é provavelmente a razão pela qual este aa está envolvido na formação de um centro reactivo com o GRPr.¹⁶⁹

Nos estudos que realizámos com células B16-F1 observaram-se valores de captação celular para os complexos **Tc6-Tc9** semelhantes entre si, não havendo uma diferença significativa entre os compostos oxidados e não oxidados. Verificámos que a percentagem de composto inicial internalizado após 4 h de incubação era baixa variando entre 5,46% e 8,08%. Os valores encontrados para os complexos **Tc6** e **Tc7** são muito inferiores aos registados nas células PC-3. Este resultado confirma a selectividade dos complexos **Tc6** e **Tc7** para as células PC-3, isto é para a linha celular que expressa o GRPr. Da análise dos resultados conclui-se também que a entrada dos produtos oxidados (**Tc8** e **Tc9**) é não específica não apresentando grande diferença em células PC-3 ou B16-F1.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Nos estudos de internalização nuclear, com excepção do composto **Tc7**, verificámos que a diferença entre os complexos era pouco significativa e que os valores não eram muito diferentes nas células PC-3 e B16-F1.

O complexo **Tc11**, nas células B16-F1, apresentou uma internalização celular semelhante (19%) à registada em células PC-3, após 4 h de incubação (Fig. 4.23). A internalização de **Tc11** no núcleo das células B16-F1 (13,4%) foi superior à registada para **Tc6** (8,08%) ou **Tc7** (5,46%), após 4 h de incubação (Fig. 4.24). Este resultado deverá estar relacionado com a presença do NLS, que favorece a internalização nuclear do complexo **Tc11**.

Embora a sequência NLS no complexo **Tc11** não esteja intacta, uma vez que a ligação amida entre o ligando bifuncional **L3** e a sequência **NLS-BBN** ocorreu na primeira Lys, a translocação nuclear do complexo **Tc11** não parece ter sido significativamente comprometida. Para o complexo **Tc11** foram sempre observados valores mais elevados de internalização nuclear, em ambas as linhas celulares, comparativamente com os restantes complexos.

A partir dos estudos de retenção celular dos compostos **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** em células PC-3 verificou-se que, após 1 h de internalização e 4 h de efluxo ainda havia 55% do composto inicial internalizado pelas células para **Tc11** (Fig. 4.25). Para os complexos **Tc6** e **Tc7** observaram-se valores de 21% e 23,5% de composto retido, respectivamente. Com base nestes resultados verificamos que a presença da sequência NLS contribui para a retenção do composto **Tc11** nas células.

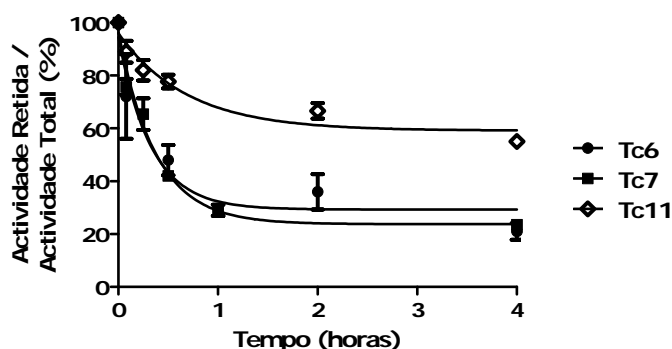


Figura 4.25: Retenção celular para **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** após 1 hora de internalização e 4 horas de efluxo a 37°C em células PC-3 (média \pm desvio padrão, n = 3).

4.5.1.2. Radiotoxicidade

Estudou-se a radiotoxicidade dos complexos **Tc6** e **Tc7** em células PC-3. Verificou-se que a viabilidade celular era elevada e que mesmo utilizando actividades elevadas dos compostos (30 μCi) 85-95% das células eram viáveis (Fig. 4.26).

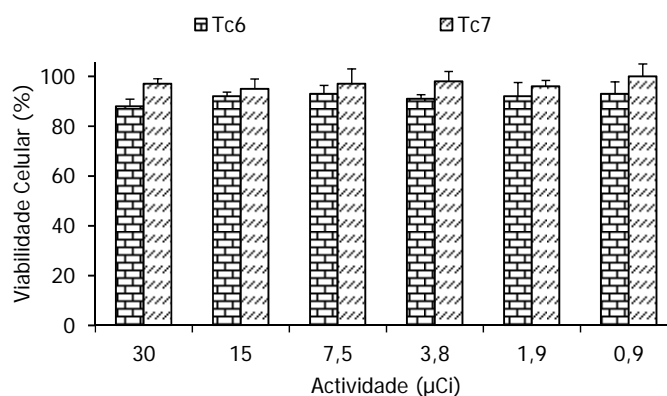


Figura 4.26: Viabilidade das células PC-3 na presença de diferentes concentrações radioactivas de **Tc6** e **Tc7** após 36 horas de incubação a 37°C (média \pm desvio padrão, n = 3).

Como se pode verificar pelos dados apresentados na figura 4.26, os complexos **Tc6** e **Tc7** não têm praticamente nenhum efeito radiotóxico sobre as células PC-3.

4.5.2. Estabilidade *in vitro* em Soro Humano e Ligação às Proteínas

Os estudos de estabilidade *in vitro* permitem prever a estabilidade dos complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ *in vivo*, face à reoxidação e à trans-quelatação dos ligandos com eventuais competidores biológicos tais como proteínas e aa. Estes estudos permitem ainda avaliar a resistência metabólica dos complexos.

De um modo geral, estuda-se a estabilidade dos complexos de tricarbonilo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ face a His e Cys e em soro humano ou de ratinho. Neste caso concreto não realizámos estudos com His e Cys. A razão pela qual não o fizemos prende-se com o facto de a estabilidade *in vitro* do complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ contendo apenas a unidade pirazolo-diamina (Fig. 4.27) já ter sido avaliada no Grupo de Ciências Radifarmacêuticas.¹⁷⁰ Esta avaliação consistiu exactamente na

4. Complexos de Rênio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

incubação de uma solução do referido complexo com excesso de Cys e His. Estes 2 aa encontram-se presentes em vários tecidos biológicos e contêm um conjunto de átomos doadores com reconhecida afinidade para a unidade $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

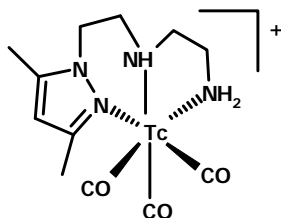


Figura 4.27: Estrutura do complexo de ^{99m}Tc com a unidade pirazolo-diamina.

Verificou-se não existir qualquer trans-quelatação com a His ou Cys, nem foi observada reoxidação a $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$, após 6 h de incubação. Estes resultados indicaram que a coordenação do ligando pirazolo-diamina à unidade $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ levava à formação de complexos com elevada estabilidade cinética.

Os complexos de ^{99m}Tc contendo análogos peptídicos, sintetizados nesta tese, são estabilizados pela mesma unidade pirazolo-diamina, pelo que assumimos que também seriam estáveis na presença de His e Cys e não realizámos estudos de estabilidade com estes dois substratos.

No entanto, estudámos a estabilidade em soro humano e a ligação às proteínas plasmáticas dos complexos **Tc6-Tc9** e **Tc11**. Para a determinação da estabilidade *in vitro* em soro humano adicionaram-se os complexos de ^{99m}Tc , purificados por HPLC, a este fluido biológico, e mantiveram-se as amostras a 37°C. Ao longo do tempo retirámos alíquotas às quais adicionámos EtOH para precipitação das proteínas. Após centrifugação, o sobrenadante foi analisado por HPLC. Nas figuras 4.28 a 4.31 apresentam-se os cromatogramas de HPLC obtidos ao longo do tempo para os diferentes complexos estudados.

Pela análise das figuras 4.28 e 4.29 verificamos que os compostos **Tc6** e **Tc7** eram instáveis em soro humano observando-se a sua oxidação, que originou os complexos análogos

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

oxidados **Tc8** e **Tc9**, respectivamente. Esta oxidação era ainda acompanhada pela formação de produtos de decomposição não identificados.

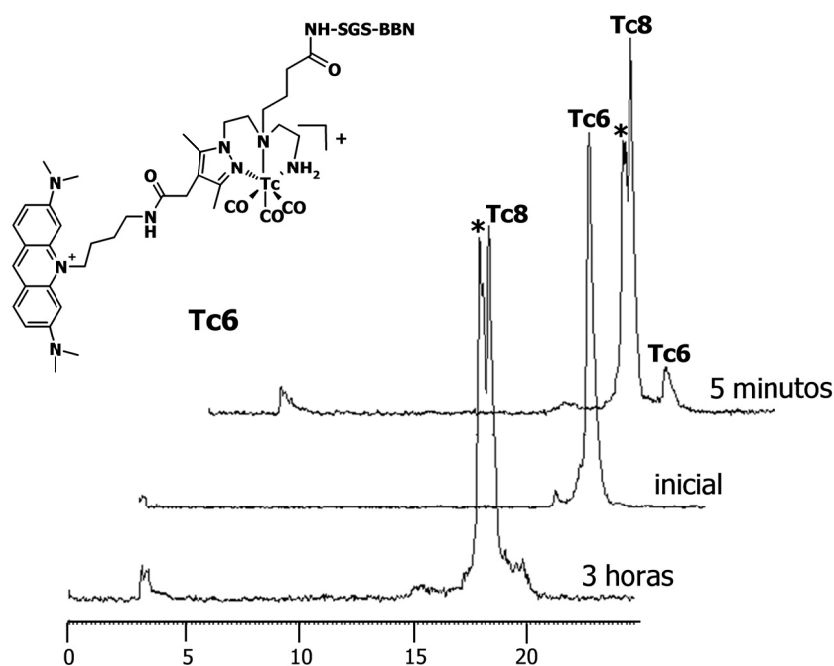


Figura 4.28: Estabilidade de **Tc6** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado)

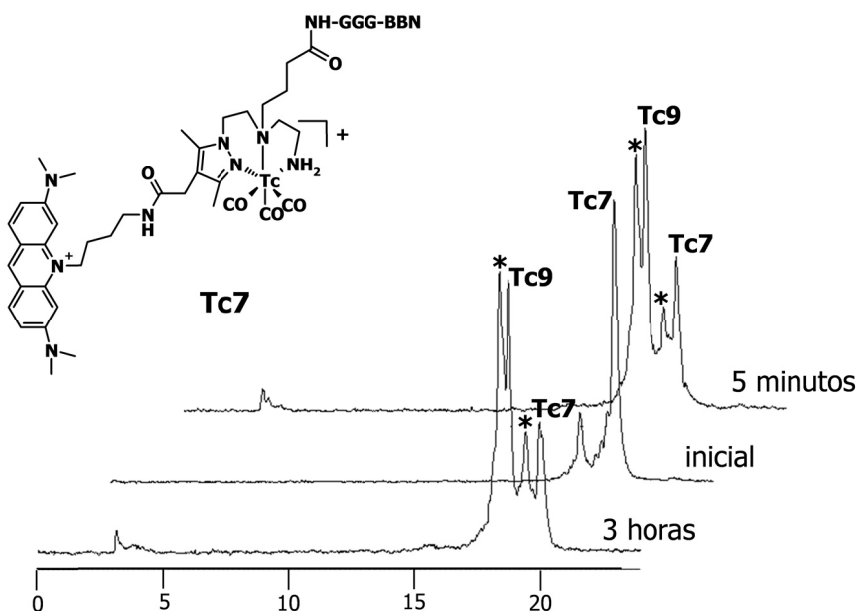


Figura 4.29: Estabilidade de **Tc7** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado)

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Para o complexo **Tc11** (Fig. 4.30) verificámos que era também instável em soro humano, devido à formação de um produto de decomposição não identificado. Contudo, esta nova espécie não se observava após 5 min de incubação, com soro humano, ao contrário do que se registou para os complexos **Tc6** e **Tc7**.

Nos cromatogramas traçados para o complexo **Tc11** também se observou um novo pico com um tempo de retenção igual a 3,22 min que aumentou de intensidade com o tempo de incubação. Este pico apresenta um tempo de retenção que é coincidente com o da espécie $[^{99m}\text{TcO}_4]$. Provavelmente, a manipulação das amostras ao longo do tempo poderá favorecer alguma decomposição do complexo **Tc11** originando $[^{99m}\text{TcO}_4]$.

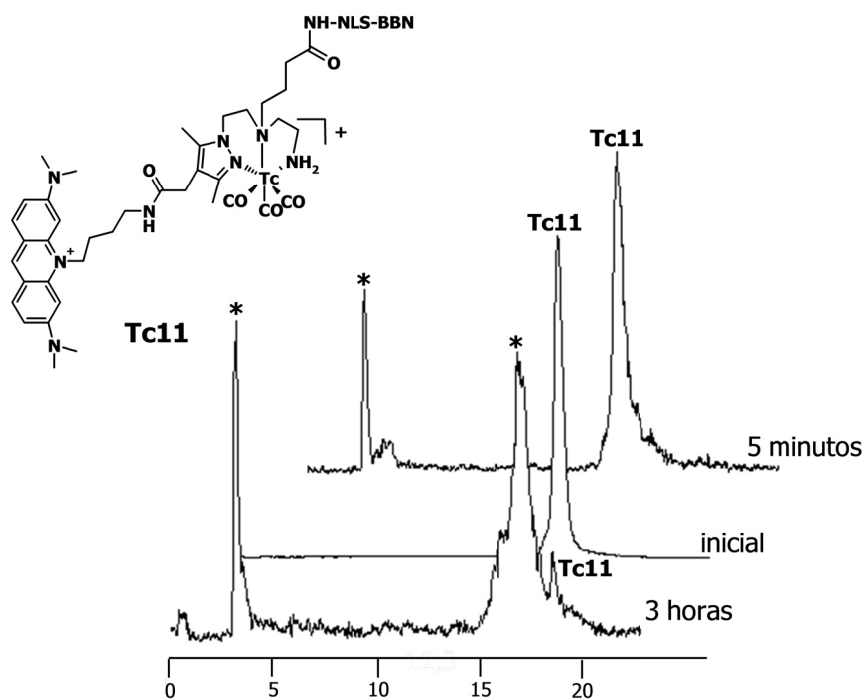


Figura 4.30: Estabilidade de **Tc11** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 5 minutos e 3 horas de incubação a 37°C. (* - produto de decomposição não identificado)

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Para os complexos oxidados na Met, **Tc8** e **Tc9**, verificou-se serem estáveis em soro humano, uma vez que ao longo do tempo a única espécie que se observava nos cromatogramas de HPLC correspondia aos complexos iniciais (Fig. 4.31). A elevada estabilidade encontrada para **Tc8** e **Tc9** contrasta com a dos respectivos complexos não oxidados **Tc6** e **Tc7**.

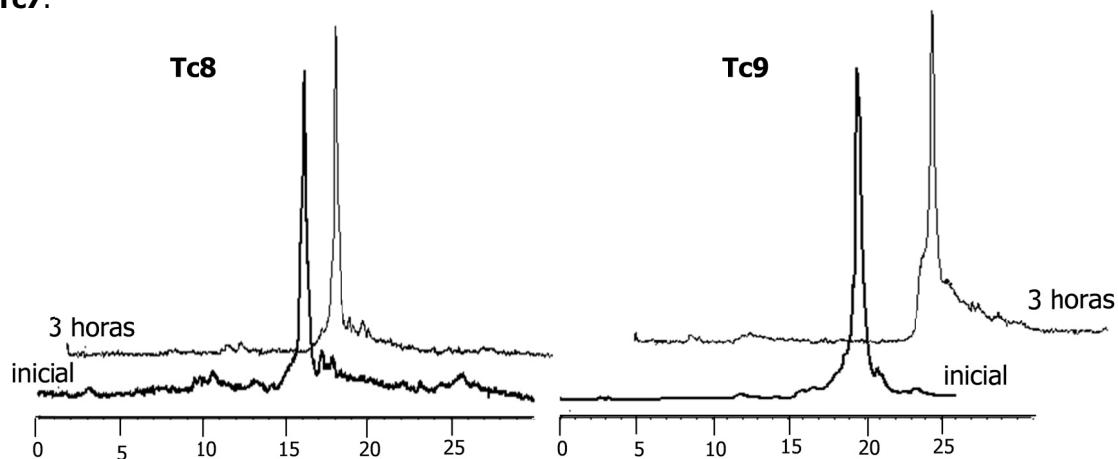


Figura 4.31: Estabilidade de **Tc8** e **Tc9** em soro humano – cromatogramas obtidos por HPLC após 3 horas de incubação a 37°C.

A percentagem de ligação às proteínas do soro humano foi determinada unicamente para os complexos **Tc8** e **Tc9**, por serem os únicos que demonstraram estabilidade muito elevada neste fluido biológico. Esta percentagem foi determinada pela razão entre a actividade presente no precipitado (fracção proteica) após precipitação com EtOH e separação do sobrenadante, e a radioactividade total da amostra. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.9.

Tabela 4.9: Ligação de **Tc8** e **Tc9** às proteínas plasmáticas.

Complexo	Ligação às proteínas plasmáticas (%)	
	5 min	1 h
Tc8	22%	19%
Tc9	15%	16%

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Como se pode verificar pelos dados da tabela 4.9, o precipitado proteico dos complexos **Tc8** e **Tc9** continha entre 15 e 22% do composto total o que sugere uma baixa ligação às proteínas plasmáticas.¹⁷¹

4.5.3. Comportamento Biológico em Ratinhos Charles River

As características dos complexos de ^{99m}Tc que interessam avaliar neste estudo são a sua estabilidade *in vivo* e a sua farmacocinética, isto é, a velocidade e vias de eliminação e fixação em órgãos que expressam naturalmente os receptores do GRP, nomeadamente o pâncreas. Estes estudos foram realizados com as preparações radioactivas purificadas por HPLC, para garantirmos que os complexos apresentavam uma elevada actividade específica.

4.5.3.1. Estabilidade *in vivo*, Distribuição e Eliminação

Após injeção intravenosa dos complexos **Tc6** e **Tc7** verificámos que estes apresentavam uma excreção lenta com cerca de 20,3% e 17,5% da actividade total injectada excretada 1 h p.i. para **Tc6** e **Tc7**, respectivamente. Não se observou uma acumulação significativa dos complexos a não ser nos órgãos relacionados com as vias de excreção, sendo esta predominantemente hepatobiliar (fígado e intestino). As baixas percentagens dos compostos observadas no estômago (**Tc6**: 1,41%; **Tc7**: 2,39%, 1 h p.i.) demonstraram a sua estabilidade *in vivo* face à reoxidação a [^{99m}TcO₄]⁻. Estes conjugados apresentavam ainda uma rápida depuração sanguínea com apenas 0,93% e 0,71% do composto em circulação 1 h p.i. para **Tc6** e **Tc7**, respectivamente. Verificou-se também uma elevada acumulação para ambos os complexos nos pulmões 1 h p.i. (**Tc6**: 18,4%; **Tc7**: 13,2%).

Em relação aos tecidos que expressam fisiologicamente o GRPr, o mais importante é o tecido pancreático. Por este motivo, a acumulação de actividade no pâncreas reflecte a capacidade de os conjugados se fixarem em células que expressam o GRPr. Os valores de

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

fixação no pâncreas determinados neste estudo são muito baixos, sendo que 1 h p.i. variavam entre 1,64% e 0,82% para **Tc6** e **Tc7**, respectivamente.

A estabilidade *in vivo* de **Tc6** e **Tc7** foi avaliada, analisando amostras de sangue e/ou urina de ratinhos CD-1 injectados com preparações destes complexos. As amostras de sangue e urina recolhidas 30 min e 1 h após administração i.v. foram analisadas por HPLC após tratamento adequado. Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 4.32 e 4.33.

Pela análise da figura 4.32 verificamos que o complexo **Tc6** apresentava alguma metabolização *in vivo* com a formação de um produto de decomposição não identificado tanto no soro de ratinho como na urina, 30 min após injeção intravenosa do complexo.

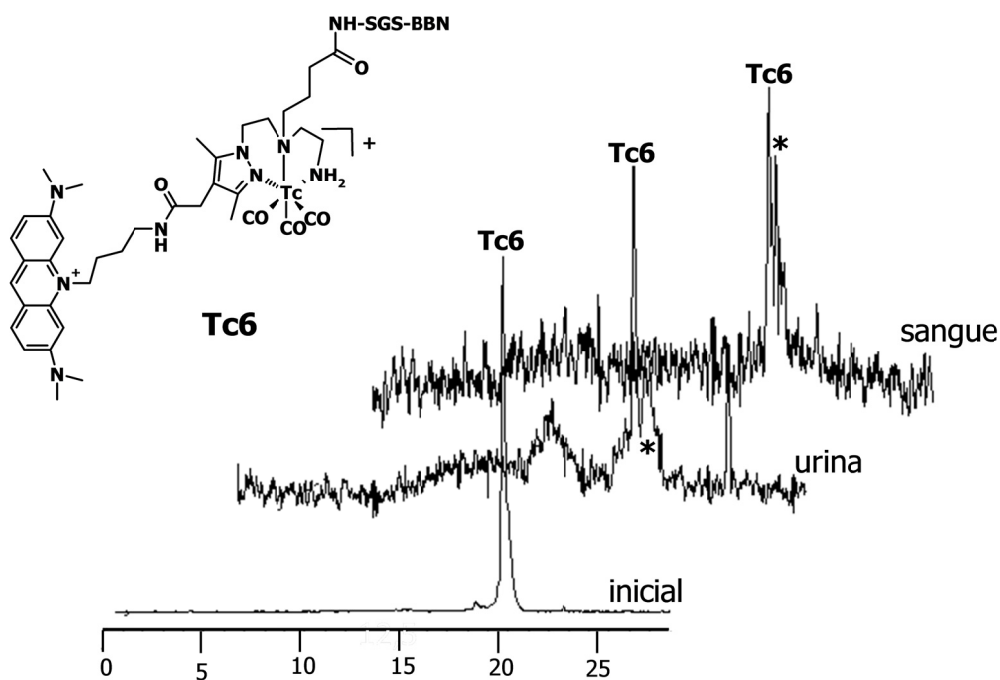


Figura 4.32: Estabilidade de **Tc6** *in vivo* – cromatogramas obtidos por HPLC, 30 minutos após administração. (* - produto de metabolização não identificado).

Para o complexo **Tc7** a estabilidade na urina 30 min e 1 h após injeção intravenosa foi determinada e os resultados encontram-se na figura 4.33. Verificou-se a oxidação do complexo **Tc7** para originar o seu análogo oxidado **Tc9**, bem como outras espécies não identificadas.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

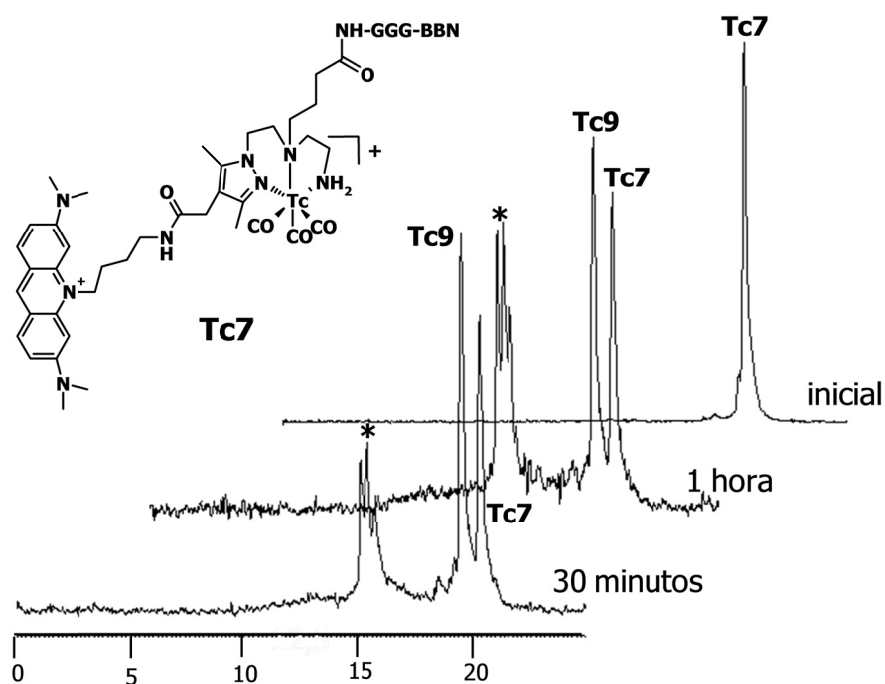


Figura 4.33: Estabilidade de **Tc7** na urina de um ratinho injectado com o complexo. A urina foi recolhida 30 minutos e 60 minutos após injeção do complexo (* - produto de decomposição não identificado).

4.6. Conclusões

Neste capítulo foram sintetizados e caracterizados os seguintes análogos da BBN:

- Ser-Gly-Ser-BBN[7-14]: **SGS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-BBN[7-14]: **GGG-BBN**
- Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **NLS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **GGG-NLS-BBN**

Todos estes análogos peptídicos continham a sequência de aa 7-14 da BBN natural (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) responsável pelo reconhecimento dos receptores do GRP sobreexpressos em células humanas PC-3 de tumor da próstata. Estas sequências foram

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

preparadas num sintetizador automático utilizando a técnica SPPS e o grupo Fmoc como protector.

As sequências peptídicas Ser-Gly-Ser (SGS) e Gly-Gly-Gly (GGG) ligadas à sequência BBN[7-14] ou a NLS-BBN[7-14] foram introduzidas como possíveis moduladoras da farmacocinética dos complexos finais de ^{99m}Tc . A sequência NLS foi introduzida em alguns análogos peptídicos para potenciar a internalização nuclear do radionuclídeo, o que poderia permitir tirar partido do potencial terapêutico do ^{99m}Tc como emissor Auger. A caracterização das diferentes sequências peptídicas foi realizada por HPLC e ESI-MS e os resultados encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Caracterização por ESI-MS e HPLC das diferentes sequências peptídicas.

Análogo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método*	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
SGS-BBN	A/C	13,78	1171,54 586,28	1171,6 [M] ⁺ 586,3 [M+H] ²⁺	C ₅₁ H ₇₇ N ₁₅ O ₁₅ S ₁
GGG-BBN	A/C	13,91	1111,52	1111,54 [M] ⁺	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₁
NLS-BBN	A/C	13,38	1806,06	1805,62 [M] ⁺	C ₈₃ H ₁₄₀ N ₂₆ O ₁₇ S ₁
GGG-NLS-BBN	A/C	11,00	989,07 659,71 495,04	989,3 [M+H] ²⁺ 659,9 [M+2H] ³⁺ 495,3 [M+3H] ⁴⁺	C ₈₉ H ₁₄₉ N ₂₉ O ₂₀ S ₁

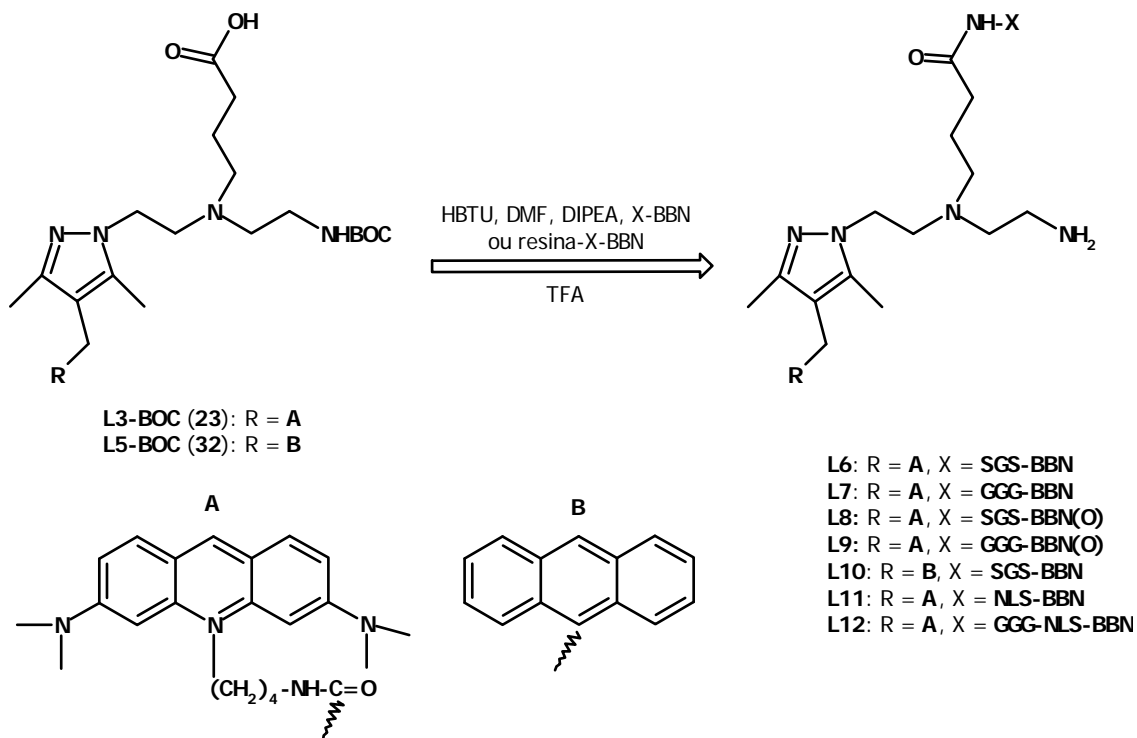
*Método de HPLC utilizado que se encontra descrito na Parte Experimental (capítulo 6).

Em seguida estas sequências peptídicas foram conjugadas aos ligandos pirazolo-diamina **L3** e **L5** protegidos com um grupo BOC na amina terminal (**L3-BOC** = **23**; **L5-BOC** = **32**). Para esta síntese foram experimentados vários procedimentos para evitar a formação de espécies secundárias oxidadas mas tal nem sempre foi possível. Como se indica no esquema 4.6, das reacções de conjugação entre os ligandos **L3-BOC** (**23**) e **L5-BOC** (**32**) e os

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

diferentes análogos da BBN resultaram os conjugados **L6-L12**, cuja caracterização foi realizada por HPLC e ESI-MS.

Esquema 4.6



Na tabela 4.4 apresentamos os resultados obtidos para os conjugados sintetizados, bem como para os produtos de oxidação de alguns deles.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Tabela 4.4: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos conjugados peptídicos L6-L12.

Conjugado	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método**	t _r (min)	Teórico	Experimental	
L6 (L3-SGS-BBN)	C	17,52	900,48 600,66	900,1 [M+H] ²⁺ 600,3 [M+2H] ³⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₇ S ₁
L7 (L3-GGG-BBN)	C	17,22	870,47 580,65	869,8 [M+H] ²⁺ 580,4 [M+2H] ³⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₅ S ₁
L8* (L3-SGS-BBN(O))	C	16,63	605,99 908,48	605,7 [M+2H] ³⁺ 908,0 [M+H] ²⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₈ S ₁
L9* (L3-GGG-BBN(O))	C	16,54	585,98 878,47	585,8 [M+2H] ³⁺ 878,1 [M+H] ²⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₆ S ₁
L10 (L5-SGS-BBN)	A	15,92	806,91	807,3 [M+2H] ²⁺	C ₇₉ H ₁₀₉ N ₁₉ O ₁₆ S ₁
L11 (L3-NLS-BBN)	A	14,70	811,83 609,12	811,5 [M+2H] ³⁺ 609,2 [M+3H] ⁴⁺	C ₁₁₉ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₁₉ S ₁
L12 (L3-GGG-NLS-BBN)	C	14,14	868,85 651,89 521,71	868,8 [M+2H] ³⁺ 651,9 [M+3H] ⁴⁺ 521,7 [M+4H] ⁵⁺	C ₁₂₅ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₂ S ₁

* Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met; ** Método de HPLC utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (capítulo 6).

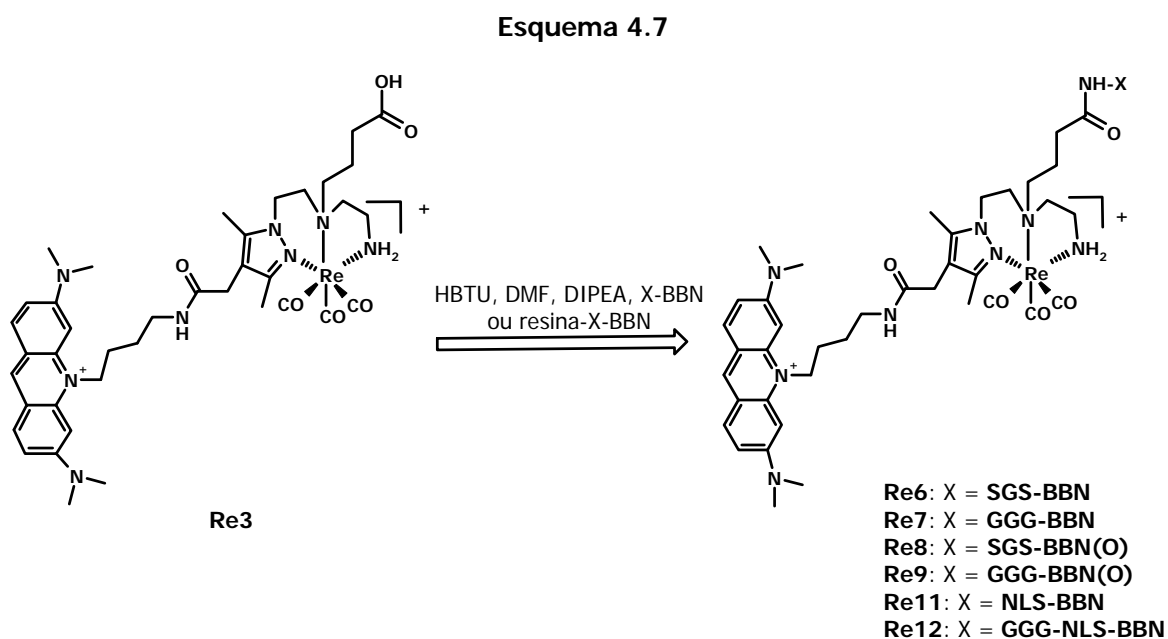
De todas as sequências estudadas **SGS-BBN** e **GGG-BBN** eram as que sofriam oxidação mais facilmente durante a reacção de conjugação a **L3-BOC (23)**. Os produtos oxidados foram isolados por HPLC e caracterizados por ESI-MS, tendo sido formulados como **L8** ou **L9**.

A conjugação das sequências **NLS-BBN** e **GGG-NLS-BBN** ao composto **L3-BOC (23)** originou os conjugados **L11** e **L12**, respectivamente. A reacção para a síntese de **L11** foi realizada em solução e as cadeias laterais das Lys e a Pro da sequência NLS encontravam-se desprotegidas. Para determinar qual destes aa estava envolvido na ligação de **NLS-BBN** a **L3-BOC**, o conjugado **L11** foi analisado por MS-MS. Desta análise concluímos que **L3-BOC** se tinha ligado a **NLS-BBN** através da primeira Lys da sequência NLS.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Para garantir a ligação do NLS à BBN através da Val e à sequência GGG através da Pro, preparámos a sequência peptídica **GGG-NLS-BBN** em fase sólida e conjugámo-la posteriormente a **L3-BOC** também em fase sólida. Nesta metodologia todos os aa possuíam as suas cadeias laterais protegidas ficando apenas o aa do N-terminal disponível para formação da ligação amida com **L3-BOC**. A análise de **L12** por MS-MS mostrou que a ligação de **L3-BOC** a **GGG-NLS-BBN** tinha ocorrido na Gly do N-terminal da sequência e que o NLS se tinha ligado à GGG pela Pro e à BBN[7-14] pela Val, tal como era esperado.

Os complexos de rénio (I), contendo análogos da BBN e unidades intercaladoras, foram obtidos por reacção do complexo **Re3**, isolado no capítulo 2, com os diferentes análogos peptídicos, tal como se indica no esquema 4.7.



Nestas reacções obtiveram-se os complexos **Re6**, **Re7**, **Re11** e **Re12** como espécies únicas e a sua caracterização fez-se por HPLC e ESI-MS (tabela 4.7). Contudo, durante o armazenamento destes compostos, **Re6** e **Re7** tinham tendência para se converterem nos seus complexos análogos oxidados: **Re8** e **Re9**. Nestas situações os diferentes compostos foram separados por HPLC e caracterizados por ESI-MS.

4. Complexos de Rênio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Tabela 4.7: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos **Re6-Re9**, **Re11** e **Re12**.

Complexo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
Re6 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L6)] ²⁺)	C	20,48	1034,94 690,30	1034,5 [M] ²⁺ 690,1 [M+H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₀ Re ₁ S ₁
Re7 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L7)] ²⁺)	C	20,63	1004,94 670,29	1004,7 [M] ²⁺ 670,3 [M+H] ³⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₈ Re ₁ S ₁
Re8* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L8)] ²⁺)	C	19,00	695,63 1042,95	695,9 [M+H] ³⁺ 1043,0 [M] ²⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₁ Re ₁ S ₁
Re9* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L9)] ²⁺)	C	20,04	675,63 1012,94	675,6 [M+H] ³⁺ 1012,6 [M] ²⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₉ Re ₁ S ₁
Re11 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L11)] ²⁺)	A	15,04	1809,94	1809,1 [2M+Na-2H] ³⁺	C ₁₂₂ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₂₂ Re ₁ S ₁
Re12 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L12)] ²⁺)	C	16,88	958,83 719,37 575,70	958,3 [M+H] ³⁺ 719,3 [M+2H] ⁴⁺ 575,7 [M+3H] ⁵⁺	C ₁₂₈ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₅ Re ₁ S ₁

* Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met; ** Método de HPLC utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (capítulo 6).

Para o complexo **Re11** a caracterização por ESI-MS apresentava um pico para o ião molecular de muito fraca intensidade. Por esta razão decidimos analisar **Re11** por MS-MS mas a análise também não foi conclusiva.

A avaliação do complexo **Re12** e da respectiva sequência peptídica **L12** ainda está a decorrer e por isso não foram descritos quaisquer estudos com estes compostos.

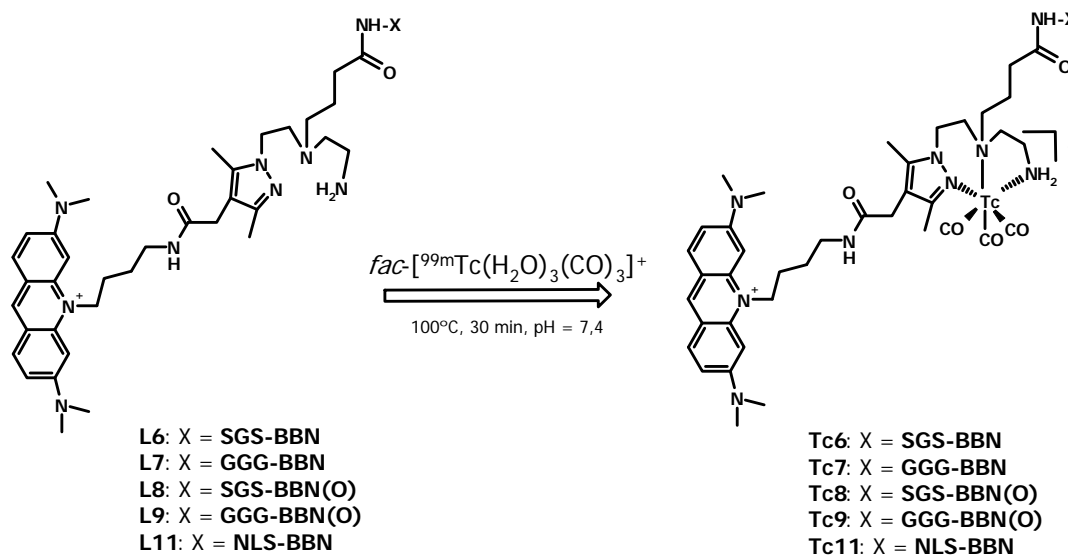
Para uma possível aplicação terapêutica dos complexos de ^{99m}Tc, fomos avaliar se o complexo final, com o vector biológico e com o intercalador, era capaz de atravessar a membrana celular e de se acumular no núcleo da célula. Esta avaliação foi feita num estudo dinâmico com células PC-3 por microscopia confocal de fluorescência para **Re6** e **Re7**. A caracterização por ESI-MS do complexo **Re11**, com a sequência **NLS-BBN**, foi ambígua e por isso este composto não foi avaliado nos ensaios de microscopia de fluorescência.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Nos estudos de fluorescência verificámos que **Re6** e **Re7** atravessavam a membrana celular e localizavam-se no núcleo das células PC-3. Embora se trate de uma análise qualitativa, o complexo **Re7** parecia atravessar a membrana celular e nuclear mais significativamente do que **Re6**.

A quantificação da captação celular observada por microscopia de fluorescência foi feita com os complexos análogos de ^{99m}Tc . Nestes estudos, para além de **Tc6** e **Tc7**, estudámos os análogos oxidados (**Tc8** e **Tc9**) e o complexo com a sequência **NLS-BBN** (**Tc11**). Estes complexos foram sintetizados por reacção do precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ com os respectivos conjugados peptídicos **L6-L9** e **L11** e foram formulados como sendo do tipo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{K}^3\text{-L})]^{2+}$ (L = **L6** (**Tc6**), **L7** (**Tc7**), **L8** (**Tc8**), **L9** (**Tc9**), **L11** (**Tc11**)) (esquema 4.4).

Esquema 4.4



Todos os complexos de ^{99m}Tc (I) mostraram ter um carácter hidrofílico, com valores de $\log D_{o/w}$ que variaram entre $(-1,91 \pm 0,05)$ e $(-0,68 \pm 0,07)$, muito provavelmente devido à presença do análogo peptídico.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Quando se pretende obter complexos específicos de ^{99m}Tc é também importante saber se a presença do vector biológico o torna selectivo para células que sobreexpressam receptores que reconhecem esse vector. Por esta razão os complexos de ^{99m}Tc foram estudados com células PC-3, que sobreexpressam os receptores do GRP, e com células B16-F1 que não expressam esses receptores.

Após 4 h de incubação com células PC-3, verificou-se que **Tc7** tinha uma internalização celular (17,9%) e nuclear (10,4%) mais elevada do que **Tc6** (12,6% e 2%, respectivamente), resultados que confirmavam os previamente obtidos por microscopia confocal de fluorescência. Tendo em conta que estes complexos só diferiam na natureza do espaçador entre **L3** e a BBN[7-14] (SGS *vs* GGG) os resultados indicavam que a sequência GGG favorecia a internalização celular e nuclear. Foi com base nesta evidência experimental que escolhemos o espaçador GGG para sintetizar **GGG-NLS-BBN**, e para avaliar o efeito do NLS na internalização nuclear.

Verificou-se que, após 4 h de incubação, a internalização celular dos complexos **Tc6** (8,08%) e **Tc7** (5,45%) era inferior nas células B16-F1. Este resultado veio demonstrar a selectividade destes complexos para as células PC-3 e a sua capacidade para reconhecer os receptores do GRP.

De todos os complexos estudados, o complexo **Tc11**, com a sequência **NLS-BBN**, foi o que apresentava maior internalização celular e nuclear, tanto em células PC-3 (19,9% e 17,7%, respectivamente) como em células B16-F1 (19% e 13,4%, respectivamente). Estes resultados devem-se certamente à presença da sequência NLS. Como se verificou por MS-MS, a integridade da sequência NLS pode estar parcialmente afectada neste análogo peptídico. Por esta razão, os valores de internalização nuclear registados podem ser inferiores aos que se obteriam se a sequência NLS estivesse completamente intacta.

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Em células PC-3 os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9** apresentaram valores de internalização celular de 2,3% e 3,9% após 4 h de incubação. Estes valores são muito inferiores aos observados para os complexos análogos não oxidados **Tc6** (12,6%) e **Tc7** (17,9%). Estes resultados confirmaram que a oxidação observada nos compostos deve ocorrer na Met, que é um aa essencial para o reconhecimento e interacção com o GRPr.

Em células B16-F1, os complexos **Tc6-Tc9** apresentaram valores de internalização celular e nuclear semelhantes entre si, não havendo uma diferença significativa no comportamento dos complexos oxidados e não oxidados. Este resultado é expectável tendo em conta que a entrada dos compostos nas células B16-F1 ocorre por processos não específicos, dependentes unicamente da lipofilia dos compostos.

Estudos de radiotoxicidade dos complexos **Tc6** e **Tc7** com células PC-3 mostraram uma elevada viabilidade celular (85-95%) mesmo para concentrações radioactivas elevadas (30 μ Ci).

Estudos *in vitro* com os complexos **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** mostraram que estes possuíam baixa estabilidade em soro humano com tendência para a formação de produtos de decomposição não identificados ou para a conversão nos respectivos análogos oxidados (**Tc8** e **Tc9**). Os complexos **Tc8** e **Tc9** também foram avaliados. A contrastar com os resultados obtidos para **Tc6** e **Tc7**, os complexos **Tc8** e **Tc9** apresentaram uma elevada estabilidade em soro humano com uma baixa ligação às proteínas plasmáticas (~20%).

Estudos preliminares *in vivo* foram realizados para os complexos **Tc6** e **Tc7** utilizando ratinhos normais. Estes compostos possuíam uma rápida depuração sanguínea, uma excreção essencialmente hepatobiliar com elevada acumulação de actividade no fígado e intestinos. A acumulação de composto no pâncreas, órgão que expressa naturalmente o GRPr, era baixa.

Neste momento continuam a decorrer estudos para avaliação da captação celular do complexo de ^{99m}Tc com a sequência peptídica **GGG-NLS-BBN** assim como a sua estabilidade *in vitro* e *in vivo* e o comportamento biológico. No seguimento deste trabalho também continuam

4. Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

a decorrer estudos para a síntese de novos compostos específicos contendo um intercalador derivado do antraceno e análogos da BBN.

5. Conclusões e Perspectivas

5. Conclusões e Perspectivas

O ^{99m}Tc é o isótopo com maior aplicação em medicina nuclear sendo utilizado em cerca de 85% dos exames de diagnóstico (SPECT), devido às suas propriedades nucleares ($t_{1/2} = 6,0$ h, $\gamma = 140$ keV), elevada disponibilidade, baixo custo e química diversificada. Para além do seu reconhecido potencial em exames de diagnóstico, o ^{99m}Tc também tem sido visto como um radionuclídeo com potencial para aplicação em terapia devido à emissão de 4 e^- Auger por decaimento.^{7,18,19}

O principal objectivo do trabalho apresentado nesta tese era contribuir para aumentar o conhecimento sobre o potencial terapêutico do radionuclídeo ^{99m}Tc enquanto emissor de e^- Auger. Com esse objectivo pretendíamos preparar e avaliar biologicamente complexos de ^{99m}Tc que continham o fragmento metálico $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ estabilizado por ligandos tridentados do tipo pirazolo-diamina funcionalizados com uma unidade intercaladora, com afinidade para o ADN, e um vector biológico com afinidade para receptores específicos sobreexpressos em células tumorais.

Para aproveitar o efeito terapêutico do ^{99m}Tc os seus complexos deverão acumular-se no núcleo das células tumorais. Esta acumulação pode ser fomentada utilizando estruturas intercaladoras, com reconhecida afinidade para o ADN, e/ou sequências peptídicas NLS com reconhecida afinidade para translocar substâncias para o núcleo das células.^{8,12,15,31-35} Por esta razão também isolámos compostos que para além do intercalador continham uma sequência peptídica NLS.

A síntese do precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ abriu novos caminhos na química radiofarmacêutica.^{41,42} Neste composto os ligandos aquo podem ser prontamente substituídos por ligandos mono, bi ou tridentados que podem permitir fazer a ligação do centro metálico a diversas biomoléculas.⁴¹ No estado de oxidação +1 a configuração electrónica d^6 de baixo spin do ião metálico resulta em complexos cineticamente inertes.¹ Verificou-se ainda que complexos estabilizados por ligandos bidentados eram mais facilmente retidos no fígado e nos rins do que complexos estabilizados com ligandos tridentados que mostraram ser mais estáveis *in vivo*.¹

5. Conclusões e Perspectivas

O Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas tem vindo a estudar complexos com a unidade $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$ estabilizada por ligandos tridentados do tipo pirazolo-diamina.^{34,36,48-50,170,175} Estes complexos eram muito estáveis *in vitro* e *in vivo*.^{170,175} Para além disso, os ligandos pirazolo-diamina mostraram ser versáteis na medida em que podiam ser funcionalizados em várias posições por forma a permitir a ligação a unidades intercaladoras ou a moléculas biologicamente activas.^{34,36,49,50} Neste trabalho utilizámos este tipo de ligandos que foram funcionalizados na posição 4 do anel de pirazolo com unidades intercaladoras e na amina central com diferentes sequências peptídicas.

As unidades intercaladoras utilizadas neste trabalho foram derivadas da acridina e do antraceno. Estes intercaladores possuem estruturas aromáticas planares e são conhecidos pelas suas características de emissão de fluorescência e pela reconhecida afinidade para interactuar com o ADN por intercalação entre os pares de bases da macromolécula.^{57,68}

O vector biológico explorado foi o péptido bombesina (BBN), que consiste numa sequência peptídica de 14 aa com a seguinte constituição:



Análogos deste vector, que mantinham a sequência de aa [7-14] da BBN natural, foram conjugados à amina central de ligandos pirazolo-diamina contendo uma unidade intercaladora.

O desenvolvimento de radiofármacos direccionados para os receptores da BBN tem como base a sobreexpressão destes receptores em vários tipos de tumores, nomeadamente: próstata, pâncreas, mama, tracto gastrointestinal, pulmão (carcinoma de pequena célula) e em carcinomas colorectais.¹¹⁵

Começámos então por sintetizar os ligandos tridentados contendo a unidade pirazolo-diamina e uma unidade intercaladora na posição 4 do anel de pirazolo. Para atingir este

objectivo preparámos as duas unidades intercaladoras, **18** e **19**, derivadas do alaranjado de acridina (AO, **18**) e do 9-acridina ácido carboxílico (9-ACA, **19**) (Fig. 5.1).

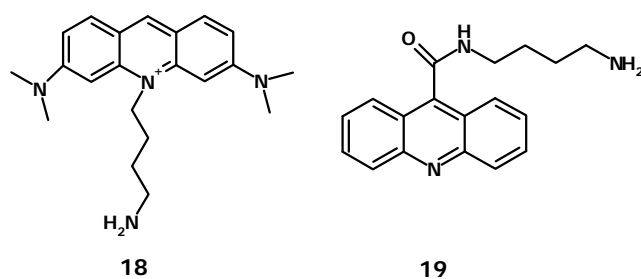


Figura 5.1: Unidades intercaladoras: **18** e **19**.

Estas unidades intercaladoras foram modificadas por forma a possuírem um grupo amina que deveria reagir com um grupo carboxilato existente na posição 4 do anel de pirazolo da unidade pirazolo-diamina **8**, como se exemplifica na figura 5.2. Após reacção de **18** e **19** com **8** obtivemos os compostos **L1** (AO) e **L2** (9-ACA) (Fig. 5.2).

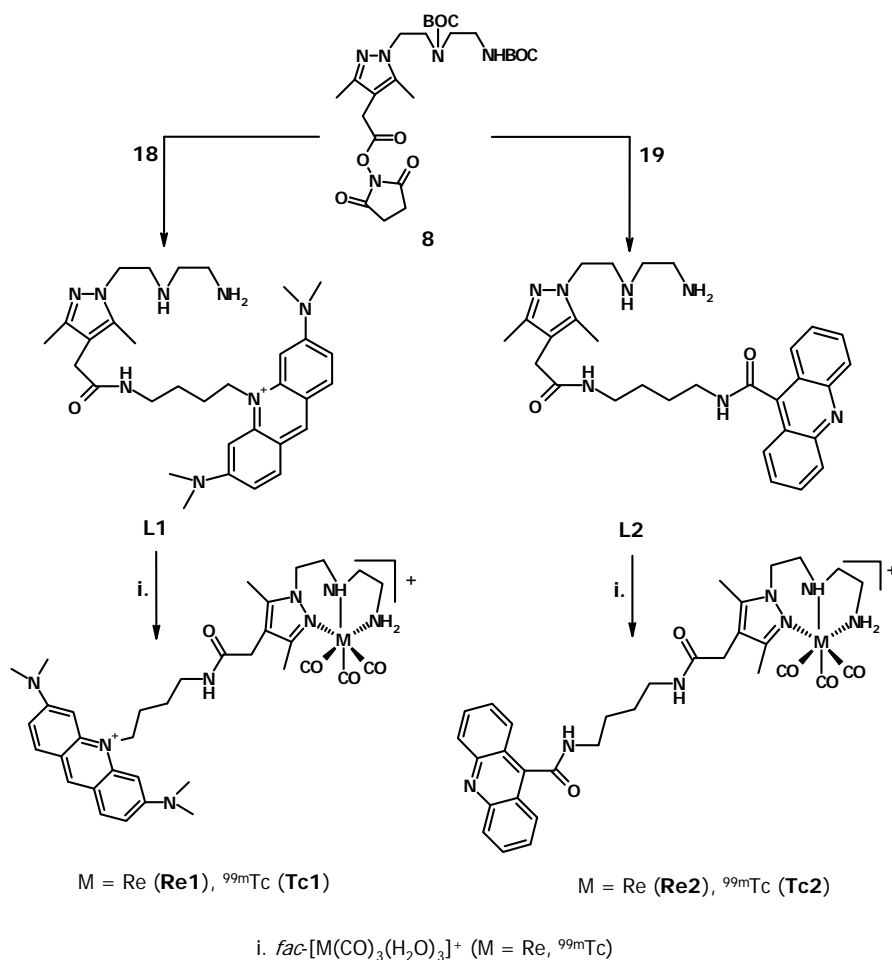


Figura 5.2: Síntese dos ligandos **L1** e **L2** e dos complexos **Re1/Tc1** e **Re2/Tc2**.

5. Conclusões e Perspectivas

Avaliámos a capacidade dos compostos **L1** e **L2** para substituírem as três moléculas de água, existentes no precursor $fac-[M(CO)_3(H_2O)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$). Nestas reacções verificou-se que os ligandos **L1** e **L2** coordenavam ao centro metálico de um modo tridentado conduzindo aos complexos **Re1/Tc1** e **Re2/Tc2** (Fig. 5.2). Os complexos de ${}^{99m}Tc$ foram caracterizados por comparação do seu perfil cromatográfico, obtido por HPLC, com o dos complexos análogos de rénio (I).

De seguida fomos avaliar se as unidades intercaladoras presentes em **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** mantinham a afinidade para o ADN, após ligação à unidade pirazolo-diamina e ao fragmento metálico $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$). Para tal estudou-se a interacção com o ADN de **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2** utilizando diversas técnicas espectroscópicas, nomeadamente UV-Visível, fluorescência, CD e LD. Nestes estudos verificámos que a unidade intercaladora **18** (comum a **L1** e **Re1**) apresentava afinidade para o ADN e que os compostos se comportavam como intercaladores perfeitos. Por outro lado, a unidade intercaladora **19** (comum a **L2** e **Re2**) demonstrou uma baixa afinidade para o ADN. Provavelmente, a presença da função amida na posição 9 das unidades aromáticas de **L2** e **Re2** poderá impossibilitar a intercalação dos compostos entre os pares de base do ADN, possivelmente por razões de natureza estereoquímica.⁸⁰ A baixa interacção com o ADN encontrada para os compostos **L2** e **Re2** não permitiu determinar as constantes de ligação destes compostos ao ADN.

Para **L1** e **Re1** foram determinadas as constantes de ligação ao ADN (K) por ajuste dos dados obtidos nas titulações de UV-Visível e fluorescência a modelos matemáticos de Scatchard, Kaminoh e McGhee von Hippel. Utilizando os dados obtidos no CD também se calcularam valores de K por ajuste dos dados experimentais ao programa PSEQUAD. Para **L1** os valores de K encontrados situavam-se entre $(1,53 \pm 0,01) \times 10^5 M^{-1}$ – $(2,04 \pm 0,11) \times 10^5 M^{-1}$. Concretamente, pelo modelo de McGhee von Hippel, a partir do qual também se determina a distância, em pares de base, entre duas moléculas intercaladas (n), encontraram-se valores de $K = (1,93 \pm 0,22) \times 10^5 M^{-1}$ e $n = 2,7$. Estes valores são comparáveis aos descritos na literatura para o AO.^{74,85,86} Para **Re1** os valores de K encontrados situavam-se entre $(1,17 \pm 0,68) \times 10^5 M^{-1}$ – $(2,50 \pm 0,01) \times 10^5 M^{-1}$. Pelo modelo de McGhee von Hippel encontraram-se valores de K

= $(1,17 \pm 0,68) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $n = 17,8$. O valor de n encontrado é bastante elevado levando-nos a considerar que, para além do comportamento de **Re1** como intercalador, ele pode ainda estabelecer interacções electrostáticas com os grupos fosfato do ADN. Pensamos que esta interacção adicional pode ser devida à carga global de **Re1** (+2) e à possível protonação das aminas alifáticas deste complexo ao valor do pH de trabalho (pH = 7,4).

Como já referido, os ligandos **L1** e **L2** reagiram com o precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ originando os complexos **Tc1** e **Tc2**, respectivamente (Fig. 5.2). Estes complexos foram obtidos com elevado rendimento e actividade específica. Para estes complexos obtiveram-se valores de $\log D_{o/w}$ de $0,56 \pm 0,02$ (**Tc1**) e $0,74 \pm 0,01$ (**Tc2**) o que mostra que estes compostos tinham um carácter lipofílico.

Tendo em conta a elevada interacção/afinidade dos compostos **L1** e **Re1** para o ADN, estudou-se a interacção do complexo **Tc1** com ADN plasmídico puc19, por electroforese em gel de agarose. Neste ensaio verificámos que o complexo **Tc1** induzia quebras simples no ADN convertendo a forma superenrolada (FSE) em forma circular (FC), sendo esta conversão da ordem dos 30%. Neste estudo **Re1** e $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ foram também avaliados para excluir efeitos de massa e avaliar o efeito da ausência do intercalador. Para estes compostos a conversão da forma superenrolada (FSE) do ADN em forma circular (FC) foi bastante mais baixa, podendo este efeito ser devido à agitação ocasional das amostras (**Re1**: 15%; $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$: ~6%).

Ensaio de cito- e radiotoxicidade com os compostos **L1**, **L2**, **Re1**, **Re2**, **Tc1** e **Tc2** e células B16-F1 e/ou PC-3 mostraram que estes compostos não tinham um efeito significativo na viabilidade celular.

Tirando partido das propriedades fluorescentes das unidades intercaladoras presentes em **L1**, **L2**, **Re1** e **Re2**, foi possível seguir, *in vitro* e em tempo real, a localização celular dos diferentes compostos por microscopia de fluorescência. Nestes estudos de captação celular verificámos que todos os compostos se localizavam no interior das células (B16-F1 e/ou PC-3)

5. Conclusões e Perspectivas

com acumulação preferencial nos nucléolos. De um modo qualitativo, parecia que **L1** e **Re1** internalizavam no núcleo das células de um modo mais significativo do que **L2** ou **Re2**.

A captação celular foi quantificada utilizando os complexos análogos de ^{99m}Tc (**Tc1** e **Tc2**). Verificou-se uma baixa internalização celular (1,1%) e nuclear (0,19%) para **Tc2** em células B16-F1, de acordo com o que foi observado por microscopia de fluorescência. Este resultado e a fraca afinidade de **Re2** para o ADN, encontrada nos estudos espectroscópicos, levaram-nos a excluir **L2** e **Re2** para ligação posterior a vectores biológicos específicos.

O complexo **Tc1** mostrou uma significativa internalização nuclear nas células B16-F1 (23%) e PC-3 (14,8%), após 4 h de incubação. Este resultado concordava com os obtidos por microscopia de fluorescência e levaram-nos a escolher **L1** para posterior ligação a um vector biológico. Para concretizar este objectivo, era necessária a presença de um grupo carboxilato em **L1** que permitisse a ligação à função amina de um péptido biologicamente activo. Este grupo carboxilato foi introduzido na amina central da unidade pirazolo-diamina de **L1** originando a estrutura trifuncional **L3** (Fig. 5.3).

Da reacção de **L3** com o precursor $fac\text{-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ obteve-se o complexo **Re3** que se apresenta na figura 5.3. Após análise por RMN verificou-se que a presença do braço butírico na amina central da unidade pirazolo-diamina não afectava a coordenação ao centro metálico da estrutura base pirazolo-diamina.

A captação celular dos compostos **L3** e **Re3** foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência com células B16-F1. Verificou-se que ambos os compostos internalizavam nas células acumulando-se no núcleo das mesmas. Contudo, esta internalização era inferior à observada para **L1** e **Re1**. Tendo em conta que a entrada nas células B16-F1 dos compostos, descritos até ao momento, ocorre por processos não específicos, a menor internalização encontrada para **L3** e **Re3** deve-se provavelmente à presença do grupo carboxilato livre. Este grupo confere um carácter mais hidrofílico a **L3** e **Re3** e por isso a sua internalização é mais baixa.

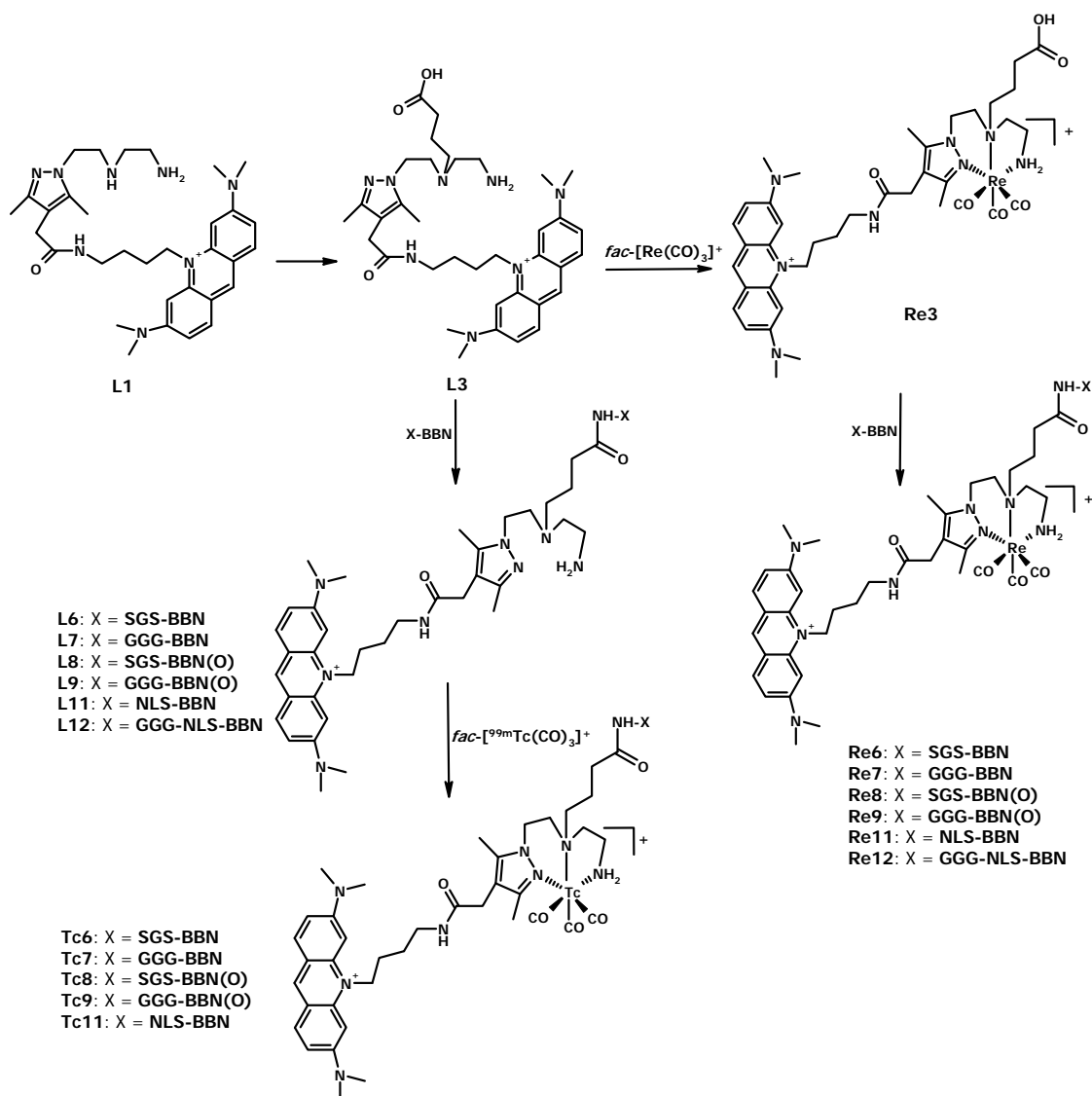


Figura 5.3: Ligação de análogos peptídicos a ligandos pirazolo-diamina contendo um intercalador e síntese dos respectivos complexos de rênio (I) e ^{99m}Tc (I).

Sintetizámos análogos da BBN que continham a sequência de aa 7-14 da BBN natural (Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂). Esta escolha baseou-se em dados da literatura que mostraram que a BBN[7-14] é a responsável pelo reconhecimento e interação com os receptores do GRP.¹⁰² Nestes análogos introduzimos cadeias espaçadoras peptídicas que permitiriam fazer a ligação entre o péptido e o ligando pirazolo-diamina e possivelmente modular a farmacocinética dos complexos radioactivos finais. Também incluímos uma sequência

5. Conclusões e Perspectivas

NLS nalgumas destas cadeias peptídicas, pretendendo desta forma aumentar a entrada do radionuclídeo no núcleo das células e potenciar o efeito terapêutico dos e^- Auger emitidos.

As sequências peptídicas sintetizadas foram as seguintes:

- Ser-Gly-Ser-BBN[7-14]: **SGS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-BBN[7-14]: **GGG-BBN**
- Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **NLS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **GGG-NLS-BBN**

Todas as sequências peptídicas foram preparadas num sintetizador automático utilizando a química de protecção Fmoc e a técnica SPPS.¹⁶⁸ A caracterização dos diferentes análogos peptídicos foi realizada por HPLC e ESI-MS.

Após várias tentativas, o composto **L3** foi ligado com sucesso aos análogos da BBN **SGS-BBN** e **GGG-BBN** resultando nos conjugados peptídicos **L6** e **L7** (Fig. 5.3) que foram caracterizados por ESI-MS e HPLC. No entanto, durante estas reacções de conjugação foram sempre obtidos, isolados e caracterizados os respectivos análogos oxidados **L8** e **L9**, respectivamente. Tendo em conta dados da literatura, considerámos que estas espécies deveriam corresponder aos conjugados **L6** e **L7** oxidados na Met, por ser o aa que apresenta mais facilidade em se oxidar nos sistemas biológicos.¹⁶⁹

A reacção de **L3** com a sequência **NLS-BBN** foi realizada em solução originando o conjugado **L11** como espécie única. Nesta reacção as cadeias laterais das Lys e a Pro na sequência **NLS-BBN** encontravam-se desprotegidas, constituindo locais possíveis de ligação a **L3**. Devido a este facto a conjugação de **L3** poderia ter ocorrido em diferentes posições da sequência NLS. Para determinar qual dos aa estava envolvido na ligação a **L3**, o conjugado **L11** foi analisado por MS-MS. Desta análise concluímos que **L3** se tinha ligado à cadeia lateral da primeira Lys da sequência **NLS-BBN**.

Para melhor controlar o local de conjugação fez-se reagir **L3** com a sequência **GGG-NLS-BBN** em fase sólida originando o conjugado **L12** como espécie única. Nesta reacção

todos os aa da cadeia peptídica possuíam as cadeias laterais protegidas com diferentes grupos para garantir que só a Gly do N-terminal ficaria disponível para formar uma ligação amida com **L3**. A análise por ESI-MS e MS-MS confirmou que em **L12** a ligação de **L3** à sequência **GGG-NLS-BBN** tinha efectivamente ocorrido na Gly do N-terminal e que o NLS se tinha ligado à sequência GGG pela Pro e à BBN[7-14] pela Val, tal como desejado.

Para a síntese dos complexos de rênio (I), contendo as unidades intercaladoras e os análogos peptídicos, foi necessário preparar o complexo **Re3** (Fig. 5.3), que possui um grupo carboxilato livre na amina central necessário para fazer a ligação ao grupo amina do N-terminal das sequências peptídicas. Da reacção de **Re3** com os diferentes análogos peptídicos obtiveram-se complexos do tipo $fac-[Re(CO)_3(\kappa^3-L)]^{2+}$ (L = **L6 (Re6)**, **L7 (Re7)**, **L11 (Re11)**, **L12 (Re12)**). As reacções para obtenção de **Re6**, **Re7** e **Re11** foram realizadas em solução enquanto **Re12** foi obtido por reacção em fase sólida. A caracterização destes compostos foi realizada por HPLC e ESI-MS.

Verificou-se que durante o armazenamento de **Re6** e **Re7** estes sofriam oxidação parcial na Met convertendo-se nos seus análogos oxidados **Re8** e **Re9**, respectivamente. Os compostos oxidados foram separados dos não oxidados por HPLC e caracterizados por ESI-MS.

Tendo em conta que no espectro de ESI-MS de **Re11** o pico correspondente ao ião molecular era pouco intenso (ver figura 4.19), o composto foi analisado por MS-MS. Esta análise revelou-se inconclusiva não tendo sido possível inferir qual a verdadeira estrutura de **Re11**.

Por possuírem as estruturas desejadas e por estas serem bem definidas, a captação celular de **Re6** e **Re7** foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando células PC-3. Tirando partido das características de emissão da unidade intercaladora presente nestes compostos, verificou-se que eles internalizavam nas células acumulando-se nos nucléolos. Embora se tratasse de uma análise qualitativa, o complexo **Re7** parecia internalizar mais significativamente do que **Re6**.

A captação celular observada para os complexos **Re6** e **Re7**, por microscopia de fluorescência, foi quantificada recorrendo aos complexos análogos de ^{99m}Tc . Nestes estudos foram também avaliados os complexos de ^{99m}Tc oxidados e o que continha a sequência peptídica **NLS-BBN**. A síntese dos complexos de ^{99m}Tc foi feita por reacção dos conjugados peptídicos **L6-L9** e **L11** com o precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ de que resultaram complexos do tipo $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{K}^3\text{-L})]^{2+}$ (L = **L6 (Tc6)**, **L7 (Tc7)**, **L8 (Tc8)**, **L9 (Tc9)**, **L11 (Tc11)**). Todos os complexos caracterizados por HPLC, demonstraram um carácter hidrofílico significativo, com valores de $\log D_{o/w}$ entre $(-1,91 \pm 0,05)$ e $(-0,68 \pm 0,07)$.

A captação celular dos complexos de ^{99m}Tc foi determinada em células B16-F1 e PC-3. Ao contrário das células B16-F1, as células PC-3 possuem receptores que são reconhecidos pela BBN. Pretendíamos desta forma avaliar a selectividade dos compostos para as células que expressam o GRPr e verificar qual a influência do NLS e da oxidação da Met observada nos conjugados peptídicos **L8** e **L9**.

Tc6 e **Tc7** mostraram ser selectivos para as células PC-3 pois apresentavam valores de internalização celular elevados (12,6% e 17,9%) e superiores aos encontrados nos estudos com células B16-F1 (8,08% e 5,46%) (Fig. 5.4). Destes dois complexos, **Tc7**, que contém o espaçador GGG, revelou uma internalização nuclear selectiva e mais elevada em células PC-3 (10,4%) do que **Tc6** (2%). Por esta razão, a sequência espaçadora GGG foi escolhida para ligar ao NLS e para preparar **GGG-NLS-BBN**.

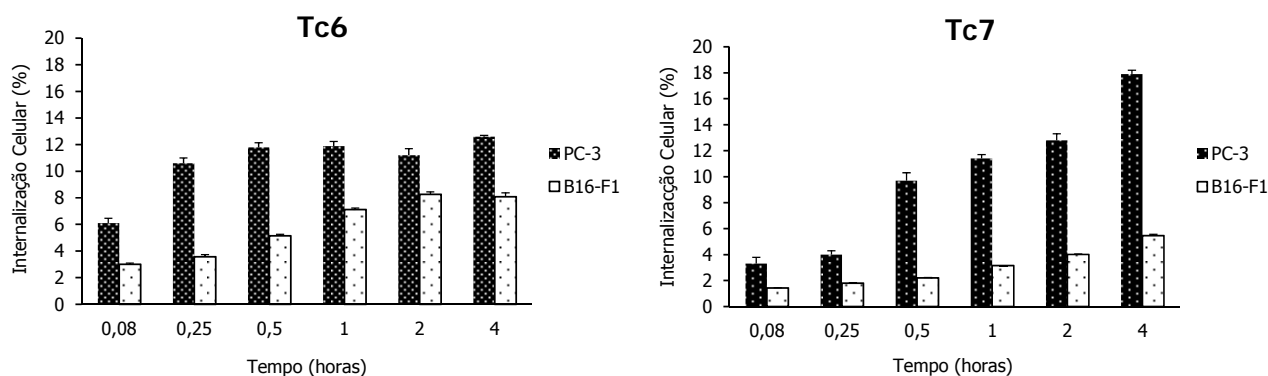


Figura 5.4: Internalização celular de **Tc6** (esquerda) e **Tc7** (direita), após 4 horas de incubação a 37°C com células PC-3 e B16-F1. A internalização celular é expressa em percentagem do composto total adicionado às células (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

Após o mesmo tempo de incubação (4 h) **Tc11** internalizou muito mais no núcleo das células PC-3 (17,7%) e B16-F1 (13,4%) do que **Tc6** ou **Tc7**, demonstrando claramente o efeito da sequência NLS.

Os complexos oxidados **Tc8** e **Tc9** apresentaram valores de internalização celular muito baixos (2,29% e 3,9%) em células PC-3, confirmando a hipótese inicialmente avançada de que a oxidação deveria ter ocorrido na Met. Este aa faz parte da sequência peptídica que reconhece os receptores do GRPr sobreexpressos nas células PC-3, sendo evidente que a sua oxidação levou à perda de afinidade do vector biológico para os receptores.

Para uma melhor visualização do comportamento dos complexos **Tc6**, **Tc7** e **Tc11** nos estudos realizados com células PC-3, mostra-se na figura 5.4 a distribuição celular comparativa destes compostos.

5. Conclusões e Perspectivas

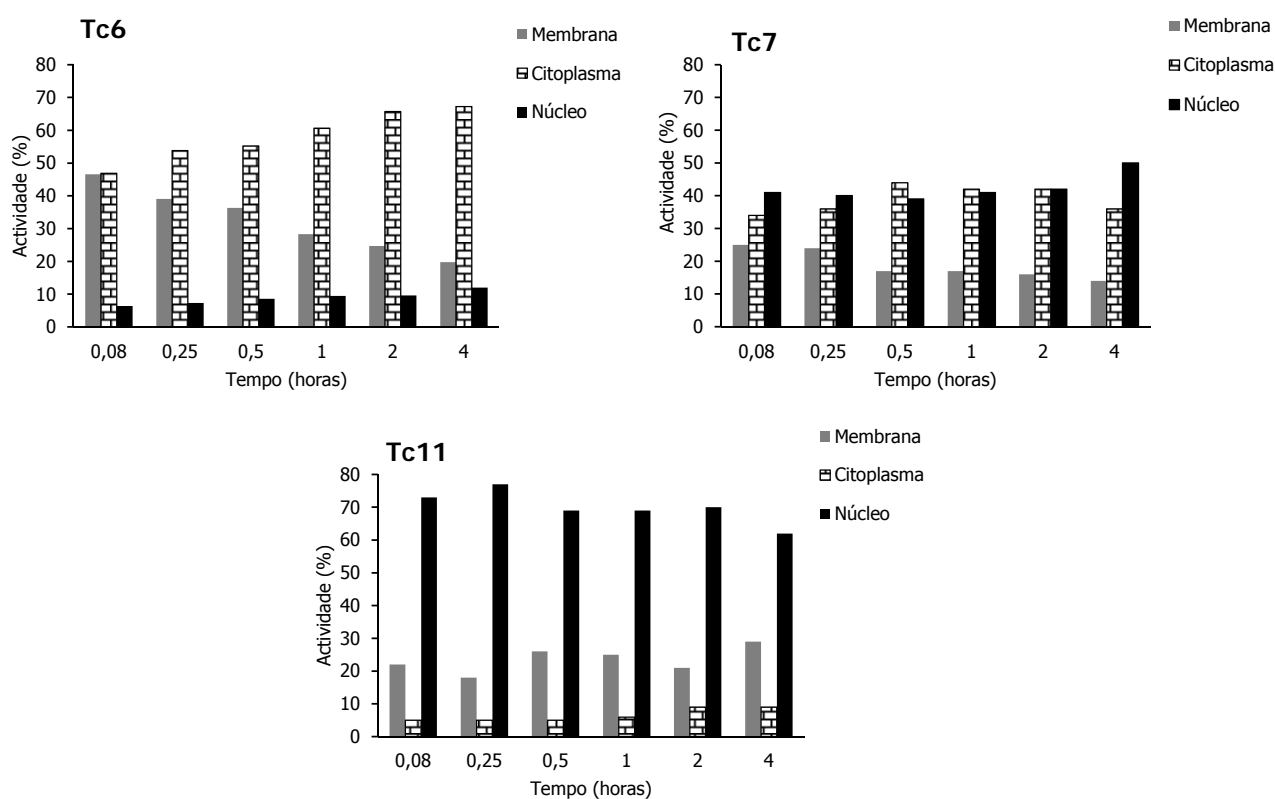


Figura 5.5: Distribuição celular de Tc6, Tc7 e Tc11 em células PC-3 a 37°C.

Da análise da figura 5.4, é evidente que a fracção de Tc11 que se encontra no núcleo das células é bastante elevada (~70%), mantendo-se praticamente constante ao longo do tempo. Para Tc7 ~45% do composto é translocado para o núcleo das células, enquanto que para Tc6 só ~10% do composto está no núcleo.

Tendo em conta os resultados de especificidade e de internalização celular obtidos para Tc6 e Tc7, a radiotoxicidade destes complexos foi avaliada em células PC-3. Verificou-se que estes compostos não têm qualquer efeito na viabilidade celular, mesmo quando são utilizadas actividades elevadas dos complexos (30 μ Ci).

A estabilidade de Tc6-Tc9 e Tc11 em soro humano e a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas foram determinadas. Tc6 e Tc7 mostraram uma certa facilidade para se

oxidarem neste fluido biológico e se converterem em **Tc8** e **Tc9**. Por outro lado, **Tc8** e **Tc9** revelaram uma elevada estabilidade em soro e uma baixa ligação às proteínas plasmáticas (~20%). **Tc11** apresentou também uma certa instabilidade em soro humano, embora a sua decomposição fosse mais lenta do que a dos complexos **Tc6** ou **Tc7**.

Estudos preliminares *in vivo* realizados para **Tc6** e **Tc7** mostraram que estes complexos eram eliminados por via hepatobiliar, e que não se fixavam em nenhum órgão ou tecido em particular, com excepção dos órgãos envolvidos na excreção (fígado e intestinos).

A estrutura pirazolo-diamina, contendo uma unidade intercaladora derivada do antraceno, já havia sido explorada no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.³⁴ O respectivo complexo de rênio (I) demonstrou alguma afinidade para o ADN e o complexo de ^{99m}Tc (I) demonstrou um elevado potencial para provocar a morte de células tumorais B16-F1 por acção dos e⁻ Auger emitidos pelo ^{99m}Tc.^{33,34} Por forma a introduzir selectividade nestes compostos sintetizámos o ligando trifuncional **L5**, que possui um grupo carboxilato livre para ligação a um vector biológico (Fig. 5.6). **L5** reagiu com *fac*-[M(CO)₃(H₂O)₃]⁺ originando **Re5** (M = Re) e **Tc5** (M = ^{99m}Tc) (Fig. 5.6).

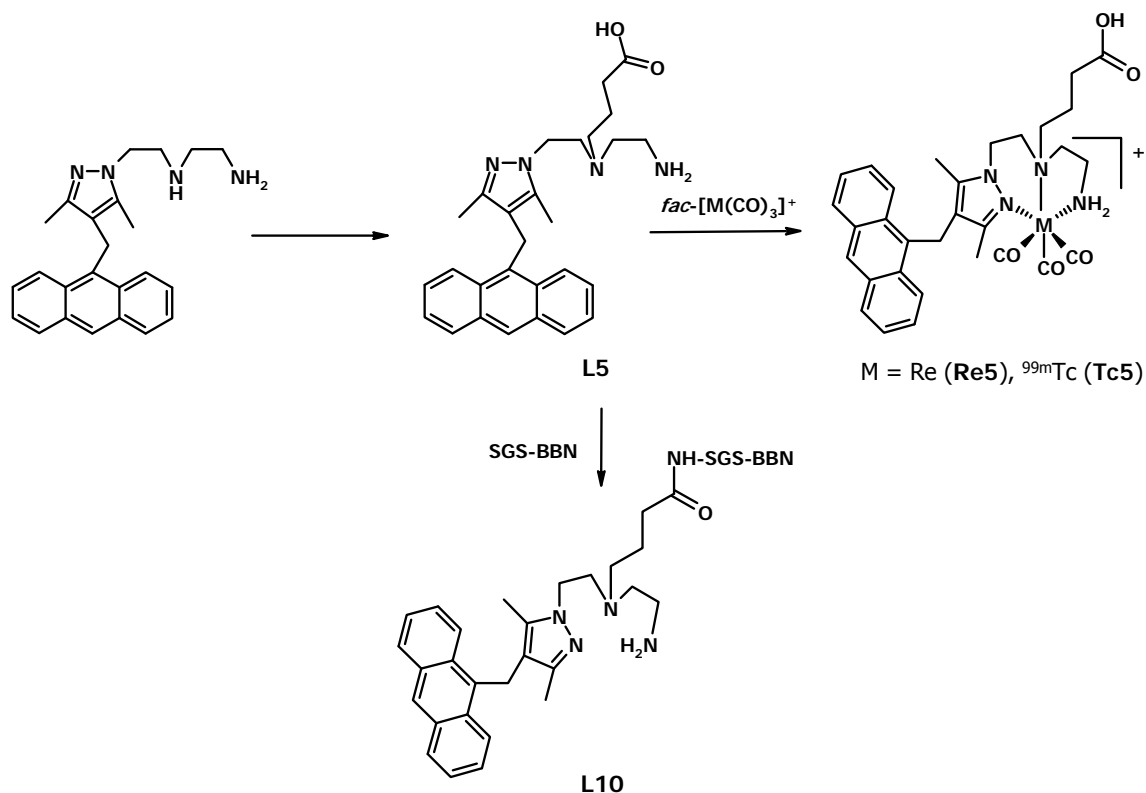


Figura 5.6: Síntese dos compostos L5, Re5/Tc5 e L10.

O composto L5 foi ligado à sequência peptídica SGS-BBN originando L10 (Fig. 5.5) que foi caracterizado por HPLC e ESI-MS.

Devido a limitações de tempo, não nos foi possível sintetizar os complexos de rénio (I) e ^{99m}Tc (I) estabilizados por L10. Consequentemente também não foi avaliado o comportamento destes compostos quando em contacto com células PC-3.

Os resultados globais obtidos nesta tese, e que foram descritos sumariamente nos parágrafos anteriores, mostraram-se bastante interessantes.

Pela primeira vez, foi demonstrado que era possível alvejar de um modo específico células tumorais e respectivos núcleos com complexos tricarbonylo de rénio (I) e ^{99m}Tc (I), funcionalizados com uma unidade intercaladora e com um vector biológico. Este

comportamento foi verificado, *in vitro* e em tempo real, seguindo o percurso nas células de complexos de rênio (I) por microscopia confocal de fluorescência, tirando partido das propriedades de emissão da unidade intercaladora. Por outro lado, utilizando complexos análogos de ^{99m}Tc (I) foi possível confirmar e quantificar essa internalização celular e nuclear.

De qualquer modo, por limitações de tempo, não foi possível completar e/ou iniciar estudos que certamente ajudariam a compreender e a explicar melhor alguns dos resultados descritos nesta tese. Neste contexto, gostaríamos de realçar alguns estudos que consideramos importante realizar futuramente:

1. O conjugado **L12** deverá ser utilizado para sintetizar o complexo **Tc12**. Estudos de internalização em células B16-F1 e PC-3 deverão ser realizados com **Re12** e **Tc12**. Caso se verificasse uma entrada específica e mais significativa nas células PC-3 e uma baixa radiotoxicidade, dever-se-ia sintetizar um ligando trifuncional análogo a **L12** mas com uma cadeia espaçadora mais curta entre o intercalador e o pirazolo. A avaliação biológica destes novos ligandos e dos respectivos complexos de rênio (I) e ^{99m}Tc (I) permitiriam compreender a razão pela qual, sendo **L1** e **Re1** intercaladores perfeitos, o complexo **Tc1** não promove a morte celular. Estes resultados ajudariam também a compreender e explicar o comportamento biológico encontrado para **Re6/Tc6** e **Re7/Tc7**.
2. O conjugado peptídico **L10** (Fig. 5.6), que contém como intercalador um derivado do antraceno e como vector biológico o análogo **SGS-BBN** deverá ser utilizado para preparar complexos tricarbonilo de rênio (I) e ^{99m}Tc (I). O comportamento biológico destes complexos em células PC-3 deverá ser estudado, nomeadamente internalização, especificidade e efeito radiotóxico. Caso estes complexos tenham especificidade para as células PC-3 e mantenham o efeito radiotóxico encontrado para a estrutura base que lhes deu origem, o efeito biológico da introdução de uma sequência NLS, na sequência peptídica, deveria ser avaliada. Caso se verificasse morte celular, a interacção dos

complexos de rênio (I) com o ADN deveria ser estudada, recorrendo às técnicas espectroscópicas já descritas nesta tese.

3. Dever-se-á tentar compreender a razão pela qual os conjugados **L6** e **L7** e os respectivos complexos **Re6** e **Re7** sofrem oxidação na Met. Estudos anteriores realizados, no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas, com o ligando pirazolo-diamina conjugado aos análogos peptídicos **GGG-BBN** e **SSS-BBN** e sem qualquer unidade intercaladora não revelaram a formação de espécies oxidadas.^{36,37} Nesta tese também mostrámos que o ligando pirazolo-diamina com o análogo **SGS-BBN** e antraceno como intercalador não sofria oxidação. Para além disso, fomos até ao momento os únicos a descrever na literatura a oxidação da BBN[7-14] durante a sua conjugação a ligandos bifuncionais.⁴⁵ Seria interessante verificar se a oxidação que encontramos nos compostos com AO está relacionada com a natureza do intercalador. Para tal dever-se-ia sintetizar novos compostos com outras unidades com reconhecida capacidade intercaladora e significativamente fluorescentes.

6. Parte Experimental

6. Parte Experimental

6.1. Materiais e Técnicas de Purificação e de Caracterização Química

- Solventes e Reagentes

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto quando indicado. Os solventes foram secos e destilados de acordo com métodos descritos¹⁷²:

- THF destilado de sódio/benzofenona;
- CH₂Cl₂ e CH₃CN destilados de hidreto de cálcio;
- MeOH destilado na presença de magnésio metálico e iodo molecular.

Os solventes foram mantidos sob azoto e guardados com peneiros 4Å (3Å para CH₃CN).

- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C (75,4 MHz) e ¹⁹F (281,98 MHz) foram efectuados em CDCl₃ ou CD₃OD e registados num espectrómetro Varian Unity 300 MHz. Os desvios químicos são apresentados em ppm e foram referenciados a partir das ressonâncias do solvente residual, relativamente ao tetrametilsilano, SiMe₄ (TMS).

- Espectroscopia de Infra-Vermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos sob a forma de pastilhas de KBr, num espectrómetro Bruker, Tensor 27.

- Espectrometria de Massa (MS)

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS Bruker HCT, com ionização por electrospray pelo Dr. Joaquim Marçalo (ITN) ou por MALDI-TOF, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, pela Dra. Ana Varela.

6. Parte Experimental

- Análise Elementar de CHN

As análises elementares de CHN foram efectuadas pelo Sr. António Soares no Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN), num analisador automático EA 110 CE Instruments.

- Cromatografia em Camada Fina (TLC)

As reacções químicas foram monitorizadas por TLC, utilizando tiras de sílica-gel 0,25 mm, em suporte de alumínio (Merck). Os cromatogramas foram revelados com radiação UV ao comprimento de onda de 254 nm ou com iodo.

A estabilidade radioquímica dos compostos radioactivos foi monitorizada por TLC utilizando tiras de sílica-gel 0,25 mm, Polygram® Sil G da Macherey-Nagel. A detecção da radioactividade no cromatograma fez-se com um detector Berthold LB 2723 equipado com um cristal de cintilação NaI(Tl).

- Cromatografia em Coluna

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica-gel 60, com granulometria 0,060 mesh (Merck). As colunas foram cheias com uma mistura de sílica-gel e eluente, escolhido de acordo com o composto em estudo. Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi feita por acção da gravidade e os compostos recolhidos em fracções de volume adequado. As fracções recolhidas foram analisadas por TLC para determinar as que correspondiam aos produtos pretendidos.

- Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

As análises por HPLC dos ligandos, complexos de rénio e de ^{99m}Tc foram realizadas num sistema cromatográfico equipado com uma bomba Perkin-Elmer LC 200 e com dois detectores em série: um detector de radiação γ (Berthold LB-507 A), e um detector UV (LC 290). Todos os solventes utilizados foram de qualidade HPLC e foram desarejados com hélio. A água era bidestilada em aparelho de quartzo e filtrada utilizando filtros milipore 0,22 μm .

As condições cromatográficas para HPLC analítico foram as seguintes:

Coluna: Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-10 C18 (ou 100-5 C18)

Fluxo: 1,0 mL/min (ou 0,9 mL/min, com coluna 100-5 C18)

Detecção UV: 254 nm

Eluentes: A- TFA 0,1 %; B- CH₃CN

Método A:

Step	t (min)	%A	%B	Curv
0	5,0	100	-	-
1	3,0	100	-	-
2	0,1	75	25	1
3	5,9	75	25	-
4	0,1	66	34	1
5	8,9	-	100	1
6	7,0	-	100	-
7	0,1	100	-	1
8	4,9	100	-	-

As condições cromatográficas para HPLC semi-preparativo, utilizadas na purificação dos compostos acima referidos, foram as seguintes:

Coluna: Macherey-Nagel EP 250/8 Nucleosil 100-7 C18

Pré-coluna: Macherey-Nagel EP 30/8 Nucleosil 100-7 C18

Fluxo: 2,0 mL/min

Detecção UV: 254 nm

Eluentes: A- TFA 0,1 %; B- CH₃CN

6. Parte Experimental

Método B:

Step	t (min)	%A	%B	Curv
0	5,0	100	-	-
1	3,0	100	-	-
2	0,1	75	25	1
3	5,9	75	25	-
4	0,1	66	34	1
5	8,9	-	100	1
6	17,0	-	100	-
7	0,1	100	-	1
8	4,9	100	-	-

Os análogos da BBN foram analisados e purificados utilizando o método A, descrito anteriormente, ou o método C, que utilizou as seguintes condições:

Coluna: Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18

Fluxo: 1,0 mL/min

Detecção UV: 280 nm

Eluentes: A- TFA 0,1 %; B- CH₃CN modificado com TFA 0,1%

Método C:

Step	t (min)	%A	%B	Curv
0	5,0	100	-	-
1	3,0	100	-	-
2	0,1	75	25	1
3	5,9	75	25	-
4	0,1	66	34	1
5	43,9	10	90	1
6	2	10	90	-

- Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS)

Os análogos da BBN foram preparados num sintetizador automático Liberty (Carolina do Norte, CEM) usando a resina Rink amide MBHA (0,64 mmol/g; 100-200 mesh, NovaBiochem, Merck, Alemanha) e o grupo Fmoc como protector. Todos os aa utilizados estão disponíveis comercialmente e são da CEM (Carolina do Norte, USA). A clivagem das sequências peptídicas e remoção simultânea dos grupos protectores das cadeias laterais foi realizada utilizando uma mistura de clivagem constituída por TFA:tioanisolo:H₂O:etanoditiol nas proporções 36:2:1:1. Os péptidos foram precipitados por adição de uma solução de Et₂O gelado. O sólido resultante foi separado e lavado várias vezes com Et₂O. O produto obtido foi seco em vazio, purificado por HPLC e caracterizado por ESI-MS.

- Medição da Actividade das Soluções Radioactivas

A actividade das soluções de ^{99m}Tc foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3) ou num contador gama (Berthold, LB2111).

- Medição da absorvância em placas de 96 poços

A absorvância em placas de 96 poços foi medida num espectrofotómetro de placas Power Wave Xs, Bio-Tek a 570 nm.

- Espectroscopia de UV-Visível

Os espectros de UV-Visível foram traçados num espectrómetro Hitachi U-2000 utilizando células de quartzo com percurso óptico de 1 cm. Os resultados foram corrigidos tendo em conta o factor de diluição das soluções.

- Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados num espectrofluorímetro LS 50B da Perkin Elmer utilizando cuvetes de quartzo de 1 cm de percurso óptico. As soluções dos compostos **L1** e **Re1** foram excitadas a 470 nm e as soluções dos compostos **L2** e **Re2** foram excitadas a 359 nm. Os slits de emissão e excitação foram seleccionados para cada uma das

6. Parte Experimental

soluções de modo a maximizar a intensidade de fluorescência das mesmas. Foram obtidos os espectros de emissão entre 400 e 700 nm para os compostos **L1** e **Re1**, e entre 350 e 650 nm para os compostos **L2** e **Re2**, com uma velocidade de varrimento de 150 nm/min. Os resultados foram corrigidos tendo em conta o factor de diluição das soluções e a densidade óptica ao valor do comprimento de onda de excitação.

- Dicroísmo Circular

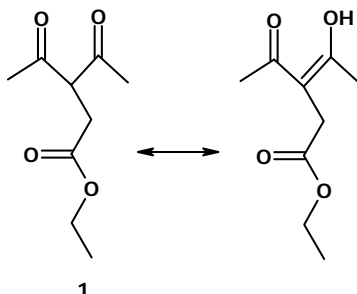
Os espectros de CD foram traçados num espectropolarímetro Jasco J-720 que possui um polarímetro com um fotomultímetro UV-Visível (200-700 nm) utilizando cuvetes de 1 ou 2 cm de percurso óptico. O espectro do solvente no qual se encontravam solubilizados os compostos (tampão TRIS-HCL) foi subtraído ao espectro das amostras. Os espectros foram traçados entre 200 e 650 nm com sensibilidade de 10 mdeg, resolução de 0,2 nm, velocidade de varrimento de 50 nm/min, resposta de 4 segundos, largura de banda de 0,5 nm e 3 acumulações por espectro.

- Dicroísmo Linear

Para traçar os espectros de LD foi utilizada uma "flow-cell" num espectropolarímetro Jasco J-500 A equipado com uma interface Jasco J e um PC IBM. A preparação das amostras foi efectuada com um dispositivo descrito na literatura para o estudo de soluções de polímeros¹⁷³ pelo Doutor Giampietro Viola da Universidade de Pádua. O LD reduzido foi definido como a razão entre os valores de LD e a absorvância da amostra não orientada no estado estacionário (A_{iso}): $LDr = LD/A_{iso}$.

6.2. Síntese das Unidades Pirazolo-diamina

6.2.1. 3-acetil-4-oxopentanoato de etilo (1)¹⁷⁴



2,4-pentanediona (15 mL, 14,355 g, 0,143 mol) foi adicionada, gota a gota, a 0°C, a uma suspensão de NaH (6,300 g, 0,263 mol) em THF seco (200 mL). A mistura foi agitada durante 1 h a 0°C. De seguida, fez-se a adição lenta, a 0°C, de bromoacetato de etilo (16 mL, 24,096 g, 0,164 mol) e a mistura ficou a agitar durante 3 h a 0°C e durante a noite à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se, a 0°C, 700 mL de uma solução HCl 2N e extraiu-se com éter dietílico (Et₂O). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO₄) anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida.

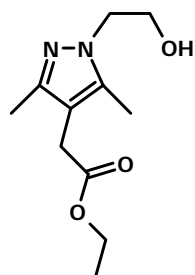
Rendimento: 21,090 g, 79% de óleo castanho amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,13 (m, 6H, CH₃ enol, CH₃ oxo); 2,03 (s, 6H, 2CH₃ enol); 2,15 (s, 6H, 2CH₃ oxo); 2,75 (d, 2H, CH₂ oxo); 3,13 (d, 2H, CH₂ enol); 4,01 (m, 6H, 1CH oxo, 1CH enol, 1CH₂ oxo, 1CH₂ enol)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 13,81 (CH₃ oxo, CH₃ enol); 23,04 (2CH₃, enol); 25,93 (CH₂ oxo); 29,40 (2CH₃, oxo); 32,989 (CH₂, enol); 36,66 (CH oxo); 60,86 (CH₂ enol); 62,86 (CH₂ oxo); 104,14 (CH enol); 170,98 (C=O oxo); 171,31 (C=O enol); 191,66 (C-OH enol); 202,66 (C=O oxo)

6. Parte Experimental

6.2.2. N-(2-hidroxietil)-4-(metilpropionato)-3,5-dimetilpirazolo (2)¹⁷⁵



2

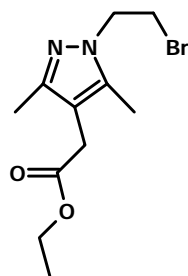
Uma solução de 2-hidroxietilhidrazina (7,7 mL, 8,639 g, 0,114 mol) em etanol (EtOH, 200 mL) foi adicionada, a 0°C, a uma solução de 1 (21,09 g, 0,114 mol) em EtOH (100 mL). Após a adição, a mistura ficou a reagir à temperatura ambiente durante a noite. Ao fim deste tempo evaporou-se o solvente a pressão reduzida.

Rendimento: 25,325 g, 99% de sólido laranja escuro.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,22 (t, 3H, CH₃); 2,15 (s, 3H, CH₃); 2,17 (s, 3H, CH₃); 3,30 (s, 2H, CH₂); 3,91 (t, 2H, CH₂); 4,02 (t, 2H, CH₂); 4,10 (q, 2H, CH₂)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,61 (CH₃); 11,75 (CH₃); 14,12 (CH₃); 29,59 (CH₂); 49,99 (CH₂); 60,76 (CH₂); 61,54 (CH₂); 108,94 (C(4) pz); 137,68 (C(5) pz); 146,74 (C(3) pz); 171,59 (C=O)

6.2.3. N-(2-bromoetil)-4-(metilpropionato)-3,5-dimetilpirazolo (3)



3

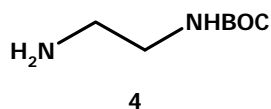
A uma solução de 2 (1,000 g, 4,412 mmol) em tolueno (30 mL) adicionou-se PBr₃ (1 mL, 2,880 g, 10,639 mmol) e a mistura ficou em refluxo durante a noite. Evaporou-se o solvente e foi feita uma extracção com uma solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃) e clorofórmio (CHCl₃). A fase orgânica foi separada, seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida.

Rendimento: 0,981 g, 77% de óleo castanho escuro.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,21 (t, 3H, CH_3); 2,15 (s, 3H, CH_3); 2,20 (s, 3H, CH_3); 3,29 (s, 2H, CH_2); 3,63 (t, 2H, CH_2); 4,09 (m, 2H, CH_2), 4,29 (t, 2H, CH_2)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 9,60 (CH_3); 11,72 (CH_3); 13,99 (CH_3); 29,56 (CH_2); 30,10 (CH_2); 49,62 (CH_2); 60,54 (CH_2); 109,08 (C(4) pz); 137,41 (C(5) pz); 147,20 (C(3) pz); 171,25 (C=O)

6.2.4. N-*ter*-butoxicarbonilo-1,2-etanodiamina (4)¹⁷⁶



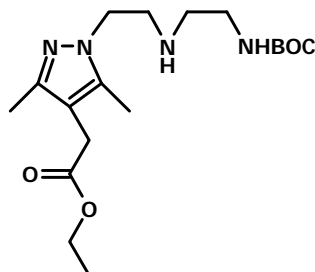
Uma solução de dicarbonato de di-*ter*-butilo (BOC) (20 g, 91,638 mmol) em dioxano seco (100 mL) foi adicionada, gota a gota, à temperatura ambiente, a uma solução de 1,2-diaminoetano (49 mL, 44,060 g, 733,104 mmol) em dioxano seco (100 mL). A mistura foi deixada em agitação durante 22 h e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Ao resíduo obtido adicionou-se água (150 mL) e filtrou-se. O filtrado foi extraído com CHCl_3 (4 x 50 mL) e a fase orgânica depois de seca com MgSO_4 e filtrada, foi seca a pressão reduzida.

Rendimento: 10,404 g, 71 % de óleo amarelado.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,13 (s, 2H, NH_2); 1,23 (s, 9H, 3 CH_3 , BOC); 2,57 (t, 2H, CH_2); 2,94 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-NHBOC}$); 5,42 (s br, 1H, NH)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 28,03 (3 CH_3 , BOC); 41,49 (CH_2); 43,06 (CH_2); 78,51 (C-BOC); 156,00 (C=O, BOC)

6.2.5. Acetato de etil 2-(1-(2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) (5)



O composto **3** (0,962 g, 3,327 mmol) foi dissolvido em CH_3CN seco (10 mL). Foi preparada uma mistura de **4** (0,800 g, 4,992 mmol), carbonato de potássio (K_2CO_3 , 0,450 g, 3,256 mmol) e iodeto de potássio (KI, 0,030 g, 0,181 mmol) em CH_3CN seco. Fez-se a

6. Parte Experimental

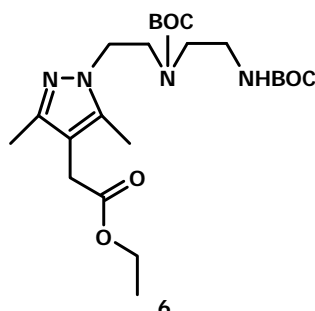
adição de **3** a esta mistura, gota a gota, e ficou em refluxo durante a noite. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada e o solvente evaporado. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ 90% / MeOH 10%).

Rendimento: 1,011 g, 82% de óleo amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,15 (t, 3H, CH₃); 1,35 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 1,95 (s, 1H, NH), 2,10 (m, 6H, 2CH₃); 2,63 (t, 2H, CH₂); 2,91 (t, 2H, CH₂); 3,10 (m, 2H, CH₂); 3,24 (s, 2H, CH₂); 4,02 (m, 4H, 2CH₂); 5,16 (s, 1H, NH-BOC)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,57 (CH₃); 11,70 (CH₃); 14,01 (CH₃); 28,23 (3CH₃ (BOC)); 29,56 (CH₂); 39,78 (CH₂); 48,14 (CH₂); 48,38 (CH₂); 60,54 (CH₂); 77,20 (CH₂); 78,84 (C-BOC); 108,94 (C(4) pz); 137,17 (C(5) pz); 146,51 (C(3) pz); 155,95 (C=O); 171. 41 (C=O)

6.2.6. Acetato de etil-2-(1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) (6)



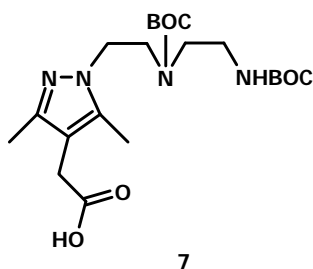
Uma solução de BOC (0,659 g, 3,018 mmol) em THF seco (25 mL) foi adicionada, gota a gota, a 0°C, a uma solução de **5** (1,011 g, 2,744 mmol) em THF seco (25 mL). A mistura foi agitada durante 2 h e meia à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente. De seguida, foi feita uma extracção com uma solução aquosa saturada de Na₂CO₃ e CH₂Cl₂. Separou-se a fase orgânica, secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente.

Rendimento: 0,943 g, 73% de óleo amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,19 (t, 3H, CH₃), 1,39 (m, 18H, 6CH₃ (BOC)), 2,11 (m, 6H, 2CH₃); 3,00 (m, 2H, CH₂); 3,09 (m, 2H, CH₂); 3,27 (s, 2H, CH₂); 3,48 (t, 2H, CH₂); 4,05 (m, 4H, 2CH₂); 4,92 e 5,14 (1H, NH-BOC)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 9,38 (CH_3); 11,80 (CH_3); 14,16 (CH_3); 27,34 (3CH_3 (BOC)); 28,34 (3CH_3 (BOC)); 29,74 (CH_2); 39,42 (CH_2); 46,77 (CH_2); 48,26 (CH_2); 60,66 (CH_2); 79,04 (C-BOC); 80,20 (C-BOC); 85,13 (CH_2); 109,12 (C(4) pz); 137,35 (C(5) pz); 146,68 (C(3) pz); 154,67 (C=O); 155,74 (C=O); 171,47 (C=O)

6.2.7. 2-(1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) ácido acético (7)



Uma solução de NaOH (0,805 g, 20,12 mmol) em água foi adicionada a uma solução de **6** (0,943 g, 2,012 mmol) em THF (20 mL) e a mistura refluxou durante a noite. Após esse tempo, neutralizou-se com uma solução de HCl 1N e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Fez-se a extracção do resíduo seco com CH_2Cl_2 e secou-se a fase orgânica.

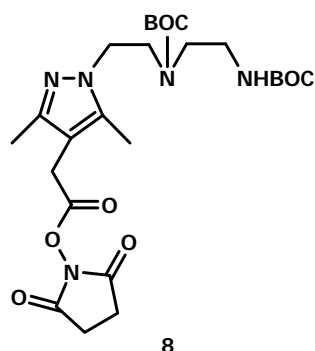
Rendimento: 0,625 g, 70% de sólido amarelado.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,35 (s, 18H, 6CH_3 (BOC)), 2,05 (s, 6H, 2CH_3), 2,93 (m, 2H, CH_2); 3,03 (m, 2H, CH_2); 3,12 (s, 2H, CH_2); 3,43 (m, 2H, CH_2); 3,55 (m, 2H, CH_2); 4,01 (m, 2H, CH_2); 5,32 (s, 1H, NH-BOC)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 9,25 (CH_3); 11,73 (CH_3); 28,27 (6CH_3 (BOC)); 29,61 (CH_2); 39,36 (CH_2); 46,86 (CH_2); 48,19 (CH_2); 62,07 (CH_2); 78,96 (C-BOC); 80,20 (C-BOC); 112,18 (C(4) pz); 136,68 (C(5) pz); 146,81 (C(3) pz); 155,51 (C=O); 156,03 (C=O); 178,34 (C=O)

6. Parte Experimental

6.2.8. *Tert*-Butil N-(2-[[*tert*-butoxi)carbonil](2-{4-[2-(2,5-dioxopirrolidinil)-2-oxoetil]-3,5-dimetilpirazolo}etil)amino}-etil) carbamato (8)



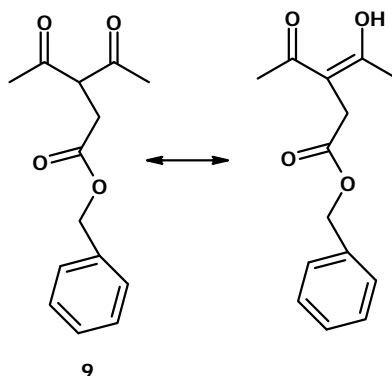
A uma solução de **7** (0,667 g; 1,514 mmol) em CH₂Cl₂ seco (20 mL), em banho de gelo, foi adicionada N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,193 g; 1,665 mmol) e a mistura resultante foi agitada durante 30 min. Em seguida, adicionou-se a 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC, 0,319 g, 1,665 mmol) e deixou-se a mistura reaccional sob agitação, à temperatura ambiente, durante 48 h. Decorrido esse tempo, o solvente foi evaporado na linha de vácuo e o resíduo resultante foi extraído com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e evaporada a pressão reduzida.

Rendimento: 0,411 g, 50% de sólido amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,36 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 1,40 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 2,12 (s, 3H, CH₃); 2,16 (s, 3H, CH₃); 2,77 (s, 4H, 2CH₂, NHS); 2,96 (m, 2H, CH₂); 3,05 (m, 2H, CH₂); 3,47 (t, 2H, CH₂); 3,59 (s, 2H, CH₂); 4,05 (m, 2H, CH₂); 4,92 e 5,13 (s, 1H, NH-BOC)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,35 (CH₃); 11,66 (CH₃); 25,48 (2CH₂, NHS); 26,47 (CH₂); 28,31 (6CH₃ (BOC)); 29,61 (CH₂); 39,35 (CH₂); 46,88 (CH₂); 48,02 (CH₂); 78,99 (C-BOC); 80,23 (C-BOC); 106,69 (C(4) pz); 138,38 (C(5) pz); 147,06 (C(3) pz); 155,34 (C=O); 155,74 (C=O); 166,43 (2(C=O), NHS); 169,83 (C=O)

6.2.9. 3-acetil-4-oxopentanoato de benzilo (9)



2,4-pentanediona (6,320 g, 63,122 mmol) foi adicionada lentamente a 0°C a uma suspensão de NaH (2,777 g, 69,434 mmol) em THF seco (100 mL). Após 1 h de agitação a 0°C, adicionou-se bromoacetato de benzilo (14,460 g, 63,122 mmol). A mistura foi agitada a 0°C durante 5 h e durante a noite à temperatura ambiente. Adicionou-se HCl 2N (316 mL) e extraiu-se de seguida com Et₂O (5 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

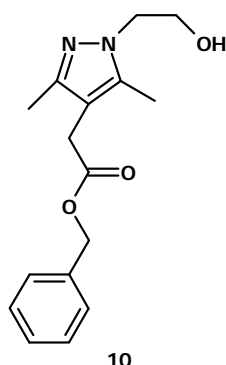
Rendimento: 15,319 g, 98% de óleo amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 2,08 (m, 3H, CH₃); 2,18 (m, 3H, CH₃); 2,86 (t, 2H, CH₂, oxo); 3,24 (t, 2H, CH₂, enol); 4,10 (q, 1H, CH, oxo); 5,05 (m, 4H, CH₂ oxo, CH₂ enol); 7,27 (m, 10H, 10CH-Ar); 16,79 (OH, enol)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 23,02 (2CH₃, enol); 25,91 (CH₂, oxo); 29,38 (2CH₃, oxo); 32,24 (oxo); 32,94 (enol); 36,58; 62,76 (CH, oxo); 66,54 (CH₂, oxo); 104,03 (C, enol); 128,16 (10CH-Ar); 135,23 (C-Ar); 170,83 (oxo); 171,13 (enol); 191,71 (C-OH, enol); 202,28 (2C=O, oxo)

6. Parte Experimental

6.2.10. 1-(2-hidroxiethyl)-3,5-dimetilpirazolo) acetato de benzilo (10)



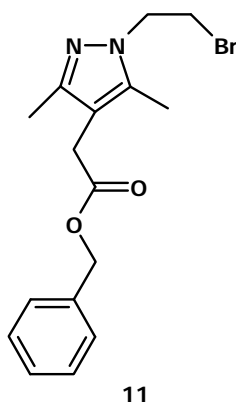
Uma solução de 2-hidroxiethylhidrazina (4,695 g, 61,696 mmol) em EtOH (200 mL) foi adicionada gota a gota a 0°C a uma solução de **9** (15,319 g, 61,696 mmol) em EtOH (100 mL). Após reacção durante a noite à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (99-84%) / MeOH (1-16%)).

Rendimento: 17,335 g, 97 %, de óleo amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 2,13 (s, 6H, 2CH₃); 3,36 (s, 2H, CH₂); 3,89 (t, 2H, CH₂); 4,01 (t, 2H, CH₂); 5,08 (s, 2H, CH₂); 7,30 – 7,33 (m, 5H, 5CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,61 (CH₃); 11,73 (CH₃); 29,55 (CH₂); 50,04 (CH₂); 61,51 (CH₂); 66,53 (CH₂); 108,76 (C(4) pz); 128,05 – 128,48 (5CH-Ar); 135,70 (C-Ar); 137,77 (C3/C5 pz); 146,74 (C3/C5 pz); 171,38 (C=O)

6.2.11. 2-(1-(2-bromoethyl)-3,5-dimetilpirazolo)acetato de benzilo (11)



Uma solução de trifetilfosfina (PPh₃, 9,753 g, 37,184 mmol) em THF seco (30 mL) foi adicionada, gota a gota, a uma solução de **10** (4,874 g, 16,902 mmol) em THF seco (60 mL)

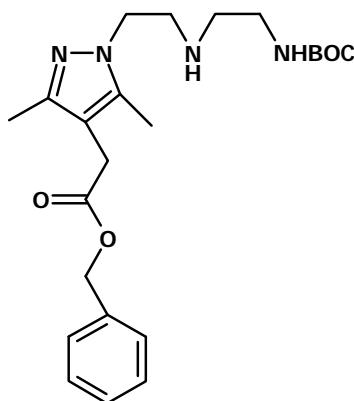
contendo tetrabrometo de carbono (CBr_4 , 11,211 g, 33,804 mmol). Após a adição obteve-se uma suspensão que ficou a reagir à temperatura ambiente durante a noite. Após esse tempo filtrou-se a suspensão e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O sólido resultante foi lavado com Et_2O e seco novamente.

Rendimento: 3,849 g, 65 % de sólido castanho amarelado.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 2,13 (s, 3H, CH_3); 2,16 (s, 3H, CH_3); 3,33 (s, 2H, CH_2); 3,64 (t, 2H, CH_2); 4,32 (t, 2H, CH_2); 5,04 (s, 2H, CH_2); 7,26 (m, 5H, 5CH-Ar)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 9,90 (CH_3); 11,53 (CH_3); 29,54 (CH_2); 30,13 (CH_2); 49,72 (CH_2); 66,61 (CH_2); 109,50 (C(4) pz); 128,28 (5CH-Ar); 135,63 (C-Ar); 138,65 (C3/C5 pz); 147,01 (C3/C5 pz); 170,79 (C=O)

6.2.12. 2-(1-(2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo)acetato de benzilo (12)



12

O composto **11** (4,543 g, 12,932 mmol) foi dissolvido em CH_3CN seco (45 mL). Foi preparada uma mistura de **4** (4,144 g, 25,864 mmol), K_2CO_3 (3,575 g, 25,864 mmol) e KI (0,107 g, 0,647 mmol) em CH_3CN seco (50 mL). Fez-se a adição de **11** a esta mistura, gota a gota, e ficou em refluxo durante a noite. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada e seca a pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: hexano (50-0%) / AcOEt (50-100%) / CHCl_3 (100-0%) / MeOH (0-90%)).

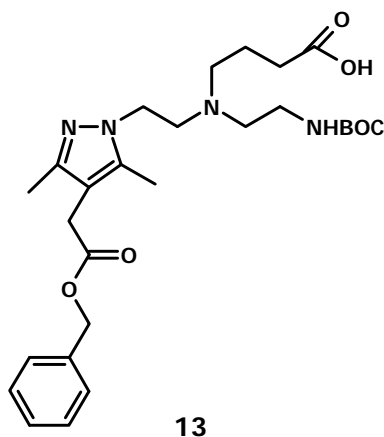
Rendimento: 4,942 g, 89 % de óleo castanho escuro.

6. Parte Experimental

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,24 (s, 9H, 3CH₃); 1,96 (s, 6H, 2CH₃); 2,48 (t, 2H, CH₂); 2,76 (t, 2H, CH₂); 2,96 (m, 2H, CH₂); 3,17 (s, 2H, CH₂); 3,83 (t, 2H, CH₂); 4,89 (s, 2H, CH₂); 5,37 (s br, 1H, NH); 7,09 (m, 5H, 5CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,06 (CH₃); 11,24 (CH₃); 27,82 (3CH₃, BOC); 29,07 (CH₂); 47,72 (CH₂); 48,01 (CH₂); 65,75 (CH₂); 77,22 (CH₂); 78,13 (C-BOC); 108,28 (C(4) pz); 127,54 (5CH-Ar); 135,30 (C-Ar); 136,71 (C3/C5 pz); 145,87 (C3/C5 pz); 155,55 (C=O, BOC); 170,62 (C=O)

6.2.13. Etil-4-((2-(4-(2-(benziloxi)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) butanoato (13)



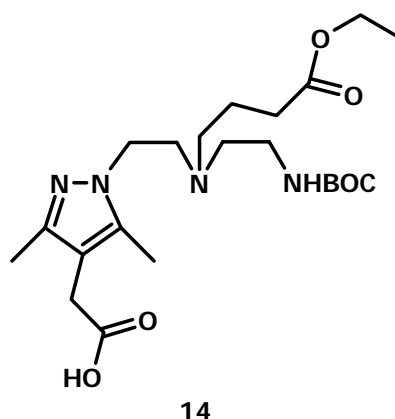
O composto **12** (4,346 g, 10,093 mmol) foi dissolvido em CH₃CN seco (20 mL). A esta solução foram adicionados trietilamina (Et₃N, 8,4 mL, 60,558 mmol) e iodeto de sódio (NaI, 0,076 g, 0,505 mmol). Adicionou-se 4-bromobutirato de etilo (4,3 mL, 30,279 mmol), gota a gota, à suspensão anterior, dissolvido em CH₃CN seco (15 mL). Deixou-se a mistura em refluxo durante 48 h. Após esse tempo, filtrou-se a suspensão e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Foi feita uma extração com CH₂Cl₂ e água. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida. O produto assim obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (100–0%) / MeOH (0–100%)).

Rendimento: 2,909 g, 53 % de óleo amarelo claro.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,16 (t, 3H, CH₃); 1,36 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,55 (m, 2H, CH₂); 2,10 (m, 8H, 2CH₃, CH₂); 2,36 (t, 2H, CH₂); 2,42 (t, 2H, CH₂); 2,68 (t, 2H, CH₂); 2,98 (m, 2H, CH₂); 3,30 (s, 2H, CH₂); 3,91 (t, 2H, CH₂); 4,02 (m, 4H, 2CH₂); 5,02 (s, 2H, CH₂); 5,32 (s br, 1H, NH); 7,26 (m, 5H, 5CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,58 (CH₃); 11,60 (CH₃); 14,10 (CH₃); 22,24 (CH₂); 28,33 (3CH₃, BOC); 29,58 (CH₂); 31,28 (CH₂); 47,14 (CH₂); 53,17 (CH₂); 53,44 (CH₂); 53,51 (CH₂); 60,08 (CH₂); 66,32 (CH₂); 66,33 (CH₂); 78,66 (C-BOC); 108,74 (C(4) pz); 127,92-128,35 (5CH-Ar); 135,74 (1C-Ar); 136,85 (C3/C5 pz); 146,24 (C3/C5 pz); 156,04 (C=O, BOC); 171,11 (C=O); 173,42 (C=O)

6.2.14. 2-(1-(2-((2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil) (4-etoxi-4-oxobutil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo) ácido acético (14)



O composto **13** (0,084 g, 0,154 mmol) e cerca de 500 mg de 10% de paládio em carvão activado foram suspensos em 25 mL de EtOH seco. A suspensão foi borbulhada com hidrogénio durante um dia e ficou saturada em hidrogénio durante uma noite. Após esse tempo a mistura foi filtrada sobre celite. Evaporou-se o filtrado a pressão reduzida.

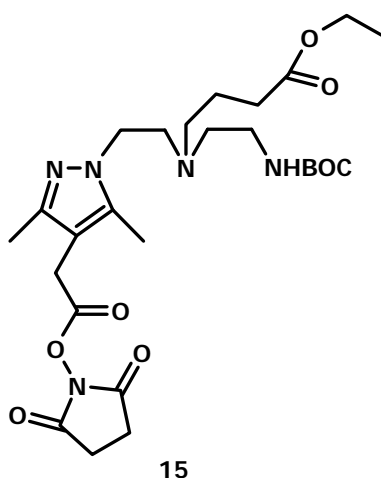
Rendimento: 0,061 g, 87% de óleo amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,21 (t, 3H, CH₃); 1,39 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,62 (m, 2H, CH₂); 2,14 (m, 8H, 2CH₃, CH₂); 2,43 (m, 4H, 2CH₂); 2,75 (m, 2H, CH₂); 3,04 (m, 2H, CH₂); 3,28 (s, 2H, CH₂); 3,99 (m, 2H, CH₂); 4,06 (q, 2H, CH₂); 5,29 (s br, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,64 (CH₃); 11,50 (CH₃); 14,17 (CH₃); 22,00 (CH₂); 28,39 (3CH₃, BOC); 29,73 (CH₂); 31,44 (CH₂); 32,31 (CH₂); 38,17 (CH₂); 46,76 (CH₂); 53,39 (2CH₂); 60,32 (2CH₂); 78,98 (C-BOC); 109,47 (C(4) pz); 137,27 (C3/C5 pz); 146,51 (C3/C5 pz); 156,21 (C=O, BOC); 173,58 (C=O); 175,33 (C=O)

6. Parte Experimental

6.2.15. Etil-4-((2-(tert-butoxicarbonilamino)etil) (2-(4-(2-(2,5-dioxopirrolidiniloxi)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil)amino) butanoato (15)



A uma solução de **14** (0,061 g, 0,134 mmol) em CH₂Cl₂ seco (20 mL), em banho de gelo, foi adicionada NHS (0,017 g, 0,147 mmol) e a mistura resultante foi agitada durante 30 min. Em seguida, adicionou-se a EDC (0,028 g, 0,147 mmol), e deixou-se a mistura reaccional sob agitação, à temperatura ambiente, durante 48 h. Após decorrido esse tempo, o solvente foi evaporado na linha de vazio e o resíduo resultante foi extraído com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e evaporada a pressão reduzida.

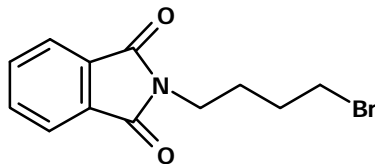
Rendimento: 0,052 g, 71% de óleo amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,21 (t, 3H, CH₃); 1,41 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,57 (m, 2H, CH₂); 2,09 (m, 2H, CH₂); 2,15 (m, 6H, 2CH₃); 2,39 (t, 2H, CH₂); 2,41 (t, 1H, CH); 2,78 (m, 6H, 3CH₂); 3,03 (m, 1H, CH); 3,61 (m, 4H, 2CH₂); 3,97 (t, 2H, CH₂); 4,13 (q, 2H, CH₂); 5,42 (s br, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,69 (CH₃); 11,70 (CH₃); 14,22 (CH₃); 22,35 (CH₂); 25,55 (2CH₂, NHS); 26,53 (CH₂); 28,46 (3CH₃, BOC); 29,65 (CH₂); 31,40 (CH₂); 38,48 (CH₂); 47,37 (CH₂); 53,60 (2CH₂); 60,22 (CH₂); 78,84 (C-BOC); 106,60 (C(4) pz); 137,42 (C3/C5 pz); 146,49 (C3/C5 pz); 156,22 (C=O, BOC); 166,58 (C=O); 168,99 (2C=O, NHS); 173,64 (C=O)

6.3. Síntese das Unidades Intercaladoras

6.3.1. 2-(4-bromobutil)isoindolino-1,3-diona (16)¹⁷⁷



16

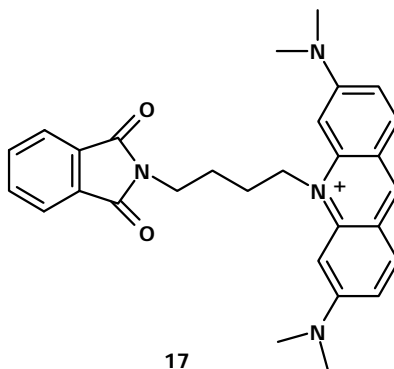
A uma solução de ftalimida de potássio (32,554 g, 0,176 mol) em CH₃CN seco (100 mL) foi adicionado dibromo butano (63 mL, 0,527 mol). Após a adição a mistura ficou a reagir, em refluxo, durante 6 h. Ao fim desse tempo, filtrou-se a mistura e deixou-se o filtrado no frigorífico durante a noite. Filtrou-se novamente a mistura e lavou-se o sólido com MeOH frio. As águas de lavagem foram colocadas no frio, concentradas e foi recuperado o produto que precipitou.

Rendimento: 32,983 g, 67 % de sólido amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,82 (m, 4H, 2CH₂); 3,39 (t, 2H, CH₂); 3,67 (t, 2H, CH₂); 7,68 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,78 (m, 2H, 2CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 27,08 (CH₂); 30,79 (CH₂); 32,74 (CH₂); 36,78 (CH₂); 123,09 (2CH-Ar); 131,85 (2C-Ar); 133,85 (2CH-Ar); 168,18 (2C=O)

6.3.2. 3,6-bis(dimetilamino)-10-(4-(1,3-dioxoisoindolinil)butil)acridinium (17)



17

Foi adicionado xileno (90 mL) a um balão que continha AO (1 g, 3,769 mmol) e 16 (3,190 g, 11,306 mmol). A mistura refluxou durante a noite. Ao fim desse tempo a mistura

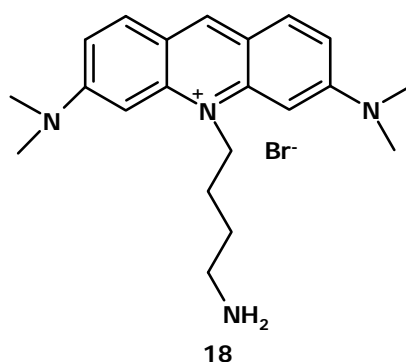
6. Parte Experimental

reaccional foi filtrada e o sólido resultante lavado com acetona e seco em vazio. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CH₂Cl₂ (98–80%) / MeOH (2-20%)).

Rendimento: 0,597 g, 31 % de sólido laranja avermelhado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,90 (t, 2H, CH₂); 2,06 (t, 2H, CH₂); 3,25 (s, 12H, 4CH₃); 3,80 (t, 2H, CH₂); 4,88 (m, 2H, CH₂); 6,51 (s, 2H, 2CH-Ar); 6,94 (d, 2H, 2CH-Ar); 7,68 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,74 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,81 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,63 (s, H, CH-Ar)

6.3.3. 10-(4-amino-butil)-3,6-bis-dimetilamino-acridinium (18)



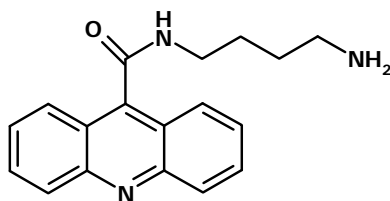
A uma suspensão de **17** (0,597 g, 1,177 mmol) numa mistura MeOH:EtOH (30 mL:10 mL) foi adicionada hidrazina (0,471 g, 9,416 mmol) e deixou-se a refluxar durante a noite. Ao fim desse tempo foi adicionado HCl concentrado (4 mL) até formação de um precipitado que foi filtrado. Ajustou-se o pH do filtrado a 9 com NaOH 3M e foi feita uma extracção com CHCl₃ e água. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida.

Rendimento: 0,450 g, 95 % de sólido laranja avermelhado.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,95 (m, 2H, CH₂); 2,08 (m, 2H, CH₂); 3,01 (t, 2H, CH₂); 3,33 (s, 12H, 4CH₃); 4,78 (t, 2H, CH₂); 6,68 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,26 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,90 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,66 (s, H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 24,42 (CH₂); 26,40 (CH₂); 40,57 (CH₂); 40,95 (4CH₃); 47,69 (CH₂); 93,61 (2CH-Ar); 115,43 (2CH-Ar); 118,38 (2C-Ar); 134,38 (2CH-Ar); 143,95 (2C-Ar); 144,30 (CH-Ar); 157,32 (2C-Ar)

HPLC t_{ret}: 14,64 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

6.3.4. *N*-(4-aminobutil)acridina-9-carboxamida (19)

19

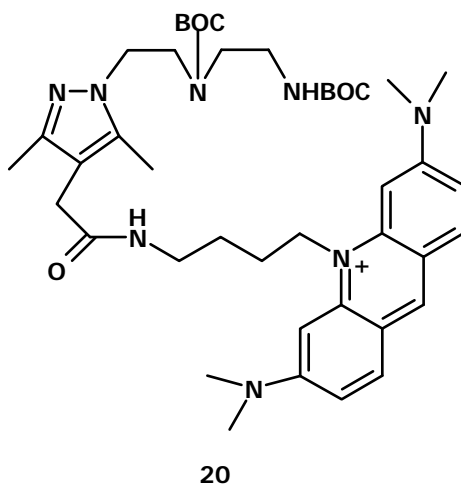
Uma suspensão de 9-ACA (0,460 g, 2,061 mmol) e (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)-fosfônio-hexafluorofosfato (BOP, 1,000 g, 2,261 mmol) em 25 mL de CH_2Cl_2 seco foi agitada durante 2 h à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, a mistura foi arrefecida a 0°C e 1,4-diaminobutano (1 mL, 10,275 mmol) foi adicionado gota a gota. A mistura reaccional ficou em agitação durante 53 h à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente e o produto seco foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl_3 (95-0%) / MeOH (5-80%) / NH_3 (0-20%)).

Rendimento: 0,415 g, 69 % de sólido amarelo.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,79 (m, 4H, 2CH_2); 2,85 (t, 2H, CH_2); 3,65 (t, 2H, CH_2); 7,67 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,87 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,06 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,19 (m, 2H, 2CH-Ar)

RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 27,72 (CH_2); 29,51 (CH_2); 40,76 (CH_2); 41,51 (CH_2); 123,65 (2C-Ar); 126,56 (2CH-Ar); 128,21 (2CH-Ar); 129,56 (2CH-Ar); 132,05 (2CH-Ar); 132,33 (C-Ar); 149,57 (2C-Ar); 169,21 (C=O)

6.4. Síntese dos Ligandos L1-L5

6.4.1. 10-(4-(2-(1-(2-*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo)acetamido)butil)-3,6-bis(dimetilamino)acridinium (20)

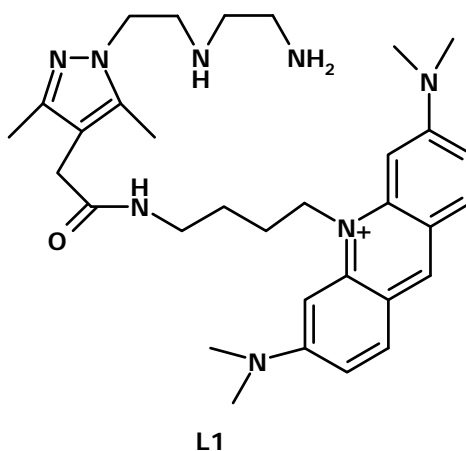
A uma solução de **18** (0,045 g, 0,107 mmol) em DMF seca (20 mL), mantida em agitação durante 1 h, adicionou-se uma solução de **8** (0,055 g, 0,102 mmol) e DIPEA (19 μ L, 0,107 mmol) em DMF (5 mL). Após 5 dias à temperatura ambiente, o solvente foi removido a pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (95–60%) / MeOH (5–35%) / NH₃ (0–5%)).

Rendimento: 0,054 g, 63% de sólido de cor laranja escura.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,35 (m, 18H, 6CH₃ (BOC)); 1,95 (m, 4H, 2CH₂); 2,07 (m, 6H, 2CH₃); 3,05 (m, 4H, 2CH₂); 3,31 (m, 18H, 3CH₂, 4CH₃); 3,99 (m, 2H, CH₂); 4,70 (m, 2H, CH₂); 5,27 (s br, 1H, NH), 5,73 (s, br, 1H, NH); 6,57 (s, 2H, 2CH-Ar); 6,97 (d, 2H, 2CH-Ar); 7,75 (t, 2H, 2CH-Ar); 8,47 (m, H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,14 (CH₃); 11,37 (CH₃); 17,95 (CH₂); 25,03 (CH₂); 27,77 (3CH₃, BOC); 30,74 (CH₂); 38,91 (CH₂); 40,46 (4CH₃); 41,68 (CH₂); 47,45 (CH₂); 53,23 (2CH₂); 57,13 (CH₂); 78,42 (C-BOC); 79,31 (C-BOC); 92,13 (2CH-Ar); 109,89 (C(4) pz); 113,55 (2CH-Ar); 116,52 (2C-Ar); 132,86 (2CH-Ar); 137,48 (C3/C5 pz); 142,05 (2C-Ar); 146,11 (C3/C5 pz); 155,08 (2CH-Ar); 155,60 (2C=O, BOC); 171,29 (C=O)

6.4.2. 10-(4-(2-(1-(2-(2-aminoetilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo)acetamido) butil-3,6-bis(dimetilamino)acridinium (L1)



Uma solução de **20** (0,244 g, 0,290 mmol) e TFA (2 mL, 25,960 mmol) em 2 mL de CH₂Cl₂ reagiu à temperatura ambiente, durante uma noite. Após esse tempo, o solvente foi removido a pressão reduzida e o produto foi lavado com acetato de etilo (AcOEt).

Rendimento: **L1(CF₃CO₂)·3,5TFA** (0,258 g, 0,241 mmol), 83 % de sólido vermelho alaranjado.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,90 (m, 4H, 2CH₂); 2,03 (s, 3H, CH₃); 2,15 (s, 3H, CH₃); 3,23 (m, 20H, 4CH₂, 4CH₃); 3,50 (s, 2H, CH₂); 4,31 (t, 2H, CH₂); 4,70 (t, 2H, CH₂); 6,64 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,24 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,87 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,62 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,37 (CH₃); 11,88 (CH₃); 24,79 (CH₂); 28,27 (CH₂); 31,30 (CH₂); 36,85 (CH₂); 40,21 (CH₂); 40,84 (4CH₃); 45,06 (CH₂); 45,80 (CH₂); 93,62 (2CH-Ar); 112,04 (C(4) pz); 115,51 (2CH-Ar); 118,12 (C_{TFA}); 118,47 (2C-Ar); 134,37 (2CH-Ar); 140,32 (C3/C5 pz); 144,02 (2C-Ar); 144,29 (1CH-Ar); 149,15 (C3/C5 pz); 157,35 (2CH-Ar); 163,56 (C_{TFA}); 173,83 (C=O)

RMN ¹⁸F (CD₃OD): δ (ppm) -76.39 (TFA)

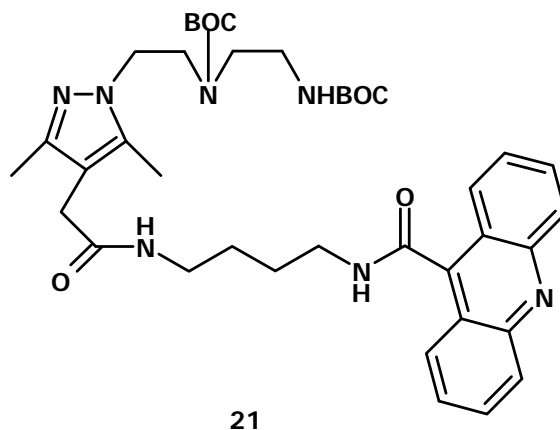
HPLC t_{ret}: 14,99 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

ESI-MS (m/z) (calculado): 559,1 [M]⁺ (560,39); 280,0 [M+H]²⁺ (280,69)

CHN Calculado (experimental): C₃₄H₄₇N₈O₂·3,5(CF₃CO₂H), C 45,94 (45,29); H 4,76 (5,27); N 10,46 (11,04)

6. Parte Experimental

6.4.3. N-(4-(2-(1-(2-(*tert*-butoxicarbonil(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolo)acetamido)butil) acridina-9-carboxamida (21)



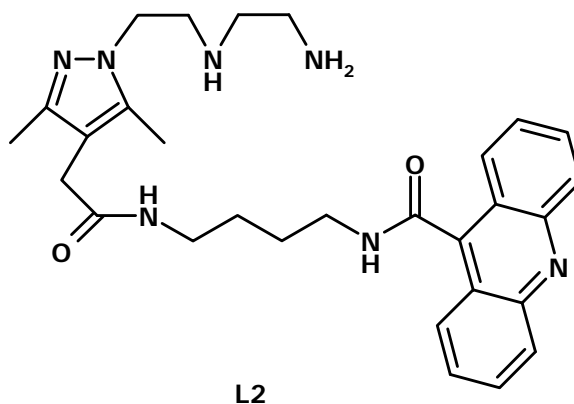
A uma solução de **19** (0,264 g, 0,491 mmol) em DMF seca (30 mL) adicionou-se uma solução de **8** (0,151 g, 0,516 mmol) e DIPEA (90 μ L, 0,516 mmol) em DMF (10 mL). Após 5 dias à temperatura ambiente, o solvente foi removido a pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (90 – 54 %) / MeOH (10 – 46 %)).

Rendimento: 0,294 g, 84 % de óleo amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,25 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 1,37 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 1,58 (m, 2H, CH₂); 1,68 (m, 2H, CH₂); 1,98 (s, 3H, CH₃); 2,00 (s, 3H, CH₃); 3,08 (s, 2H, CH₂); 3,14 (m, 8H, 4CH₂); 3,38 (NH); 3,55 (m, 2H, CH₂); 3,89 (m, 2H, CH₂); 6,59 (s br, NH, amida); 6,67 (s br, NH, amida); 7,37 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,59 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,82 (d, 2H, 2CH-Ar); 7,94 (d, 2H, 2CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,07 (CH₃); 11,17 (CH₃); 26,49 (CH₂); 26,71 (CH₂); 27,77 (6CH₃ (BOC)); 28,14 (6CH₃ (BOC)); 30,80 (CH₂); 36,01 (CH₂); 38,43 (CH₂); 38,89 (CH₂); 39,34 (CH₂); 47,17 (CH₂); 48,62 (CH₂); 78,55 (C-BOC); 79,21 (C-BOC); 109,43 (C(4) pz); 121,62 (2C-Ar); 124,97 (2CH-Ar); 126,10 (2CH-Ar); 128,68 (2CH-Ar); 129,91 (2CH-Ar); 137,38 (C-Ar); 141,30 (C3/C5 pz); 145,77 (2C-Ar); 147,70 (C3/C5 pz); 155,05 (C=O, BOC); 155,77 (C=O, BOC); 166,59 (C=O); 170,75 (C=O)

6.4.4. N-(4-(2-(1-(2-(2-aminoetilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolo)acetamido)butil)acridina-9-carboxamida (L2)



Uma solução de **21** (0,294 g, 0,411 mmol) e TFA (2 mL, 25,960 mmol) em 2 mL de CH₂Cl₂ foi deixada à temperatura ambiente durante uma noite. Após esse tempo, o solvente foi removido a pressão reduzida e o produto foi lavado com CHCl₃. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (95–70%) / MeOH (5–20%) / NH₃ (0–10%)).

Rendimento: **L2·2 TFA** (0,184 g, 0,247 mmol), 84 % de óleo amarelo.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,70 (m, 4H, 2CH₂); 2,12 (s, 3H, CH₃); 2,16 (s, 3H, CH₃); 2,61 (t, 2H, CH₂); 2,73 (t, 2H, CH₂); 2,88 (t, 2H, CH₂); 3,24 (m, 4H, 2CH₂); 3,61 (t, 2H, CH₂); 4,00 (t, 2H, CH₂); 7,61 (t, 2H, 2CH-Ar); 7,83 (t, 2H, 2CH-Ar); 8,01 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,13 (d, 2H, 2CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,30 (CH₃); 11,56 (CH₃); 27,90 (CH₂); 31,04 (CH₂); 36,66 (CH₂); 40,04 (CH₂); 40,83 (CH₂); 44,88 (CH₂); 45,64 (CH₂); 112,45 (C(4) pz); 118,23 (CTFA); 121,44-138,65 (8CH-Ar, 5C-Ar); 140,90 (C3/C5 pz); 148,91 (C3/C5 pz); 162,94 (TFA); 173,58 (C=O)

RMN ¹⁸F (CD₃OD): δ (ppm) -75,81 (TFA)

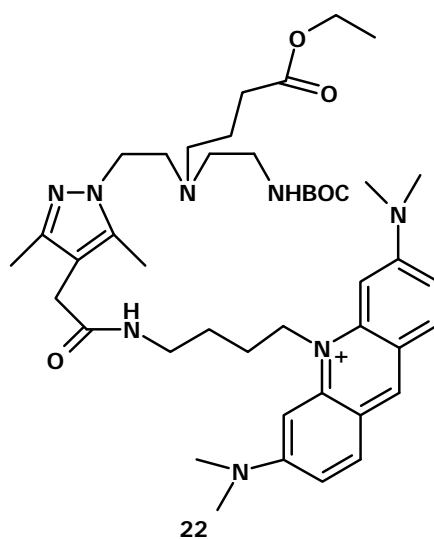
HPLC t_{ret}: 10,95 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 516,1 [M+H]⁺ (515,30)

CHN Calculado (experimental): C₂₉H₃₇N₇O₂·2(CF₃CO₂H) C 53,29 (54,48); H 5,30 (5,46); N 13,19 (14,42)

6. Parte Experimental

6.4.5. Etil-4-((2-(4-(2-(10-(4-butilamino)-3,6-bis(dimetilamino)acridinium)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)butanoato (22)



A uma solução de **18** (0,659 g, 1,578 mmol) e DIPEA (275 μ L, 1,578 mmol) em DMF seca (30 mL), mantida em agitação durante 1 h e meia, adicionou-se uma solução de **15** (0,829 g, 1,503 mmol) em DMF (20 mL). Após 3 dias à temperatura ambiente o solvente foi removido na linha de vázio e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl_3 (95–0%) / MeOH (5–90%) / NH_3 (0–10%)).

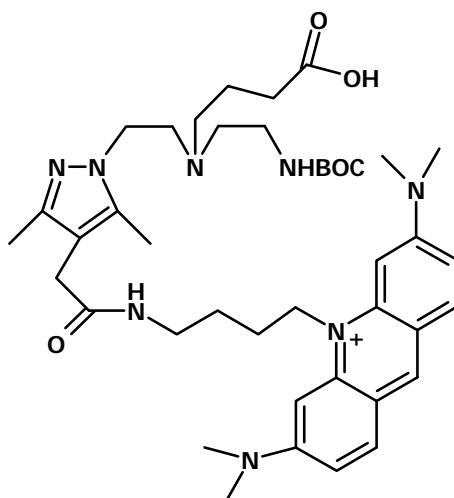
Rendimento: 0,211 g, 90 % de pó solto vermelho alaranjado.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,22 (t, 3H, CH_3); 1,41 (s, 9H, 3 CH_3 , BOC); 1,62 (m, 2H, CH_2); 1,83 (m, 2H, CH_2); 2,05 (s, 3H, CH_3); 2,17 (s, 3H, CH_3); 2,19 (t, 2H, CH_2); 2,47 (t, 2H, CH_2); 2,53 (t, 2H, CH_2); 2,75 (t, 2H, CH_2); 3,03 (t, 2H, CH_2); 3,26 (s, 12H, 4 CH_3); 3,32 (t, 2H, CH_2); 3,98 (t, 2H, CH_2); 4,09 (q, 2H, CH_2); 4,60 (t, 2H, CH_2); 6,46 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,11 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,74 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,48 (s, H, CH-Ar)

RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 9,82 (CH_3); 11,78 (CH_3); 14,61 (CH_3); 18,39 (CH_2); 23,48 (CH_2); 24,70 (CH_2); 28,34 (CH_2); 28,81 (3 CH_3 , BOC); 31,80 (CH_2); 32,30 (CH_2); 39,32 (CH_2); 40,09 (CH_2); 40,96 (4 CH_3); 54,56 (CH_2); 54,75 (CH_2); 54,86 (CH_2); 58,29 (CH_2); 61,37 (CH_2); 79,98 (C-BOC); 93,48 (2CH-Ar); 111,34 (C(4) pz); 115,29 (2CH-Ar); 118,17 (2C-Ar); 134,24 (2CH-Ar); 139,58 (C3/C5 pz); 143,63 (2C-Ar); 143,95 (CH-Ar); 147,62 (C3/C5 pz); 157,06 (2CH-Ar); 158,28 (C=O, BOC); 173,81 (C=O); 175,22 (C=O)

HPLC t_{ret} : 16,95 min(100-10 C18, 1,0 mL/min)

6.4.6. 4-((2-(4-(2-(10-(4-butilamino)-3,6-bis(dimetilamino)acridinium)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) ácido butanóico (23)



23

Uma solução de NaOH (0,090 g, 2,248 mmol) em água (2 mL) foi adicionada a uma solução de **22** (0,240 g, 0,281 mmol) em água (13 mL) e a mistura refluxou durante a noite. Após esse tempo, a mistura foi filtrada, o filtrado foi neutralizado com uma solução de HCl 3N e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Dissolveu-se o produto novamente em CH₂Cl₂ e separaram-se os sais por centrifugação. O solvente foi evaporado na linha de vazio.

Rendimento: 0,211 g, 91 % de sólido laranja.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,38 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,64 (t, 2H, CH₂); 1,81 (m, 4H, 2CH₂); 2,05 (s, 3H, CH₃); 2,15 (m, 5H, CH₃, CH₂); 2,52 (m, 4H, 2CH₂); 2,78 (t, 2H, CH₂); 3,00 (t, 2H, CH₂); 3,21 (m, 16H, 4CH₃, 2CH₂); 3,98 (t, 2H, CH₂); 4,49 (t, 2H, CH₂); 6,38 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,07 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,68 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,39 (s, H, CH-Ar)

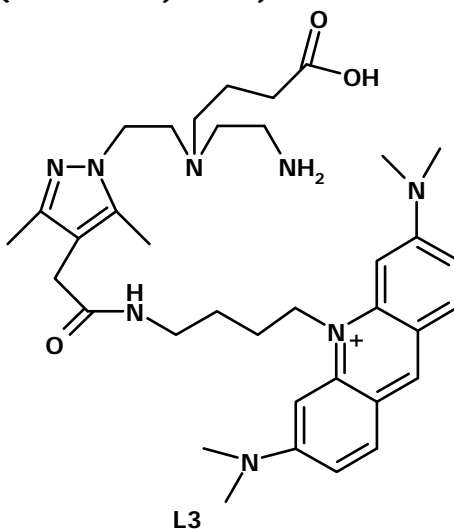
RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,91 (CH₃); 11,90 (CH₃); 24,29 (CH₂); 24,62 (CH₂); 28,34 (CH₂); 28,81 (3CH₃, BOC); 31,85 (CH₂); 35,20 (CH₂); 39,19 (CH₂); 40,00 (CH₂); 40,93 (4CH₃); 54,75 (CH₂); 54,83 (CH₂); 54,89 (CH₂); 79,86 (C-BOC); 93,34 (2CH-Ar); 111,25 (C(4) pz); 115,19 (2CH-Ar); 118,04 (2C-Ar); 134,17 (2CH-Ar); 139,57 (C3/C5 pz); 143,46 (2C-Ar); 143,81 (CH-Ar); 147,63 (C3/C5 pz); 156,92 (2CH-Ar); 159,63 (C=O, BOC); 173,80 (C=O); 180,16 (C=O)

HPLC *t*_{ret}: 16,38 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 745,3 [M]⁺ (745,48)

6. Parte Experimental

6.4.7. 4-((2-(4-(2-(10-(4-butilamino)-3,6-bis(dimetilamino)acridinium)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-aminoetil)amino) ácido butanóico (L3)



Uma solução de **23** (0,211 g, 0,255 mmol) e TFA (2 mL, 25,960 mmol) em 2 mL de CH_2Cl_2 foi deixada à temperatura ambiente durante uma noite. Após este período, o solvente foi removido em linha de vazio e o produto sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: MeOH (100–0%) / NH_3 (0–100%)). O solvente das fracções correspondentes ao produto foi evaporado na linha de vazio e obteve-se um sólido de cor alaranjada.

Rendimento: **L3**(CF_3CO_2)·4 TFA (0,095 g, 0,078 mmol), 31 % de sólido vermelho alaranjado.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,58 (t, 2H, CH_2); 1,80 (m, 4H, 2 CH_2); 1,97 (t, 2H, CH_2); 2,05 (s, 3H, CH_3); 2,15 (s, 3H, CH_3); 2,44 (t, 2H, CH_2); 2,69 (m, 4H, 2 CH_2); 2,90 (t, 2H, CH_2); 3,25 (m, 16H, 4 CH_3 , 2 CH_2); 4,02 (t, 2H, CH_2); 4,54 (t, 2H, CH_2); 6,46 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,14 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,77 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,49 (s, H, CH-Ar)

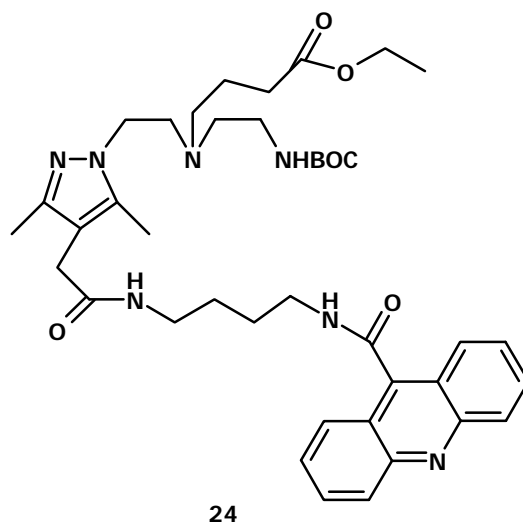
RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 9,74 (CH_3); 11,82 (CH_3); 24,70 (CH_2); 24,95 (CH_2); 28,33 (CH_2); 31,73 (CH_2); 36,44 (CH_2); 38,73 (CH_2); 40,09 (CH_2); 40,89 (4 CH_3); 47,75 (CH_2); 48,09 (CH_2); 52,65 (CH_2); 54,26 (CH_2); 54,63 (CH_2); 93,46 (2CH-Ar); 111,61 (C(4) pz); 115,33 (2CH-Ar); 118,26 (2C-Ar); 134,35 (2CH-Ar); 139,36 (C3/C5 pz); 143,69 (2C-Ar); 144,10 (CH-Ar); 147,44 (C3/C5 pz); 157,12 (2CH-Ar); 161,42 (C_{TFA}); 173,95 (C=O); 182,29 (C=O)

HPLC t_{ret} : 14,72 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 645,2 [M] $^+$ (646,43)

CNH Calculado (experimental): $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_5 \cdot 4(\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})$ C 45,49 (45,24); H 4,74 (4,75); N 9,23 (8,96)

6.4.8. Etil-4-((2-(4-(2-(4-(acridina-9-carboxamido)butilamino)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) butanoato (24)



A uma solução de **19** (0,029 g, 0,100 mmol) e DIPEA (18 μ L, 0,100 mmol) em DMF seca (10 mL) adicionou-se uma solução de **15** (0,052 g, 0,095 mmol) em DMF (5 mL). Após 48 h à temperatura ambiente o solvente foi removido na linha de vácuo e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl_3 (95–73%) / MeOH (5–25%) / NH_3 (0–2%)).

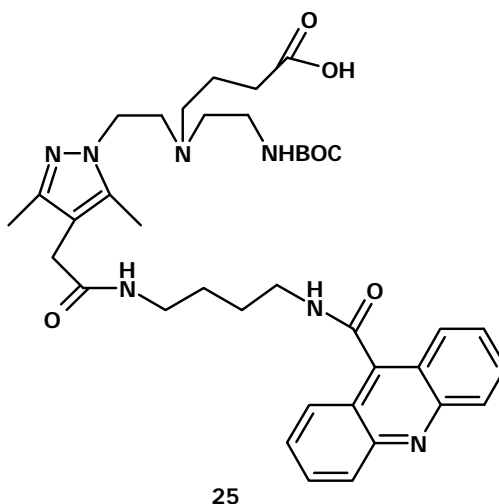
Rendimento: 0,022 g, 32 % de óleo amarelo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,22 (m, 3H, CH_3); 1,31 (s, 9H, 3 CH_3 (BOC)); 1,53 (m, 4H, 2 CH_2); 1,71 (m, 4H, 2 CH_2); 2,08 (m, 8H, 2 CH_3 , CH_2); 2,35 (t, 2H, CH_2); 2,67 (m, 2H, CH_2); 2,78 (m, 2H, CH_2); 3,19 (m, 4H, 2 CH_2); 3,62 (m, 2H, CH_2); 3,90 (m, 2H, CH_2); 4,08 (m, 2H, CH_2); 5,23 (s br, 1H, NH); 5,81 (s br, 1H, NH); 7,44 (t, 2H, 2CH-Ar); 7,68 (t, 2H, 2CH-Ar); 7,91 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,12 (d, 2H, 2CH-Ar)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 9,58 (CH_3); 11,68 (CH_3); 14,03 (CH_3); 22,24 (CH_2); 22,58 (CH_2); 26,78 (CH_2); 27,19 (CH_2); 28,33 (6 CH_3 (BOC)); 31,39 (CH_2); 31,57 (CH_2); 38,40 (CH_2); 38,96 (CH_2); 39,62 (CH_2); 47,43 (CH_2); 53,58 (CH_2); 60,31 (CH_2); 60,54 (CH_2); 79,09 (C-BOC); 109,51 (C(4) pz); 122,19 (2C-Ar); 125,22 (2CH-Ar); 126,72 (2CH-Ar); 129,54 (2CH-Ar); 130,33 (2CH-Ar); 137,30 (C3/C5 pz); 141,21 (C-Ar); 146,54 (C3/C5 pz); 148,49 (2C-Ar); 156,13 (C=O, BOC); 167,13 (C=O); 171,06 (C=O); 173,58 (C=O)

6. Parte Experimental

6.4.9. 4-((2-(4-(2-(4-(acridina-9-carboxamido)butilamino)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) ácido butanóico (25)



Uma solução de NaOH (0,012 g, 0,300 mmol) em água (5 mL) foi adicionada a uma solução de **24** (0,022 g, 0,030 mmol) em THF (10 mL) e a mistura refluxou durante a noite. Após esse tempo neutralizou-se com uma solução de HCl 2N e evaporou-se o solvente na linha de vazio. Fez-se a extracção do resíduo seco com MeOH e eliminaram-se os sais após purificação através de uma pequena coluna SEP-PAK C18. O produto obtido foi então purificado por HPLC (eluente: TFA 0,1 % / CH₃CN).

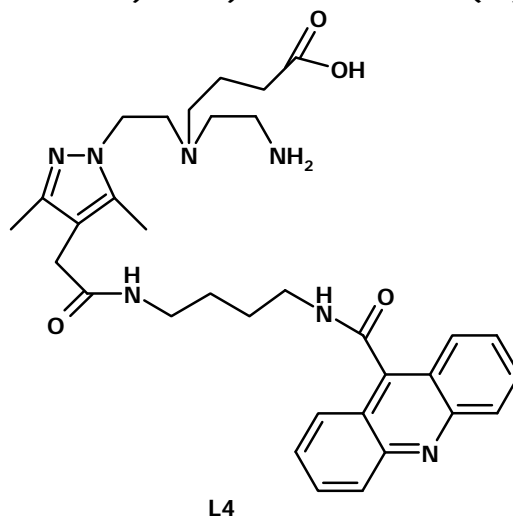
Rendimento: 0,011 g, 50 % de óleo amarelo.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,40 (s, 9H, 3CH₃ (BOC)); 1,72 (m, 4H, 2CH₂); 1,80 (m, 4H, 2CH₂); 1,98 (m, 4H, 2CH₂); 2,20 (s, 3H, CH₃); 2,26 (s, 3H, CH₃); 2,44 (t, 2H, CH₂); 3,32 (s, 2H, CH₂); 3,41 (t, 2H, CH₂); 3,66 (m, 4H, 2CH₂); 4,37 (t, 2H, CH₂); 7,88 – 8,34 (m, 8H, 8CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,44 (CH₃); 12,14 (CH₃); 19,89 (CH₂); 27,86 (CH₂); 28,17 (CH₂); 28,61 (6CH₃ (BOC)); 31,10 (CH₂); 31,37 (CH₂); 35,98 (CH₂); 40,22 (CH₂); 40,92 (CH₂); 42,71 (CH₂); 49,00 (CH₂); 53,69 (CH₂); 54,55 (CH₂); 81,24 (C-BOC); 112,42 (C(4) pz); 123,87 (2C-Ar); 125,30 (2CH-Ar); 127,44 (2CH-Ar); 129,32 (2CH-Ar); 135,78 (2CH-Ar); 137,86 (C3/C5 pz); 140,39 (C-Ar); 145,30 (C3/C5 pz); 149,25 (2C-Ar); 157,61 (C=O, BOC); 167,49 (C=O); 173,61 (C=O); 175,73 (C=O)

HPLC t_{ret}: 15,57 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

6.4.10. 4((2-(4-(2-(4-(acridina-9-carboxamido)butilamino)-2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazoo)etil) (2-aminoetil)amino) ácido butanóico (L4)



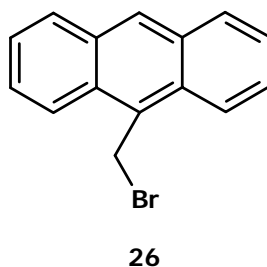
Uma solução de **25** (0,011 g, 0,0149 mmol) e TFA (2 mL, 25,960 mmol) em 2 mL de CH_2Cl_2 foi deixada à temperatura ambiente durante a noite. Após este período o solvente foi removido a pressão reduzida e obteve-se um óleo de cor amarela.

Rendimento: **L4·17 TFA** (0,020 g, 0,008 mmol), 54% de óleo amarelo.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,71 (m, 4H, 2CH_2); 1,82 (m, 2H, CH_2); 2,17 (m, 5H, CH_3 , CH_2); 2,46 (s, 3H, CH_3); 2,65 (t, 2H, CH_2); 2,85 (t, 2H, CH_2); 2,99 (m, 6H, 3CH_2); 3,25 (s, 2H, CH_2); 3,68 (t, 2H, CH_2); 4,13 (t, 2H, CH_2); 7,82 – 8,32 (m, 8H, 8CH-Ar)

CHN Calculado (experimental): $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_4 \cdot 17(\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})$ C 31,68 (33,88); H 2,38 (4,29); N 3,86 (3,85)

6.4.11. 9-bromometilantraceno (**26**)¹⁷⁸



A uma suspensão de PPh_3 (6,297 g, 24,008 mmol) em CH_3CN seco (130 mL) adicionou-se lentamente bromo líquido (3,837 g, 24,008 mmol) até que a solução apresentasse uma cor ligeiramente alaranjada. De seguida, adicionou-se lentamente o 9-hidroximetilantraceno (5 g,

6. Parte Experimental

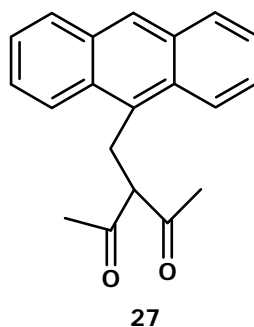
24,880 mmol) na forma sólida. A solução ficou amarela com formação de um precipitado amarelo. A mistura reaccional reagiu 2 h à temperatura ambiente e ficou no frio durante a noite. Após esse tempo, a mistura foi filtrada e o sólido obtido foi seco na linha de vazio.

Rendimento: 6,460 g, 99 % de sólido amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 5,52 (s, 2H, CH₂-Ar); 7,48–7,57 (m, 2H, 2CH-Ar); 7,60–7,74 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,00–8,03 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,26–8,30 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,47 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 26,95 (CH₂-Ar); 123,45 (C-Ar); 125,33 (2C-Ar); 126,75 (2CH-Ar); 127,80 (2CH-Ar); 129,05 (2CH-Ar); 129,66 (2CH-Ar); 131,53 (2C-Ar); 132,60 (CH-Ar)

6.4.12. (antraceno-9-ilmetil)pentano-2,4-diona (**27**)³⁴



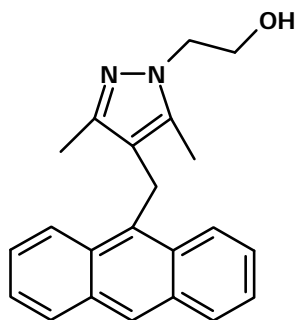
Fez-se a adição a 0°C de 2,4-pentanodiona (2,6 mL, 24,929 mmol) a uma suspensão de NaH (0,718 g, 29,915 mmol) em THF seco (80 mL). A mistura reaccional reagiu durante 2 h à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, adicionou-se **26** (6,760 g, 24,929 mmol) a 0°C e deixou-se a mistura reaccional a essa temperatura, por mais 40 min, e durante a noite à temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se 25 mL de uma solução de HCl 1N e extraiu-se com Et₂O. A fase orgânica foi recolhida, seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (100-95%) / (MeOH (0-5%))).

Rendimento: 3,447 g, 48 % de sólido amarelo.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,94 (s, 6H, 2CH₃); 4,08 (m, 2H, CH₂-Ar); 4,21 (m, 1H, CH-((OCH₃)₂)); 7,39–7,52 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,97–8,00 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,12–8,21 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,36 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 26,28 (CH); 30,54 (CH_3); 30,59 (CH_3); 68,25 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); 123,44 (C-Ar); 124,83 (2C-Ar); 125,11 (2CH-Ar); 126,13 (2CH-Ar); 128,81 (2CH-Ar); 129,73 (2CH-Ar); 130,17 (2C-Ar); 131,45 (CH-Ar); 204,07 (2C=O)

6.4.13. 2-(4-(antraceno-9-ilmetil)3,5-dimetilpirazolo) etanol (**28**)³⁴



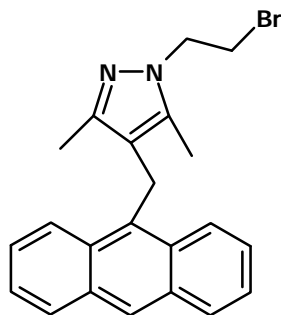
28

A uma solução de **27** (3,447 g, 11,870 mmol) em 60 mL de uma mistura $\text{CHCl}_3\text{:EtOH}$ (1:1) a 0°C foi adicionada, gota a gota, uma solução de 2-hidroxiethylhidrazina (0,8 mL, 11,870 mmol) em EtOH (60 mL). Após 4 h de reacção à temperatura ambiente, evaporou-se o solvente.

Rendimento: 3,003 g, 77 % de sólido amarelo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,57 (s, 3H, CH_3); 1,87 (s, 3H, CH_3); 3,87 (m, 4H, 2CH_2); 4,66 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 7,41–7,46 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,98–8,01 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,12–8,15 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,38 (s, 1H, CH-Ar)

6.4.14. 4-(antraceno-9-ilmetil)-1-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (**29**)³⁴



29

A uma solução de **28** (3,003 g, 9,088 mmol) em tolueno (50 mL) adicionou-se PBr_3 (1,7 mL, 4,920 mmol) e a mistura ficou em refluxo durante a noite. Findo esse tempo evaporou-se o

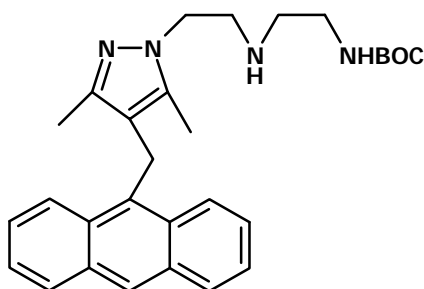
6. Parte Experimental

solvente e foi feita uma extracção com uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 e CHCl_3 . A fase orgânica foi recolhida, seca com MgSO_4 anidro, filtrada e evaporada.

Rendimento: 3,157 g, 88 % de sólido amarelo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,62 (s, 3H, CH_3); 1,87 (s, 3H, CH_3); 3,56 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-pz}$); 4,21 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$); 4,67 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 7,41–7,46 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,97–8,01 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,13–8,16 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,39 (s, 1H, CH-Ar)

6.4.15. *tert*-butil-2-(2-(4-(antraceno-9-ilmetil)-3,5-dimetilpirazolo)etilamino)etilcarbamato (30)³⁴



30

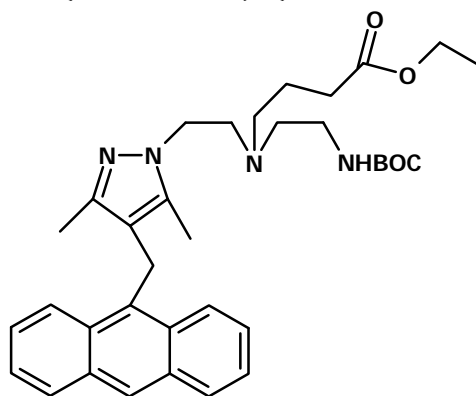
O composto **29** (3,157 g, 8,025 mmol) foi dissolvido em CH_3CN seco. Foi preparada uma solução de **4** (2,571 g, 16,050 mmol), K_2CO_3 (2,218 g, 16,050 mmol) e KI (0,067 g, 0,401 mmol) em CH_3CN seco (50 mL). Fez-se a adição de **29** a esta mistura, gota a gota, e ficou em refluxo durante a noite. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada e o sobrenadante seco a pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl_3 (100-70 %) / MeOH (0-30 %)).

Rendimento: 2,729 g, 72 % de sólido castanho amarelado.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 1,40 (s, 9H, 3 CH_3 , BOC); 1,51 (s, 3H, CH_3); 1,86 (s, 3H, CH_3); 2,58 (t, 2H, CH_2); 2,82 (t, 2H, CH_2); 3,08 (m, 2H, CH_2); 3,86 (t, 2H, CH_2); 4,54 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 5,21 (s br, 1H, NH); 7,36–7,38 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,91–7,93 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,06–8,08 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,30 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 8,86 (CH_3); 12,00 (CH_3); 22,77 (CH_2); 27,97 (3 CH_3 , BOC); 39,49 (CH_2); 47,46 (CH_2); 48,01 (CH_2); 48,05 (CH_2); 78,33 (C-BOC); 113,88 (C(4) pz); 124,12 (C-Ar); 124,34 (2C-Ar); 125,13 2CH-Ar); 125,34 (C3/C5 pz); 125,83 (2CH-Ar); 128,63 (2CH-Ar); 129,87 (2CH-Ar); 130,87 (2C-Ar); 131,11 (CH-Ar); 145,25 (C3/C5 pz); 155,63 (C=O, BOC)

6.4.16. Etil-4-((2-(4-(antraceno-9-ilmetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) butanoato (31)



31

O composto **30** (2,729 g, 5,773 mmol) foi dissolvido em CH₃CN seco (60 mL). A esta solução foram adicionados K₂CO₃ (1,596 g, 11,546 mmol) e KI (0,048 g, 0,289 mmol). Adicionou-se 4-bromobutirato de etilo (1,7 ml, 11,546 mmol), gota a gota, dissolvido em CH₃CN seco (16 mL). Deixou-se a mistura em refluxo durante a noite. Após esse tempo, filtrou-se a suspensão e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (100 – 50 %) / MeOH (0 – 50%)).

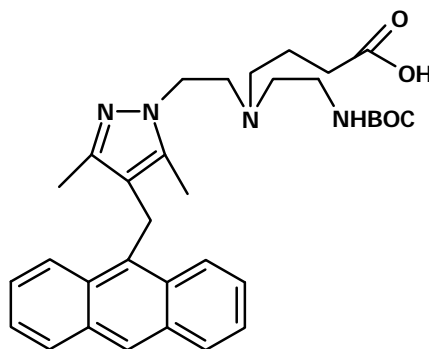
Rendimento: 1,467 g, 43 % de óleo castanho amarelado.

RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,39 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,40 (t, 3H, CH₃); 1,51 (s, 3H, CH₃); 1,86 (s, 3H, CH₃); 2,04 (t, 2H, CH₂); 2,29 (t, 2H, CH₂); 2,38 (t, 2H, CH₂); 2,55 (t, 2H, CH₂); 2,97 (m, 2H, CH₂); 3,80 (t, 2H, CH₂); 4,03 (q, 2H, CH₂); 4,54 (s, 2H, CH₂-Ar); 5,48 (s br, 1H, NH); 7,32–7,38 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,88–7,91 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,07–8,10 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,27 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,12 (CH₃); 12,02 (CH₃); 13,95 (CH₃); 22,11 (CH₂); 23,10 (CH₂); 28,20 (3CH₃, BOC); 31,04 (CH₂); 38,24 (CH₂); 46,44 (CH₂); 52,90 (CH₂); 53,17 (CH₂); 59,85 (CH₂); 68,06 (CH₂); 78,43 (C-BOC); 113,99 (C(4) pz); 124,39 (C-Ar); 124,55 (2C-Ar); 125,34 (2CH-Ar); 125,99 (2CH-Ar); 128,80 (2CH-Ar); 130,16 (2CH-Ar); 131,09 (2C-Ar); 131,36 (CH-Ar); 135,15 (C3/C5 pz); 145,17 (C3/C5 pz); 155,91 (C=O, BOC); 173,25 (C=O)

6. Parte Experimental

6.4.17. 4-((2-(4-(antraceno-9-ilmetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil) (2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino) ácido butanóico (32)



32

Uma solução de NaOH (1 g, 24,99 mmol) em água (10 mL) foi adicionada a uma solução de **31** (1,467 g, 2,499 mmol) em THF (30 mL) e a mistura refluxou durante a noite. Após esse tempo, neutralizou-se com uma solução de HCl 1N e evaporou-se o solvente. Fez-se extracção do resíduo seco com CHCl₃ e, depois de evaporado o solvente, foram removidos os sais por lavagens sucessivas com MeOH seco e precipitação no frio.

Rendimento: 1,228 g, 88 % de sólido castanho amarelado.

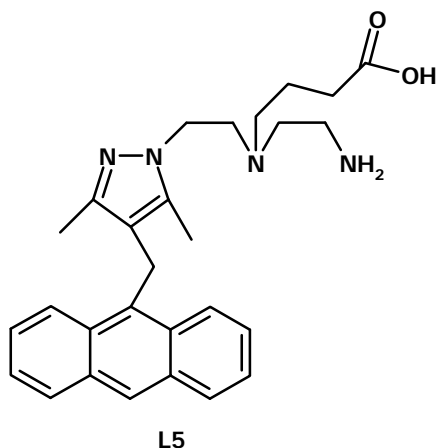
RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 1,38 (s, 9H, 3CH₃, BOC); 1,53 (m, 5H, CH₃, CH₂); 1,86 (s, 3H, CH₃); 2,16 (m, 2H, CH₂); 2,37 (m, 2H, CH₂); 2,59 (m, 2H, CH₂); 2,93 (m, 2H, CH₂); 3,87 (m, 2H, CH₂); 4,61 (s, 2H, CH₂-Ar); 5,11 (s br, 1H, NH); 7,39–7,42 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,94–7,97 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,09–8,11 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,37 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 9,31 (CH₃); 12,11 (CH₃); 22,44 (CH₂); 23,28 (CH₂); 28,38 (3CH₃, BOC); 32,84 (CH₂); 38,26 (CH₂); 46,67 (CH₂); 53,14 (CH₂); 78,87 (C-BOC); 114,38 (C(4) pz); 125,63 (C-Ar); 125,92 (2C-Ar); 126,76 (2CH-Ar); 127,47 (2CH-Ar); 130,24 (2CH-Ar); 131,66 (2CH-Ar); 132,59 (2C-Ar); 132,84 (CH-Ar); 135,64 (C3/C5 pz); 145,41 (C3/C5 pz); 155,11 (C=O, BOC); 178,31 (C=O)

HPLC *t*_{ret}: 18,95 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 581,1 [M+Na]⁺ (581,31); 559,1 [M+H]⁺ (559,33)

6.4.18. 4-((2-aminoetil) (2-(4-(antraceno-9-ilmetil)-3,5-dimetilpirazolo)etil)amino) ácido butanóico (L5)



Uma solução de **32** (0,866 g, 1,550 mmol) e TFA (2 mL, 25,960 mmol) em 2 mL de CH₂Cl₂ foi deixada durante a noite à temperatura ambiente. Após esse tempo o solvente foi removido e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl₃ (50–0%) / MeOH (50–100%)).

Rendimento: **L5·7TFA** (0,782 g, 0,622 mmol), 40 % de óleo castanho amarelado.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,51 (t, 2H, CH₂); 1,63 (s, 3H, CH₃); 1,69 (s, 3H, CH₃); 1,86 (t, 2H, CH₂); 2,31 (t, 2H, CH₂); 2,59 (m, 4H, 2CH₂); 2,88 (t, 2H, CH₂); 3,89 (t, 2H, CH₂); 4,51 (s, 2H, CH₂-Ar); 7,39 (m, 4H, 4CH-Ar); 7,96 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,07 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,33 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,38 (CH₃); 12,22 (CH₃); 23,60 (CH₂); 23,79 (CH₂); 32,07 (CH₂); 38,99 (CH₂); 47,37 (CH₂); 52,18 (CH₂); 53,85 (CH₂); 54,12 (CH₂); 116,32 (C(4) pz); 118,26 (C_{TFA}); 125,64 (C-Ar); 125,94 (2C-Ar); 126,78 (2CH-Ar); 127,49 (2CH-Ar); 127,84 (2CH-Ar); 130,27 (2CH-Ar); 131,66 (2C-Ar); 132,59 (CH-Ar); 137,46 (C3/C5 pz); 146,40 (C3/C5 pz); 162,93 (C_{TFA}); 178,04 (C=O)

RMN ¹⁸F (CD₃OD): δ (ppm) -75,34 (TFA)

HPLC t_{ret}: 15,96 min(100-10 C18, 1,0 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 459,2 [M+H]⁺ (459,28)

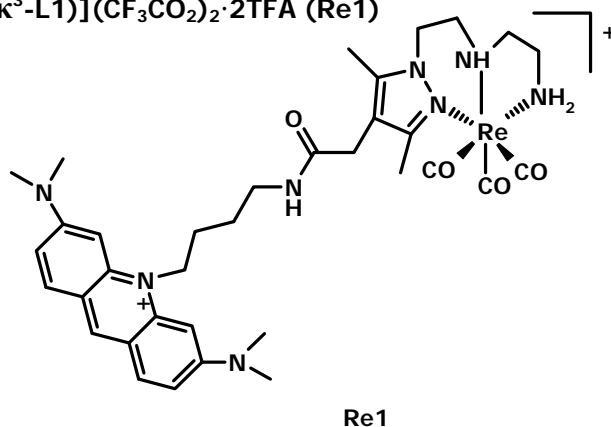
CHN Calculado (experimental): C₂₈H₃₄N₄O₂·7(CF₃CO₂H) C 40,14 (39,07); H 2,71 (2,77); N 4,46 (4,67)

6.5. Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora

O precursor $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$ foi preparado segundo um método publicado na literatura e foi usado sem purificação adicional.¹⁷⁹ A caracterização foi realizada por HPLC e IV.

Os complexos de rénio foram obtidos fazendo reagir o complexo $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$ com os respectivos ligandos na razão molar 1:1. Após refluxo durante uma noite, em MeOH ou água, o solvente foi evaporado em vazio originando os complexos cuja caracterização se apresenta.

6.5.1. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\kappa^3\text{-L1})](\text{CF}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{TFA}$ (Re1)



Após refluxo em MeOH durante a noite, o solvente foi evaporado e o produto sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: CHCl_3 (80–37%) / MeOH (20–45%) / NH_3 (0–18%)). O solvente das fracções que correspondiam ao produto foi evaporado na linha de vazio obtendo-se um sólido vermelho alaranjado.

Rendimento: 90 mg (0,070 mmol), 68%.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,84 (m, 2H, CH_2); 2,04 (m, 2H, CH_2); 2,25 (s, 3H, CH_3); 2,32 (s, 3H, CH_3); 2,54 (m, 3H, 3CH); 2,84 (m, 3H, 3CH); 3,33 (s, 12H, 4 CH_3); 3,38 (s, 2H, CH_2); 3,52 (m, 1H, 1CH); 3,86 (s br, 1H, 1NH); 4,09 (t, 1H, 1CH); 4,50 (d, 1H, 1CH); 4,77 (t, 2H, CH_2); 5,41 (s br, 1H, 1NH); 6,71 (s, 2H, 2CH-Ar); 6,91 (s br, 1H, 1NH); 7,29 (d, 2H, 2CH-Ar); 7,93 (d, 2H, 2CH-Ar); 8,68 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 10,38 (CH_3); 14,57 (CH_3); 24,89 (CH_2); 28,27 (CH_2); 31,30 (CH_2); 40,95 (4CH_3); 43,22 (CH_2); 48,72 (3CH_2); 55,86 (CH_2); 93,62 (2CH-Ar); 113,98 ($\text{C}(4)$ pz); 115,52 (2CH-Ar); 118,47 (2C-Ar); 134,37 (2CH-Ar); 143,72 ($\text{C}3/\text{C}5$ pz); 143,97 (CH-Ar); 144,29 (2C-Ar); 153,46 ($\text{C}3/\text{C}5$ pz); 157,30 (2C-Ar); 162,93 (C_{TFA}); 172,91 ($\text{C}=\text{O}$); 194,14-194,71 (3CO)

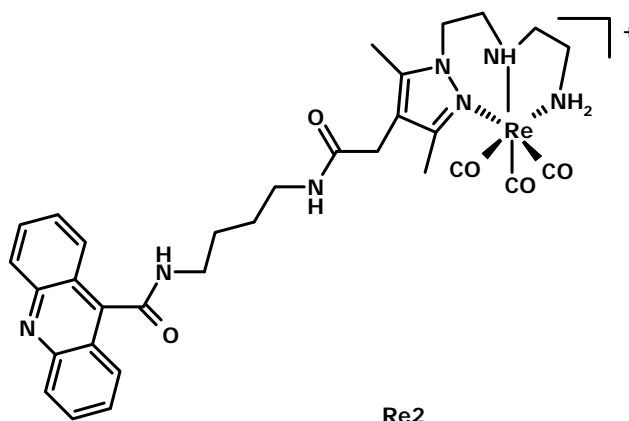
HPLC t_{ret} : 17,69 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

IV (KBr , cm^{-1}): 1890,4 (ν CO); 2024 (ν CO)

ESI/MS (m/z) (calculado): 414,9 [M] $^{2+}$ (415,16)

CHN Calculado (experimental): $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_8\text{Re}_1 \cdot 2(\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})$ C 40,22 (40,77); H 3,85 (3,17); N 8,73 (9,31)

6.5.2. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\kappa^3\text{-L}2)](\text{CF}_3\text{CO}_2) \cdot 2\text{TFA}$ (Re2)



Após refluxo em MeOH durante a noite, o solvente foi evaporado em vazio, e obteve-se um sólido de cor amarela.

Rendimento: 49 mg (0,043 mmol), 89%.

RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 1,75 (m, 2H, CH_2); 1,81 (m, 2H, CH_2); 2,32 (s, 3H, CH_3); 2,41 (s, 3H, CH_3); 2,51 (m, 1H, 1CH); 2,62 (m, 1H, 1CH); 2,81 (m, 3H, 3CH); 3,43 (m, 3H, CH, CH_2); 3,67 (m, 2H, CH_2); 3,90 (s br, 1H, NH); 4,08 (t, 1H, 1CH); 4,50 (d, 1H, 1CH); 5,39 (s br, 1H, NH); 6,88 (s br, 1H, NH); 7,78 (t, 2H, 2CH-Ar); 8,05 (t, 2H, 2CH-Ar); 8,14 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,26 (d, 2H, 2CH-Ar)

RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 10,45 (CH_3); 14,58 (CH_3); 27,83 (CH_2); 28,04 (CH_2); 31,34 (CH_2); 40,25 (CH_2); 40,89 (CH_2); 43,26 (CH_2); 55,86 (CH_2); 114,16 ($\text{C}(4)$ pz); 118,00 (C_{TFA}); 123,78

6. Parte Experimental

(2C-Ar); 126,62 (2C-Ar); 127,18 (2CH-Ar); 129,00 (2CH-Ar); 134,77 (2CH-Ar); 143,75 (C3/C5 pz); 146,77 (2C-Ar); 147,63 (C-Ar); 153,52 (C3/C5 pz); 162,50 (C_{TFA}); 167,96 (C=O); 172,89 (C=O); 194,14-194,63 (3CO)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) -75,87 (TFA)

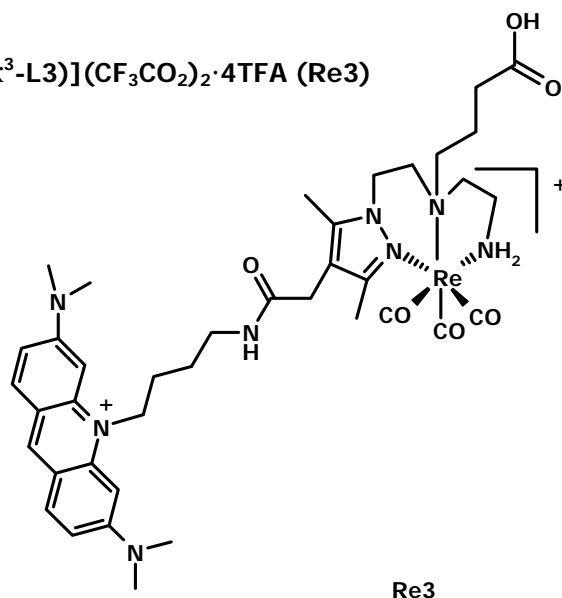
HPLC t_{ret}: 15,06 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

IV (KBr, cm⁻¹): 1922,1 (ν CO); 2024,4 (ν CO)

ESI/MS (m/z) (calculado): 786,0 [M]⁺ (786,24); 393,4 [M+H]²⁺ (393,62)

CHN Calculado (experimental): C₃₄H₃₇N₇O₇F₃Re_{1.2}(CF₃CO₂H) C 38,36 (38,04); H 3,49 (2,70); N 8,70 (8,83)

6.5.3. *fac*-[Re(CO)₃(κ³-L3)](CF₃CO₂)₂·4TFA (Re3)



Após refluxo em água durante uma noite, o solvente foi evaporado na linha de vazio e o resíduo sólido obtido foi extraído com MeOH. Após evaporação do solvente o sólido foi purificado por HPLC (eluente: A - TFA 0,1 %, B - CH₃CN). O solvente das fracções correspondentes ao produto foi evaporado em vazio e obteve-se um sólido vermelho alaranjado.

Rendimento: 34 mg (0,021 mmol), 56%.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,88 (m, 6H, 3CH₂); 2,27 (s, 3H, CH₃); 2,34 (s, 3H, CH₃); 2,43 (t, 2H, CH₂); 2,65 (m, 2H, 2CH); 2,77 (m, 1H, CH); 2,88 (m, 2H, 2CH); 3,28 (m, 14H, 4CH₃, CH₂); 3,40 (s, 2H, CH₂); 3,51 (m, 2H, CH₂); 3,68 (m, 1H, CH); 4,00 (s br, 1H, NH); 4,21 (m, 1H, CH);

4,51 (m, 1H, CH); 4,61 (t, 2H, CH₂); 5,50 (s br, 1H, NH); 6,51 (s, 2H, 2CH-Ar); 7,14 (dd, 2H, 2CH-Ar); 7,77 (dd, 2H, 2CH-Ar); 8,51 (s, H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 10,51 (CH₃); 14,59 (CH₃); 20,54 (CH₂); 24,84 (CH₂); 28,23 (CH₂); 31,17 (CH₂); 31,51 (CH₂); 40,34 (CH₂); 40,86 (4CH₃); 43,56 (CH₂); 48,08 (CH₂); 49,00 (CH₂); 53,75 (CH₂); 62,42 (CH₂); 66,97 (CH₂); 93,61 (2CH-Ar); 114,22 (C(4) pz); 115,35 (2CH-Ar); 118,47 (2C-Ar); 134,23 (2CH-Ar); 143,68 (C3/C5 pz); 144,00 (CH-Ar); 144,26 (2C-Ar); 153,91 (C3/C5 pz); 157,35 (2C-Ar); 162,23 (TFA); 172,82 (C=O); 176,12 (C=O); 193,83-195,02 (3CO)

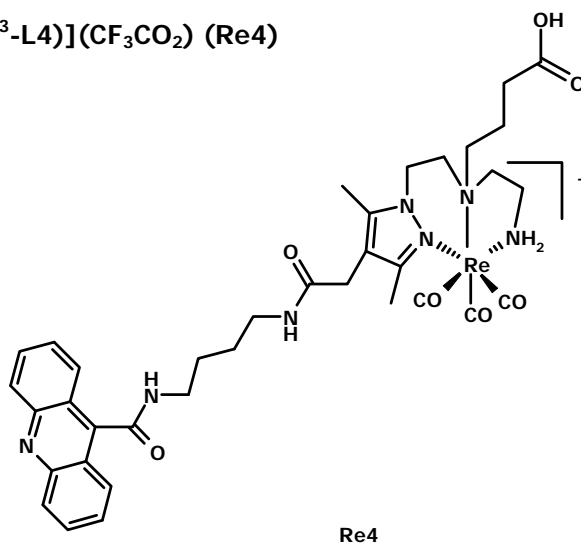
HPLC t_{ret} : 16,50 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

IV (KBr, cm⁻¹): 1896,1 (v CO); 2026,0 (v CO)

ESI/MS (m/z) (calculado): 458,00 [M]²⁺ (458,18)

CNH Calculado (experimental): C₄₃H₅₃N₈O₁₀F₆Re₁·4(CF₃CO₂H) C 38,32 (38,37); H 3,60 (3,68); N 7,01 (7,73)

6.5.4. *fac*-[Re(CO)₃(κ³-L4)](CF₃CO₂) (Re4)



Após refluxo em água durante a noite, o solvente foi evaporado e o resíduo sólido obtido foi purificado por HPLC (eluente: A - TFA 0,1%, B - CH₃CN). O solvente das fracções correspondentes ao produto foi evaporado na linha de vazio e obteve-se um sólido amarelado.

Rendimento: 4,4 mg (0,0044 mmol), 27%.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,82 (m, 4H, 2CH₂); 2,00 (m, 1H, CH); 2,11 (m, 1H, CH); 2,34 (s, 3H, CH₃); 2,42 (s, 3H, CH₃); 2,78 (m, 1H, CH); 3,06 (m, 1H, CH); 3,43 (s, 2H, CH₂); 3,53 (m, 1H, CH); 3,68 (m, 2H, CH₂); 4,07 (s br, 1H, NH); 4,19 (m, 1H, CH); 4,50 (m, 1H, CH); 5,48 (s br,

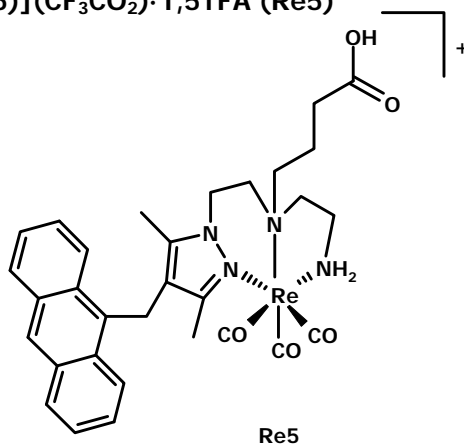
6. Parte Experimental

1H, NH); 7,782 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,04 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,14 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,27 (m, 2H, 2CH-Ar)

HPLC t_{ret} : 15,08 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

ESI/MS (m/z) (calculado): 872,2 [M]⁺ (872,28); 436,5 [M+H]²⁺ (436,64)

6.5.5. *fac*-[Re(CO)₃(κ³-L5)](CF₃CO₂)-1,5TFA (Re5)



Após refluxo em água durante a noite, o complexo desejado precipitou e foi separado do sobrenadante por filtração. O sólido obtido foi então seco *in vacuo* originando um sólido castanho amarelado

Rendimento: 0,241 g (0,237 mmol), 100%.

RMN ¹H (CD₃OD): δ (ppm) 1,69 (s, 3H, CH₃); 1,97 (m, 2H, CH₂); 2,10 (m, 1H, CH); 2,20 (s, 3H, CH₃); 2,39 (t, 2H, CH₂); 2,58 (m, 1H, CH); 2,83 (m, 2H, 2CH); 3,14 (m, 1H, CH); 3,46 (m, 2H, CH₂); 3,63 (m, 1H, CH); 4,03 (s br, 1H, NH); 4,14 (m, 1H, CH); 4,40 (m, 1H, CH); 4,80 (s, 2H, CH₂); 5,50 (s br, 1H, NH); 7,49 (m, 4H, 4CH-Ar); 8,07 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,16 (m, 2H, 2CH-Ar); 8,50 (s, 1H, CH-Ar)

RMN ¹³C (CD₃OD): δ (ppm) 9,96 (CH₃); 15,01 (CH₃); 20,42 (CH₂); 24,08 (CH₂); 31,50 (CH₂); 43,69 (CH₂); 48,02 (CH₂); 53,78 (CH₂); 62,25 (CH₂); 67,02 (CH₂); 118,26 (C_{TFA}); 118,47 (C(4) pz); 125,33 (C-Ar); 126,16 (2CH-Ar); 127,32 (2CH-Ar); 128,18 (2CH-Ar); 130,48 (2CH-Ar); 131,08 (2CH-Ar); 131,85 (2C-Ar); 132,99 (CH-Ar); 142,57 (C3/C5 pz); 153,14 (C3/C5 pz); 162,93 (C_{TFA}); 176,14 (C=O); 193,71-194,94 (3CO)

HPLC t_{ret} : 18,93 min(100-10 C18, 1,0 mL/min)

IV (KBr, cm⁻¹): 1930,0 (ν CO); 2029,3 (ν CO)

ESI/MS (m/z) (calculado): 729,1 [M]⁺ (729,21)

CHN Calculado (experimental): C₃₃H₃₄N₄O₇F₃Re₁·1,5(CF₃CO₂H) C42,64 (41,55); H 3,64 (3,12);

N 5,53 (5,55)

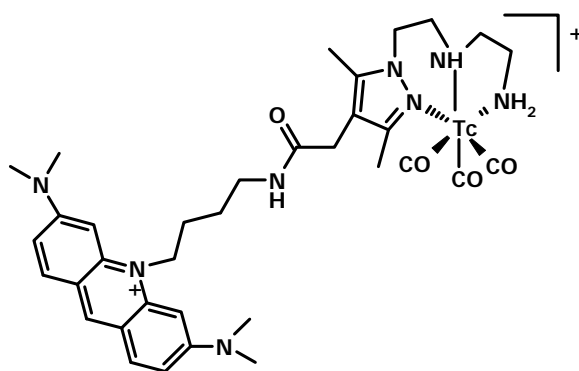
6.6. Complexos de Tecnécio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora

As manipulações das substâncias radioactivas foram efectuadas em condições de segurança radiológica. Todas as reacções foram realizadas numa hotte com extracção, utilizando luvas de protecção e barreiras de chumbo com visor de vidro impregnado de sais de chumbo. Os frascos que continham os produtos radioactivos foram sempre manuseados dentro de contentores de chumbo, com espessura adequada à actividade manipulada. A exposição à dose de radiação foi monitorizada por leitura de dosímetro individual de mão e peito.

O pertecnetato de sódio (Na[^{99m}TcO₄]) foi obtido por eluição de um gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc com uma solução NaCl 0,9% e foi utilizado para sintetizar o produto de partida *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺, tal como descrito na literatura.⁴¹

Num frasco de vidro selado, em atmosfera de N₂, foram introduzidos 100 µl de uma solução de ligando, em água ou EtOH, e 900 µl de uma solução de *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ em NaCl 0,9%. A mistura reagiu a 100°C durante 30 a 40 min e, após arrefecimento, foi analisada por HPLC.

6.6.1. *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(κ³-L1)]²⁺ (Tc1)



Tc1

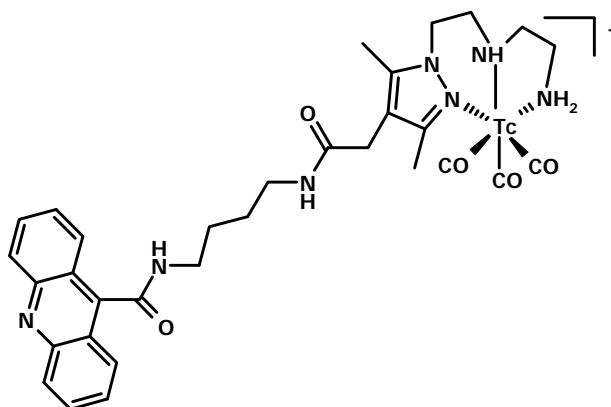
Condições reaccionais: $t_{\text{reacção}} = 40 \text{ min}$; $T = 100^\circ\text{C}$; Solvente: água; $[L1] = 3,3 \times 10^{-5} \text{ M}$

6. Parte Experimental

HPLC t_{ret} : 17,92 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

$\log(P_{O/W})$: = 0,56 \pm 0,02

6.6.2. *fac*-[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{K}^3\text{-L2})$] $^+$ (Tc2)



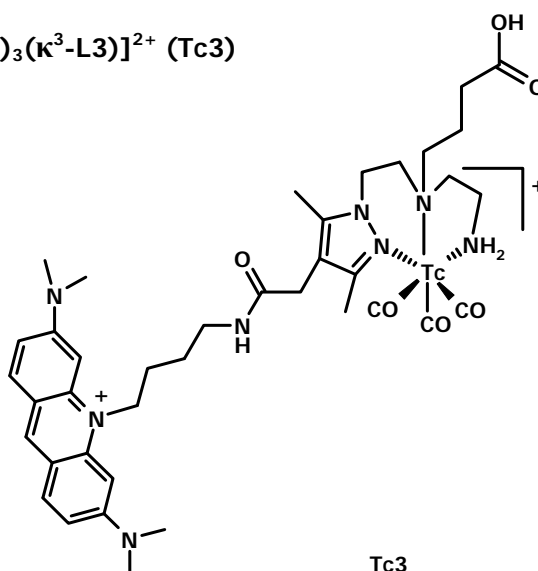
Tc2

Condições reaccionais: $t_{reacção}$ = 30 min; T = 100°C; Solvente = água; [L2] = 2,0 x 10⁻⁴ M

HPLC t_{ret} : 16,17 min (100-5 C18, 0,9 mL/min)

$\log(P_{O/W})$: 0,74 \pm 0,01

6.6.3. *fac*-[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{K}^3\text{-L3})$] $^{2+}$ (Tc3)

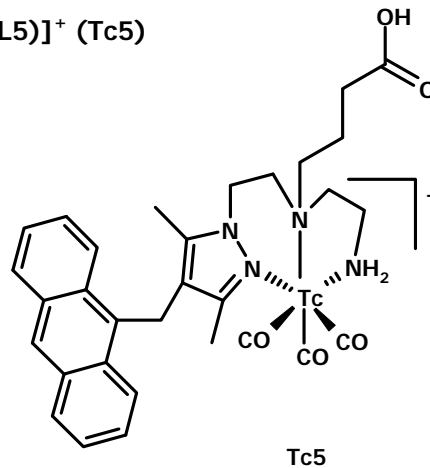


Tc3

Condições reaccionais: $t_{reacção}$ = 35 min; T = 100°C; Solvente: água; [L3] = 1,4 x 10⁻⁴ M

HPLC t_{ret} : 16,67 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

$\log(P_{O/W})$: -0,48 \pm 0,01

6.6.4. *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(κ³-L5)]⁺ (Tc5)

Condições Reacionais: $t_{\text{reação}} = 30 \text{ min}$; $T = 100^{\circ}\text{C}$; Solvente: EtOH; $[\text{L5}] = 1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$

HPLC t_{ret} : 19,41 min (100-10 C18, 1,0 mL/min)

log (P_{o/w}): $1,37 \pm 0,01$

6.7. Síntese das Sequências Peptídicas

Os péptidos análogos da BBN foram sintetizados no ITN ou no Harry S. Truman Memorial Veterans' Hospital, Research Division, Columbia, EUA, em colaboração com o Doutor Charles J. Smith.

6.7.1. Análogos da Bombesina

A síntese foi realizada num sintetizador automático Liberty (CEM) utilizando a técnica SPPS e o Fmoc como grupo protector. As sequências peptídicas foram escolhidas por forma a possuírem a sequência de aa [7-14] da BBN natural (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) por ser a parte biologicamente activa do péptido, logo a que é responsável pelo reconhecimento e interacção com o GRPr. Também foram estudadas sequências peptídicas NLS ligadas aos análogos da BBN. Pretendia-se fornecer especificidade aos compostos e favorecer a sua internalização nuclear.

6. Parte Experimental

Os diferentes análogos sintetizados foram os seguintes:

- Ser-Gly-Ser-BBN[7-14]: **SGS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-BBN[7-14]: **GGG-BBN**
- Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **NLS-BBN**
- Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14]: **GGG-NLS-BBN**

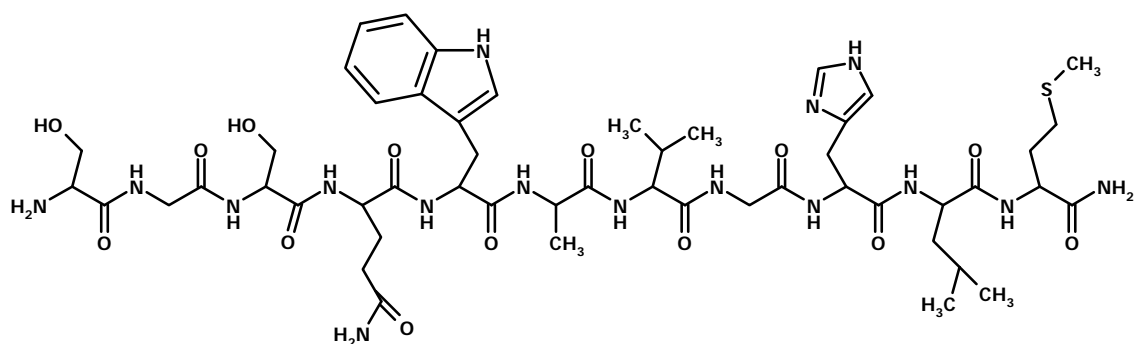
Após a síntese peptídica, a ligação à resina foi quebrada por reacção com uma mistura contendo, tioanisolo, água, 1,2-etanoditiol e TFA, numa razão 2:1:1:36. A mistura foi filtrada e a sequência peptídica foi precipitada da solução por adição de Et₂O gelado. O sólido resultante foi sucessivamente centrifugado e lavado com Et₂O gelado. O produto sólido obtido foi purificado por HPLC e seco em vazio. As sequências peptídicas foram analisadas por ESI-MS ou MALDI-TOF (tabela 6.1).

Tabela 6.1: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos análogos da BBN.

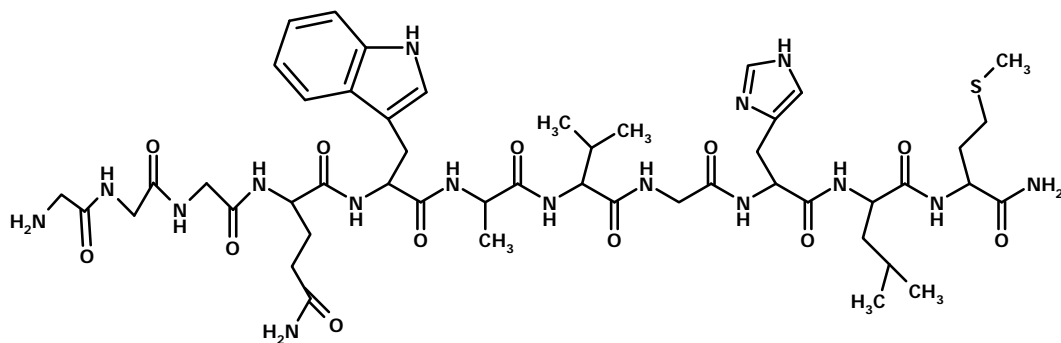
Análogo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
SGS-BBN	A/C	13,78	1171,54 586,28	1171,6 [M] ⁺ 586,3 [M+H] ²⁺	C ₅₁ H ₇₇ N ₁₅ O ₁₅ S ₁
GGG-BBN	A/C	13,91	1111,52	1111,54 [M] ⁺	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₁
NLS-BBN	A/C	13,38	1806,06	1805,62 [M] ⁺	C ₈₃ H ₁₄₀ N ₂₆ O ₁₇ S ₁
GGG-NLS-BBN	A/C	11,00	989,07 659,71 495,04	989,3 [M+H] ²⁺ 659,9 [M+2H] ³⁺ 495,3 [M+3H] ⁴⁺	C ₈₉ H ₁₄₉ N ₂₉ O ₂₀ S ₁

S: Ser; G: Gly; NLS: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val.

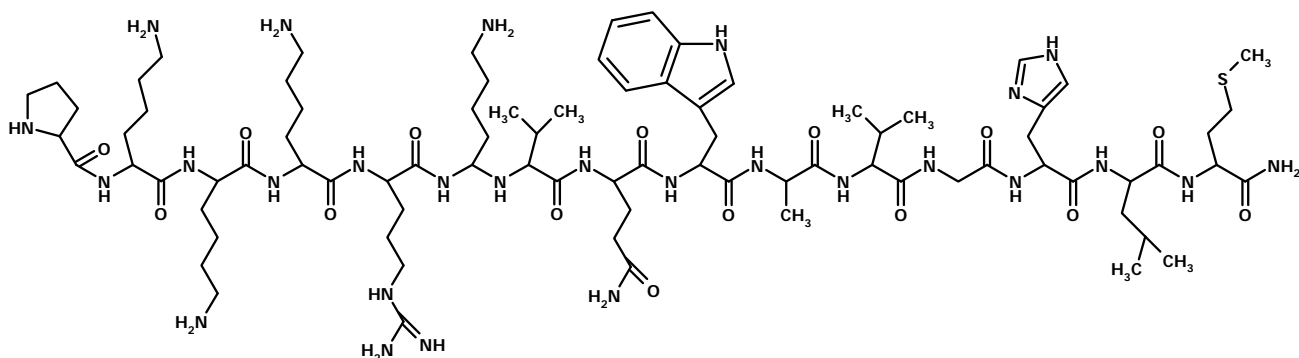
6.7.1.1. SGS-BBN (Ser-Gly-Ser-BBN[7-14])



6.7.1.2. GGG-BBN (Gly-Gly-Gly-BBN[7-14])

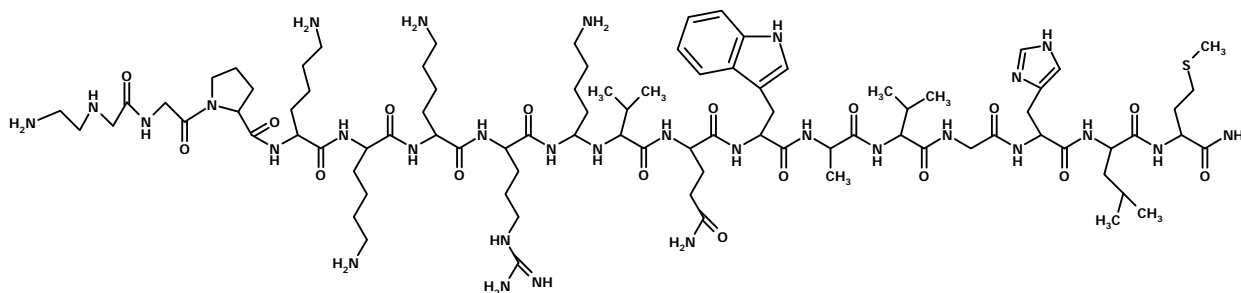


6.7.1.3. NLS-BBN (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14])



6. Parte Experimental

6.7.1.4. GGG-NLS-BBN (Gly-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-BBN[7-14])



6.7.2. Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

Os estudos para a preparação destes conjugados foram iniciados com o ligando pirazolo-diamina **23** e com a sequência **SGS-BBN**. Foram várias as condições experimentais estudadas até ter sido possível a síntese do composto desejado. As várias metodologias exploradas são descritas (A – H) nesta parte experimental e foram sumarizadas na tabela 4.2 do capítulo 4.

A: Dissolveu-se **23** (2 eq. ou 15 eq.) em água e adicionou-se NHS (50 eq.) e EDC (38 eq.) em tampão MES (pH 4,7) para formação do éster activado de **23**. Após 15 min à temperatura ambiente (pH: 4-6) adicionou-se a sequência **SGS-BBN** (1 eq.) dissolvida em tampão PBS (pH 7,4). Ajustou-se o pH da mistura reaccional a 7-9 e deixou-se a reacção progredir durante a noite à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reaccional, analisou-se e purificou-se o sobrenadante por HPLC. A análise por ESI-MS das várias espécies separadas no HPLC indicou que não se tinha formado o composto pretendido.

B: Dissolveu-se **23** (2 eq.) em DMF, adicionou-se NHS (50 eq.) ou N-sulfo-NHS (50 eq.) em DMF e EDC (38 eq.) em DMF/tampão MES, 2:1, para formação do éster activado de **23**. Após 30 min à temperatura ambiente (pH: 4-6) adicionou-se **SGS-BBN** (1 eq.) dissolvido em NaHCO₃ 0,1M (pH 8,5) e ajustou-se o pH a 7-9. A reacção progrediu durante a noite à

temperatura ambiente. A mistura reaccional foi filtrada e purificada por HPLC. Após análise por ESI-MS verificou-se que não tínhamos obtido o composto desejado.

C: Dissolveu-se **23** (4,2 eq.) em DMF e adicionou-se NHS (50 eq.) e EDC (38 eq.) para formação do éster activado de **23** a pH 4-6. Após 2 a 4 h de reacção à temperatura ambiente, adicionou-se a resina com a sequência peptídica **SGS-BBN** (1 eq.) em DMF. Ajustou-se o pH a 7-9 e a reacção progrediu durante a noite à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reaccional, separou-se a resina que foi lavada com DMF, CH₂Cl₂ e Et₂O. Retirou-se então o produto obtido da resina. Filtrou-se a mistura e separou-se o sobrenadante ao qual se adicionou Et₂O gelado para precipitar o conjugado peptídico. Após centrifugação purificou-se o produto obtido por HPLC. A análise por ESI-MS das fracções recolhidas indicou que não tinha havido reacção.

D: Dissolveu-se **23** (1 eq.) em DMF, adicionou-se HBTU (2,2 eq.) e deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Dissolveu-se a sequência peptídica **SGS-BBN** (2,5 eq.) em DMF, adicionou-se DIPEA (9,5 eq.) e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 30 min. Adicionou-se a mistura que continha o péptido à mistura que continha **23**. Ajustou-se o pH a 8-9 com DIPEA e deixou-se a reacção progredir durante 2 h à temperatura ambiente. Analisou-se a mistura reaccional por HPLC e recolheu-se a fracção que considerámos ser a pretendida. Essa fracção foi então analisada por MALDI-TOF. Esta análise confirmou tratar-se do produto pretendido. Também se observou a presença de um pico cuja massa diferia em 16 unidades da massa do produto pretendido. Após análise cuidada considerámos tratar-se do produto desejado oxidado.

Esta reacção também foi feita em atmosfera de azoto com DMF seca e desarejada em corrente de azoto durante 10 a 15 min. Após purificação por HPLC verificou-se que se tinha obtido o composto pretendido, com uma contaminação mais baixa de produto oxidado.

E: Dissolveu-se **23** (1 eq.) em DMF, adicionou-se HBTU (2,2 eq.) e deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Adicionou-se DIPEA (9,5 eq.) à resina que continha **SGS-BBN**

6. Parte Experimental

(2,5 eq.) em DMF e deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a mistura com a resina à solução de **23**, ajustou-se o pH a 8-9 e deixou-se a reagir durante 2 h à temperatura ambiente. Clivou-se o conjugado peptídico da resina e purificou-se por HPLC. Após análise por ESI-MS, do pico recolhido na purificação por HPLC, verificou-se que não se tinha obtido o produto desejado.

F: Dissolveu-se **23** (1 eq.) em DMF, adicionou-se HATU (2,2 eq.) e deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Dissolveu-se o **SGS-BBN** (2,5 eq.) em DMF, adicionou-se DIPEA (9,5 eq.) e deixou-se à temperatura ambiente durante 30 min. Adicionaram-se as duas misturas reaccionais, ajustou-se o pH a 8-9 e deixou-se a reacção progredir à temperatura ambiente durante a noite. Após purificação por HPLC e análise por ESI-MS, das fracções correspondentes às espécies maioritárias do cromatograma de HPLC, verificou-se que não se obteve o composto pretendido.

G: Dissolveu-se **23** (1 eq.) em DMF, adicionou-se HBTU (2,2 eq.) e deixou-se a reagir à temperatura ambiente durante 30 min. Dissolveu-se o **SGS-BBN** (2,2 eq.) em DMF, adicionou-se DIPEA (9,5 eq.) e deixou-se 30 min à temperatura ambiente. Adicionaram-se as duas misturas reaccionais, adicionou-se Fmoc-Met-OH (3,75 eq.) em DMF e ajustou-se o pH a 8-9. Deixou-se a reacção à temperatura ambiente durante 2 h. Purificou-se a mistura reaccional por HPLC e analisou-se a fracção correspondente à espécie maioritária por ESI-MS. Verificou-se que se obtinham ambas as espécies, oxidada e não oxidada.

H: Dissolveu-se **23** (1 eq.) em DMF, adicionou-se HBTU (2,2 eq.) e deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Ao mesmo tempo dissolveu-se o **SGS-BBN** (2,5 eq.) em DMF, adicionou-se DIPEA (9,5 eq.) e também se deixou à temperatura ambiente durante 30 min. Ao fim deste tempo, adicionaram-se as duas misturas reaccionais e 2-(metiltio)etanol (19 eq.). Ajustou-se o pH a 8-9 e deixou-se a reacção progredir durante 2 h à temperatura ambiente. No entanto, após análise da fracção de HPLC recolhida, por ESI-MS verificou-se que se continuava

a ter oxidação do composto e que o produto de reacção apresentava muitas impurezas quando comparado com os resultados obtidos pelo procedimento **D**.

Com base nos estudos anteriores aplicámos o método **D** nas reacções de conjugação dos ligandos pirazolo-diamina **23** e **32** às sequências **SGS-BBN**, **GGG-BBN** e **NLS-BBN**. A caracterização por HPLC e ESI-MS, dos diferentes conjugados peptídicos sintetizados, encontra-se na tabela 6.2.

Para podermos controlar o local do péptido onde se ligou o pirazolo-diamina **23** à sequência **GGG-NLS-BBN** fizemos esta conjugação em fase sólida com as cadeias laterais das Lys protegidas.

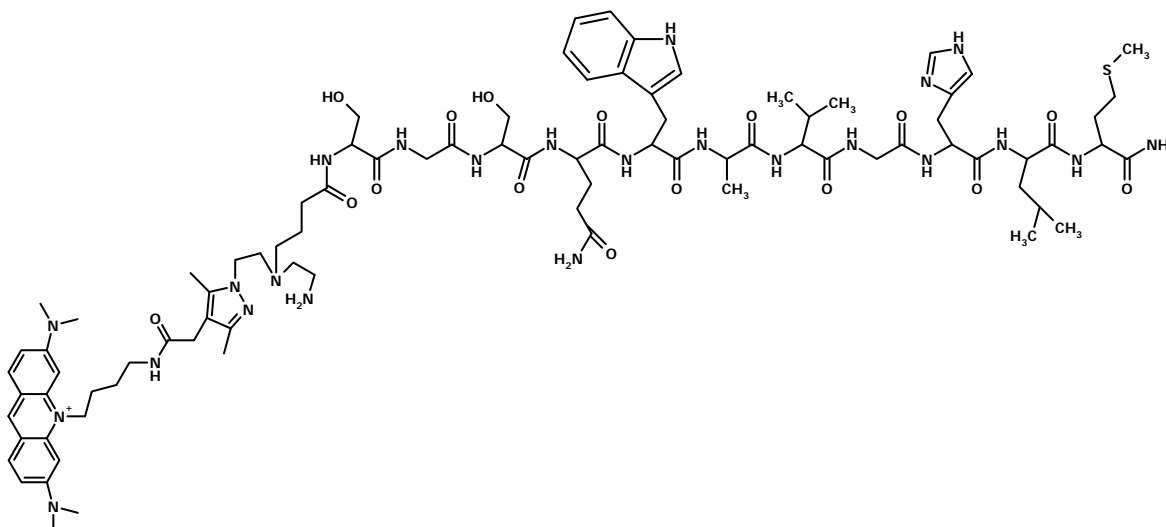
Síntese em fase sólida: A uma solução em DMF seca contendo o composto **23** (5 eq) na presença de HBTU (5 eq), em agitação à temperatura ambiente durante 15 min, adicionou-se DIPEA (10 eq) e a resina contendo a sequência peptídica **GGG-NLS-BBN** (1 eq). Deixou-se a reacção progredir à temperatura ambiente durante 1 noite, com controlo do valor do pH ($8 < \text{pH} < 10$) por adição de DIPEA. Após este período filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se a resina com 10 ml de DMF, 10 ml de CH_2Cl_2 e 10 ml de Et_2O . Após secagem durante 15 min em vazio fez-se a clivagem da resina segundo a metodologia já descrita em 6.7.1.. Fez-se análise por HPLC e posterior caracterização por ESI-MS do conjugado obtido **L12** (tabela 6.2).

Tabela 6.2: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos conjugados peptídicos.

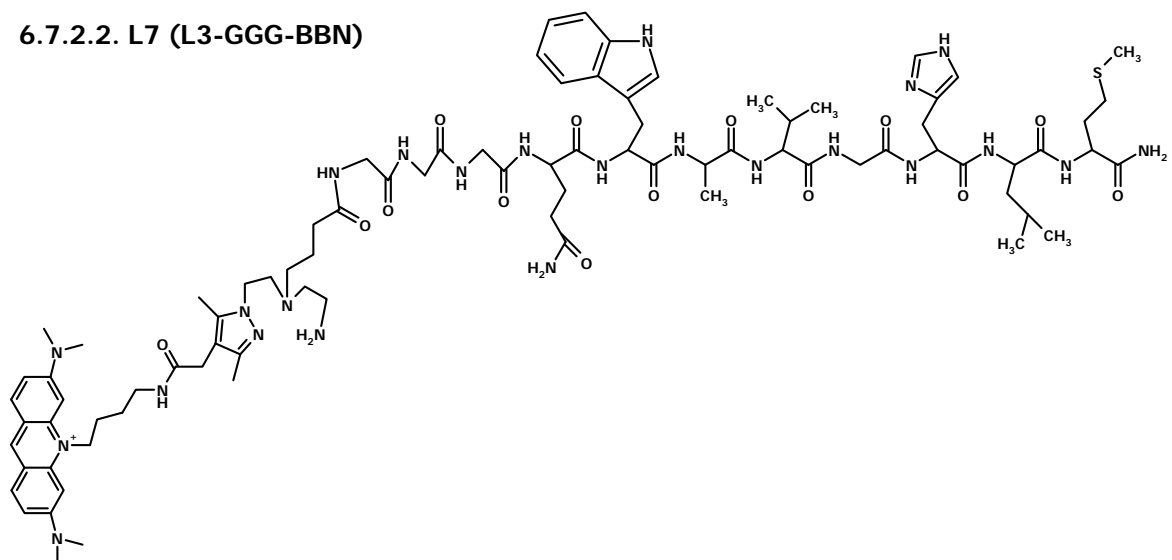
Conjugado	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
23-SGS-BBN	A	14,99	1898,19 949,59	1897,9 [M] ⁺ 949,8 [M+H] ²⁺	C ₉₂ H ₁₃₆ N ₂₃ O ₁₉ S ₁
23-GGG-BBN	A	15,66	920,50 614,00	920,0 [M+H] ²⁺ 613,8 [M+2H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₃₂ N ₂₃ O ₁₇ S ₁
32-SGS-BBN	A	18,08	857,44	856,9 [M+2H] ²⁺	C ₈₄ H ₁₁₇ N ₁₉ O ₁₈ S ₁
23-NLS-BBN	A	14,81	845,18	845,1 [M+2H] ³⁺	C ₁₂₄ H ₁₉₉ N ₃₄ O ₂₁ S ₁
L6 (L3-SGS-BBN)	C	17,52	900,48 600,66	900,1 [M+H] ²⁺ 600,3 [M+2H] ³⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₇ S ₁
L7 (L3-GGG-BBN)	C	17,22	870,47 580,65	869,8 [M+H] ²⁺ 580,4 [M+2H] ³⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₅ S ₁
L8* (L3-SGS-BBN(O))	C	16,63	605,99 908,48	605,7 [M+2H] ³⁺ 908,0 [M+H] ²⁺	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₁₈ S ₁
L9* (L3-GGG-BBN(O))	C	16,54	585,98 878,47	585,8 [M+2H] ³⁺ 878,1 [M+H] ²⁺	C ₈₅ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₆ S ₁
L10 (L5-SGS-BBN)	A	15,92	806,91	807,3 [M+2H] ²⁺	C ₇₉ H ₁₀₉ N ₁₉ O ₁₆ S ₁
L11 (L3-NLS-BBN)	A	14,70	811,83 609,12	811,5 [M+2H] ³⁺ 609,2 [M+3H] ⁴⁺	C ₁₁₉ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₁₉ S ₁
L12 (L3-GGG-NLS-BBN)	B	14,14	868,85 651,89 521,71	868,8 [M+2H] ³⁺ 651,9 [M+3H] ⁴⁺ 521,7 [M+4H] ⁵⁺	C ₁₂₅ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₂ S ₁

*Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met.

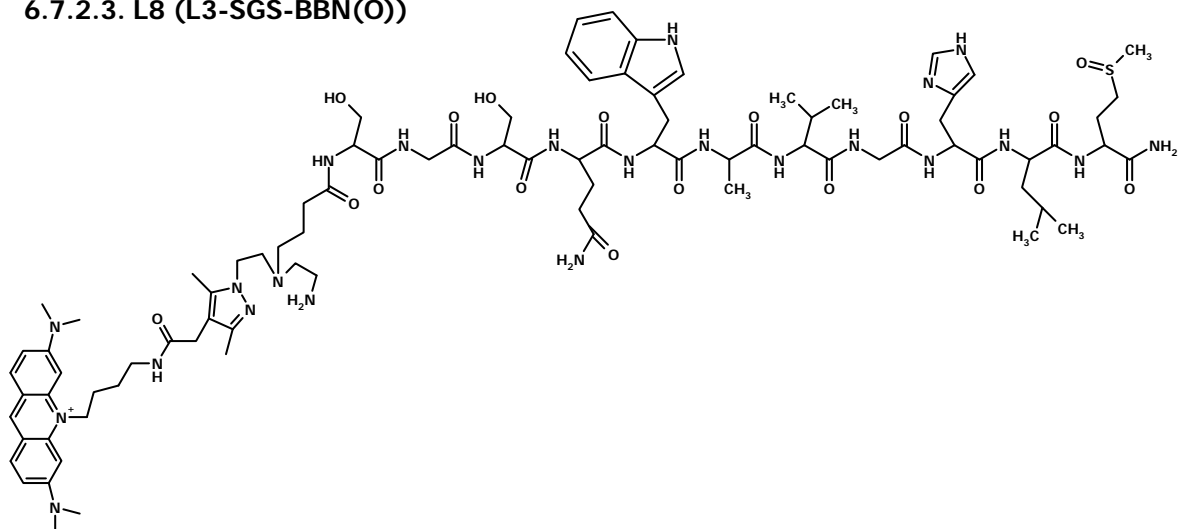
6.7.2.1. L6 (L3-SGS-BBN)



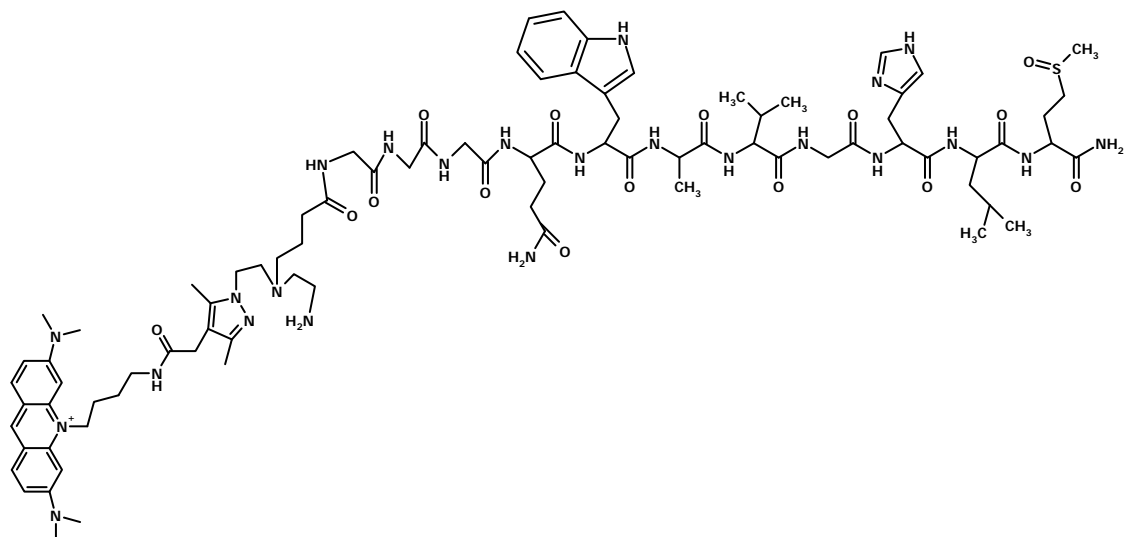
6.7.2.2. L7 (L3-GGG-BBN)



6.7.2.3. L8 (L3-SGS-BBN(O))

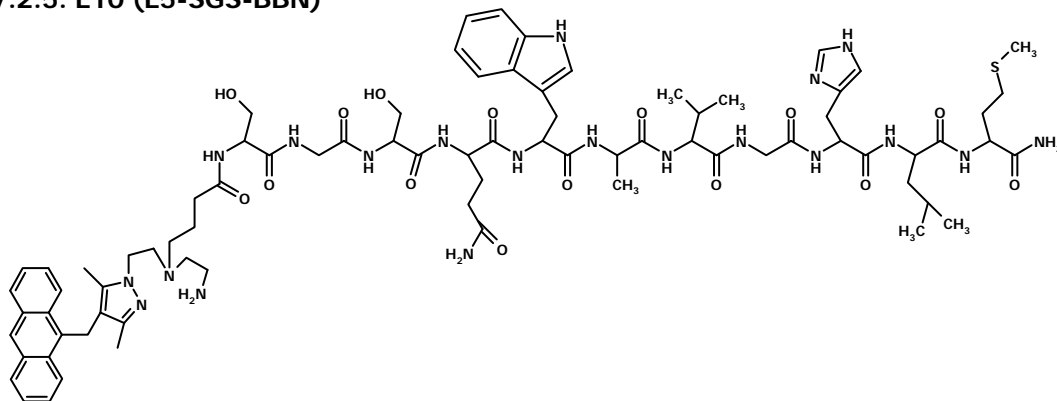


6.7.2.4. L9 (L3-GGG-BBN(O))

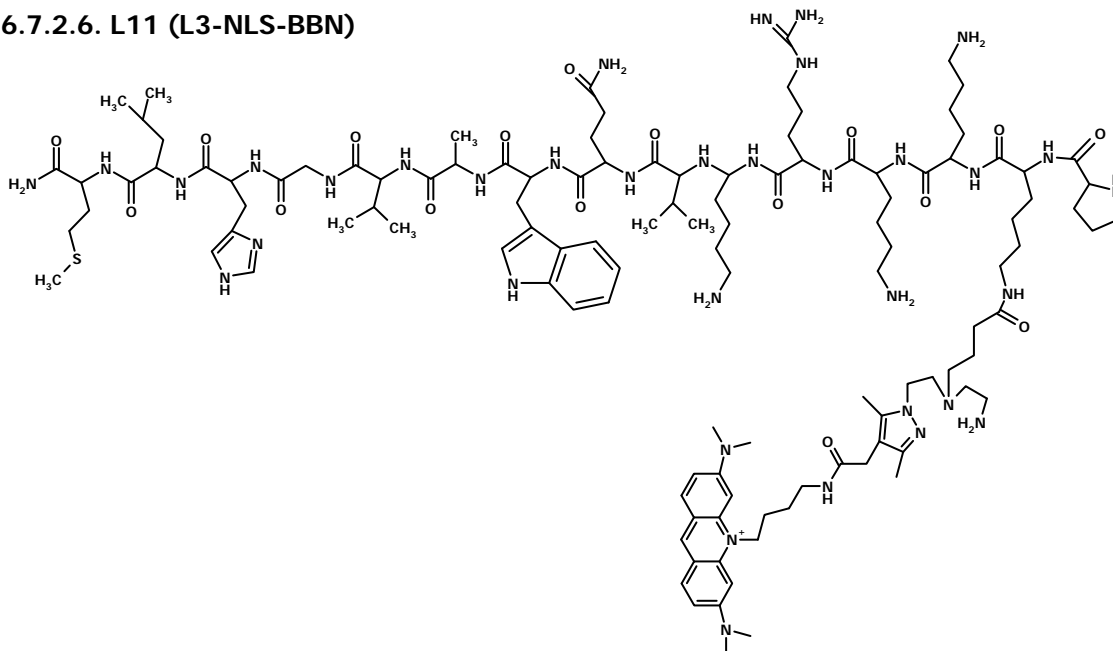


6. Parte Experimental

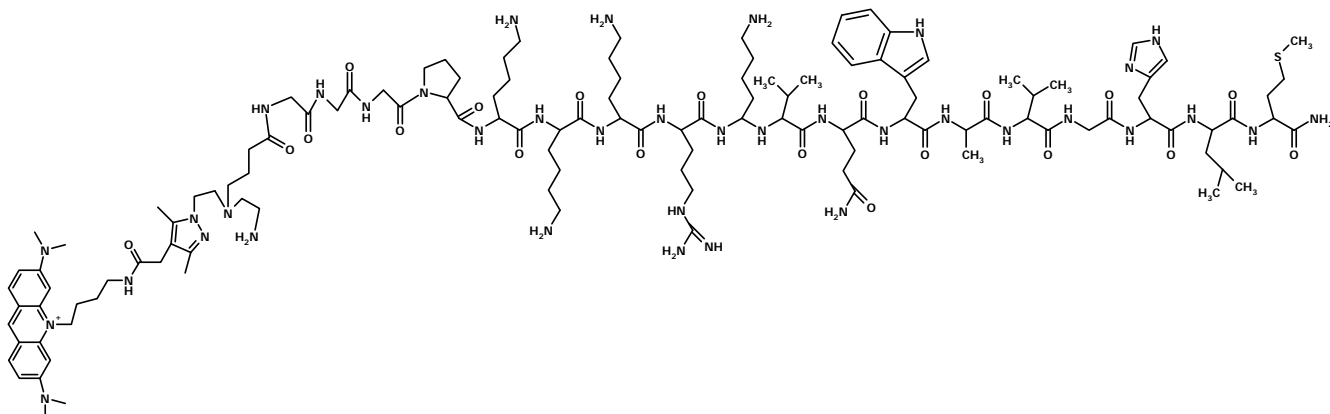
6.7.2.5. L10 (L5-SGS-BBN)



6.7.2.6. L11 (L3-NLS-BBN)



6.7.2.7. L12 (L3-GGG-NLS-BBN)



6.7.3. Complexos de Rénio (I) Estabilizados por Ligandos Pirazolo-Diamina Contendo uma Unidade Intercaladora e Análogos da Bombesina

A síntese dos complexos de rénio (I) estabilizados pelos ligandos pirazolo-diamina contendo diferentes sequências peptídicas e unidades intercaladoras, do tipo **Re3-X-BBN** (**X = SGS, GGG, NLS, GGG-NLS**), foi feita manualmente em solução ou em fase sólida por reacção do complexo **Re3**, com os diferentes análogos peptídicos, em DMF seca.

Genericamente, as sínteses em solução ou em fase sólida foram realizadas como segue:

Síntese em solução: A uma solução de **Re3** em DMF seca contendo HBTU (2,5 eq), em agitação durante 30 a 40 min, adicionou-se uma solução do análogo peptídico da BBN (2,5 eq) em DMF, contendo também DIPEA (4,6 eq). O pH da mistura reaccional foi ajustado a 8–9 por adição de DIPEA. A análise da mistura reaccional, por HPLC, mostrou que ao fim de 2 h a reacção tinha sido completa. Após este período, a mistura reaccional foi purificada por HPLC e recolhidas as fracções que pensámos corresponder aos compostos desejados. Essas fracções foram secas em vazio e o sólido obtido foi analisado por ESI-MS. Na tabela 6.3 apresentam-se os resultados obtidos por ESI-MS que nos confirmaram a formação dos complexos de fórmula geral **Re3-X-BBN** (**X = SGS, GGG, NLS**).

Durante a purificação por HPLC dos complexos **Re3-X-BBN** foram também isolados os complexos análogos oxidados que foram caracterizados sem qualquer ambiguidade por ESI-MS (tabela 6.3).

Síntese em fase sólida: A uma solução em DMF seca contendo o complexo **Re3** (5 eq) e HBTU (5 eq), em agitação à temperatura ambiente durante 15 min, adicionou-se DIPEA (10 eq) e a resina (1 eq) contendo a sequência peptídica **GGG-NLS-BBN**. Deixou-se a reacção progredir a temperatura ambiente durante 1 noite, com controlo do valor do pH da mistura reaccional ($8 < \text{pH} < 10$), por adição de DIPEA. Após este período filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se a resina com 10 ml de DMF, 10 ml de CH_2Cl_2 e 10 ml de Et_2O . O produto foi seco em vazio durante 15 min. O composto formado foi retirado da resina, utilizando a metodologia já descrita

6. Parte Experimental

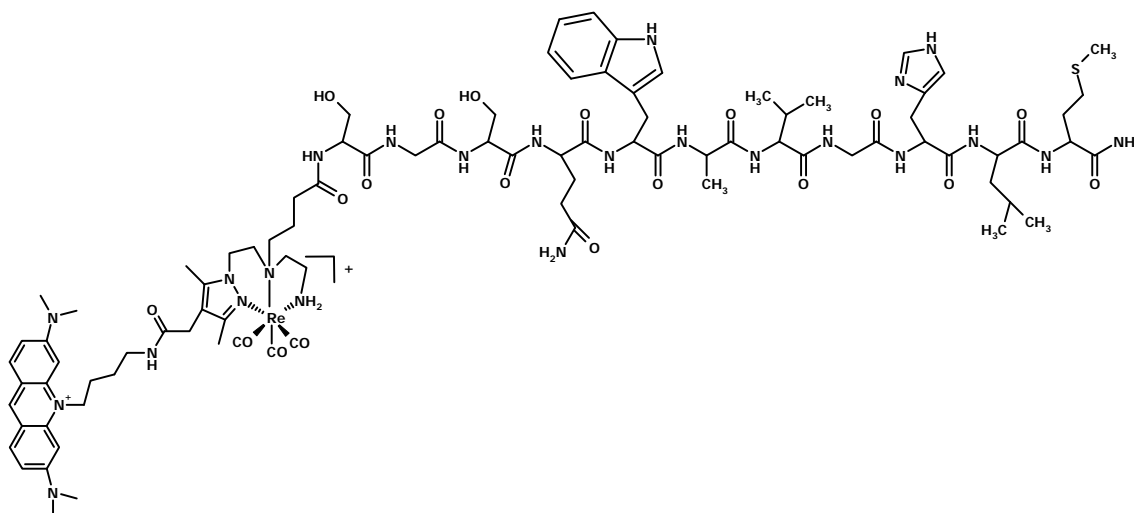
em 6.7.1. para a síntese em fase sólida. A solução obtida foi então analisada por HPLC e posteriormente caracterizada por ESI-MS. A análise dos espectros de massa indicou tratar-se de Re12.

Tabela 6.3: Caracterização por HPLC e ESI-MS dos complexos de rênio (I) com análogos peptídicos.

Complexo	HPLC		ESI-MS		Fórmula Molecular
	Método	t _{ret} (min)	Teórico	Experimental	
Re6 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L6)] ²⁺)	C	20,48	1034,94 690,30	1034,5 [M] ²⁺ 690,1 [M+H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₀ Re ₁ S ₁
Re7 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L7)] ²⁺)	C	20,63	1004,94 670,29	1004,7 [M] ²⁺ 670,3 [M+H] ³⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₈ Re ₁ S ₁
Re8* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L8)] ²⁺)	C	19,00	695,63 1042,95	695,9 [M+H] ³⁺ 1043,0 [M] ²⁺	C ₉₀ H ₁₂₈ N ₂₃ O ₂₁ Re ₁ S ₁
Re9* (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L9)] ²⁺)	C	20,04	675,63 1012,94	675,6 [M+H] ³⁺ 1012,6 [M] ²⁺	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₃ O ₁₉ Re ₁ S ₁
Re11 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L11)] ²⁺)	A	15,04	1809,94	1809,1 [2M+Na-2H] ³⁺	C ₁₂₂ H ₁₉₁ N ₃₄ O ₂₂ Re ₁ S ₁
Re12 (<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (κ ³ -L12)] ²⁺)	C	16,88	958,83 719,37 575,70	958,3 [M+H] ³⁺ 719,3 [M+2H] ⁴⁺ 575,7 [M+3H] ⁵⁺	C ₁₂₈ H ₂₀₀ N ₃₇ O ₂₅ Re ₁ S ₁

*Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met.

6.7.3.1. Re6 (*fac*-[Re(CO)₃(κ³-L6)]²⁺)



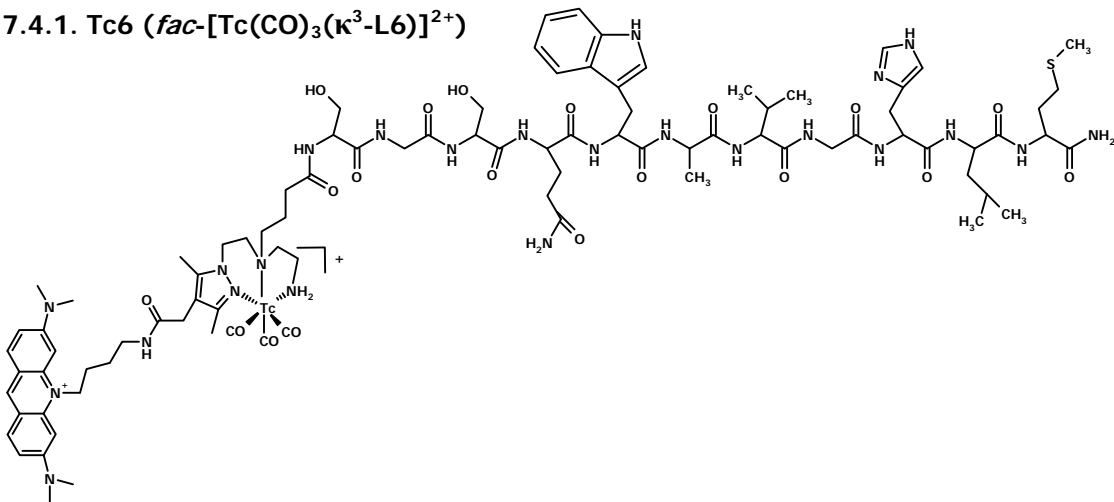
100°C durante 30 min. Após este período a mistura reaccional foi arrefecida à temperatura ambiente e analisada por HPLC (tabela 6.4).

Tabela 6.4: Caracterização por HPLC e $\log D_{O/W}$ dos complexos de ^{99m}Tc com análogos peptídicos.

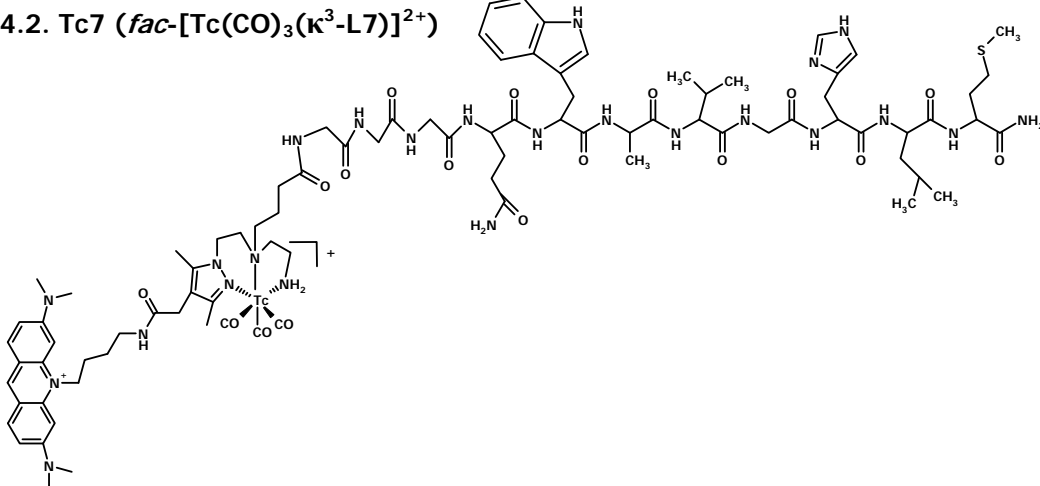
Complexo	HPLC		Log $D_{O/W} \pm s$
	Método	t_{ret} (min)	
Tc6 (<i>fac</i> -[Tc(CO) ₃ (κ^3 -L6)] ²⁺)	C	20,67	-0,68 \pm 0,07
Tc7 (<i>fac</i> -[Tc(CO) ₃ (κ^3 -L7)] ²⁺)	C	20,88	-1,91 \pm 0,05
Tc8* (<i>fac</i> -[Tc(CO) ₃ (κ^3 -L8)] ²⁺)	C	19,04	-0,83 \pm 0,11
Tc9* (<i>fac</i> -[Tc(CO) ₃ (κ^3 -L9)] ²⁺)	C	20,08	-1,70 \pm 0,02
Tc11 (<i>fac</i> -[Tc(CO) ₃ (κ^3 -L11)] ²⁺)	A	15,75	-1,51 \pm 0,03

*Estes compostos correspondem aos análogos peptídicos oxidados na Met.

6.7.4.1. Tc6 (*fac*-[Tc(CO)₃(κ^3 -L6)]²⁺)

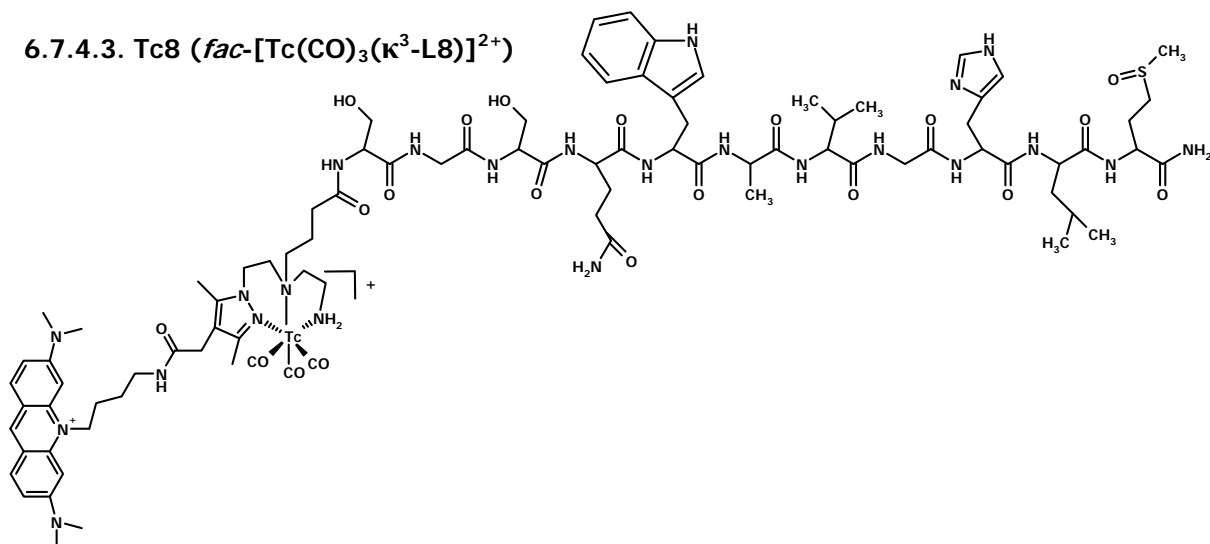


6.7.4.2. Tc7 (*fac*-[Tc(CO)₃(κ^3 -L7)]²⁺)

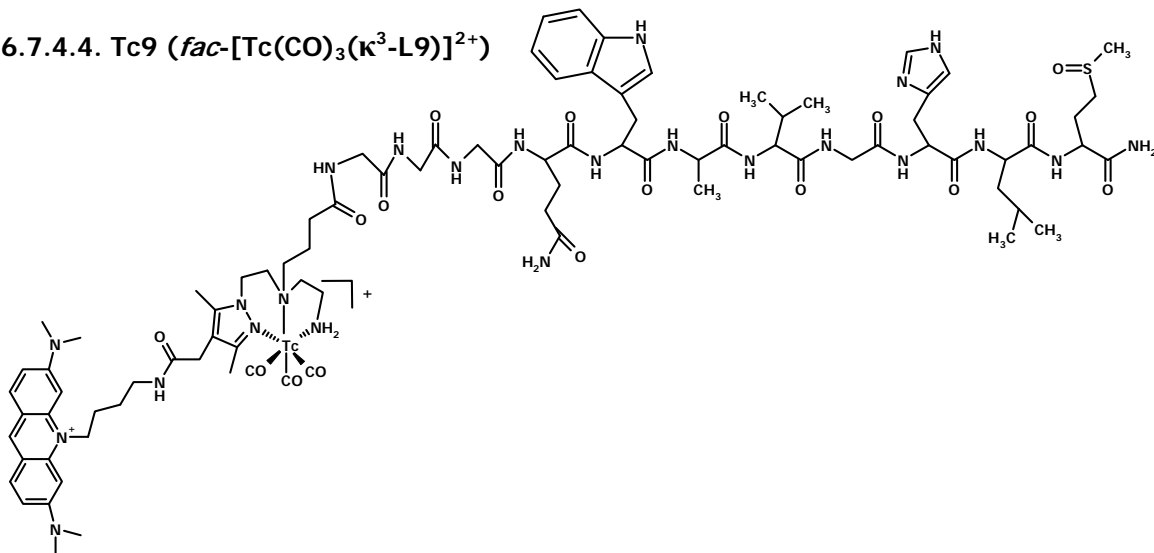


6. Parte Experimental

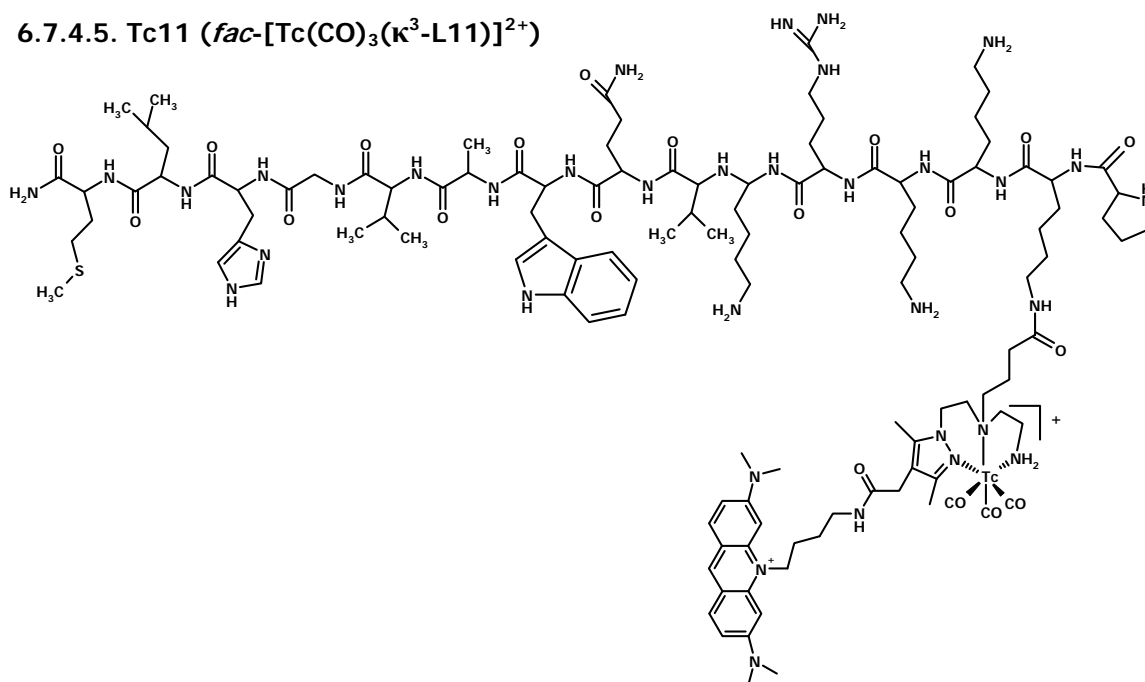
6.7.4.3. Tc8 (*fac*-[Tc(CO)₃(κ³-L8)]²⁺)



6.7.4.4. Tc9 (*fac*-[Tc(CO)₃(κ³-L9)]²⁺)



6.7.4.5. Tc11 (*fac*-[Tc(CO)₃(κ³-L11)]²⁺)



6.8. Lipofilia

A lipofilia dos complexos de ^{99m}Tc foi avaliada por determinação do coeficiente de partição ($\log D_{o/w}$) dos complexos no sistema bifásico n-octanol/PBS 0,1M (pH 7,4). Esta determinação utilizou o método de extracções múltiplas.⁹¹ De um modo breve:

Adicionou-se 1 mL de PBS (0,1M, pH 7,4) a tubos de centrífuga contendo 1 mL de n-octanol. Misturaram-se durante 1 min, utilizando um agitador vórtex. De seguida, foram adicionados 25 μL da preparação radioactiva em estudo. A mistura foi novamente agitada em vórtex por 1 min e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min, de forma a obter uma separação eficiente entre a fase orgânica e a fase aquosa. De cada uma das fases retiraram-se alíquotas de 100 μL , e a actividade das mesmas foi medida numa câmara de ionização. Em seguida, retiraram-se 25 μL da fase que possuía uma maior concentração do composto e repetiu-se novamente o processo inicial: repartição entre n-octanol/PBS, tal como descrito anteriormente. Finalmente, retiraram-se alíquotas de 25 μL de ambas as fases e mediu-se a actividade num contador gama. O coeficiente de partição ($\log D_{o/w}$) foi calculado por aplicação da seguinte expressão:

$$\log (D_{o/w}) = \log (C_1/C_2)$$

em que:

C_1 – actividade na fase orgânica (cpm)

C_2 – actividade na fase aquosa (cpm)

6.9. Estudos Espectroscópicos de Interação de Ligandos e Complexos de Rénio (I) com ADN

Às soluções dos compostos em estudo em TRIS-HCl 0,1 M (pH 7,4) foi-se adicionando quantidades variáveis de uma solução de ADN até não se registar qualquer alteração nos espectros resultantes analisados por espectroscopia de UV-Visível e fluorescência. Para os estudos de dicroísmo circular (CD) e dicroísmo linear (LD) foram adicionadas quantidades variáveis dos compostos em estudo a uma solução de ADN. Para o CD as amostras foram

6. Parte Experimental

dissolvidas em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 7,4); para o LD as amostras foram dissolvidas em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2).

O ADN de timo de vitela (*calf thymus DNA*, Sigma) encontrava-se na forma de sal de sódio e foi utilizado sem qualquer purificação adicional. O sal de ADN foi dissolvido numa quantidade mínima de solução tampão TRIS-HCL (0,1M, pH 7,4) para obter uma solução com 1 mg/mL. Após agitação, durante 24 a 48 h em banho de gelo, a concentração da solução de ADN, expressa por nucleótido, foi determinada por espectrometria de UV-Visível ($\epsilon_{260\text{ nm}}=6600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A pureza das soluções de ADN foi verificada por medição da absorvância a 260 e 280 nm, aplicando a razão $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$.

As soluções de ADN podem encontrar-se contaminadas com outras moléculas, como por exemplo, proteínas aromáticas que absorvem a 280 nm. Para soluções de ADN puras a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm é igual a 1,8. Para amostras contaminadas com proteínas esse valor será inferior. Os valores por nós determinados para as diferentes soluções de ADN estavam sempre acima de 1,8 verificando-se assim que as soluções de ADN não se encontravam contaminadas com proteínas.^{68,180} Todas as medidas foram efectuadas a 25°C em tampão TRIS-HCL (0,1M, pH 7,4).

Os estudos espectroscópicos de UV-Visível, fluorescência e CD foram realizados no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico com a colaboração do Professor João Pessoa e da Doutora Ana Isabel Tomaz. Os estudos de LD foram efectuados pelo Doutor Giampietro Viola no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Pádua, Itália.

6.10. Ensaio com ADN Plasmídico

A indução de quebras no ADN foi avaliada pela conversão do ADN plasmídico da forma superenrolada (FSE) para a forma circular (FC). Os complexos **Re1**, **Tc1** e $[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ foram incubados com ADN plasmídico (300 ng, puc19) durante 48 h à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se 5 μL de tampão de amostra (Ficoll 400, 20%, EDTA, SDS, azul de bromofenol) e as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% (AppliChem) em tampão TBE 1x (Tris-borato-EDTA) contendo 15 μL de brometo de etídio (10 mg/mL, AppliChem) para

visualização do ADN. Controlos de plasmídeo não incubado e linearizado foram incluídos em ambos os extremos do gel de agarose com 18 poços. A electroforese decorreu durante 18 h a 20 mV. As bandas foram visualizadas sob luz UV e as imagens capturadas digitalmente com AlphaImager EP (Alpha Innotech). As imagens utilizadas para quantificação foram obtidas todas na mesma corrida. A quantificação foi realizada por densitometria usando o programa AlphaView Software (Alpha Innotech). O valor obtido para a forma superenrola (FSE) foi corrigido com um factor de 1,42 para contabilizar a baixa capacidade corante do brometo de etídio para este tipo de conformação do ADN.¹⁸¹ Após esta correcção foi calculada a percentagem de cada forma (FSE e FC), e a razão FSE/FC. Estes estudos foram realizados em colaboração com a Doutora Filipa Mendes (investigadora do grupo onde o trabalho apresentado nesta tese foi realizado).

6.11. Estudos de Ligandos e Complexos de Rénio (I) e Tecnécio (I) com Células Tumorais B16-F1 e PC-3

Nestes estudos utilizaram-se as linhas celulares B16-F1 de melanoma de ratinho e PC-3 do cancro humano da próstata. Para a cultura destas linhas celulares aplicou-se o procedimento que a seguir se descreve.

O meio de cultura utilizado para as células B16-F1 foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, contendo Glutamax-I, Invitrogen ref. 61965) com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, ref. 10270) e 1% de solução de antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco, ref. 15140). O meio de cultura utilizado para as células PC-3 foi o RPMI (contendo L-glutamina, Invitrogen ref. 21875042) com 10% de soro fetal bovino (Gibco, ref. 10270). As células foram mantidas numa estufa a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂.

Sempre que as células em cultura atingiam uma confluência (preenchimento do fundo do frasco) entre 70 e 80%, foram subcultivadas pelo método padrão: aspirou-se o meio de cultura, lavaram-se as células com PBS e adicionou-se uma solução de tripsina – 0,5% EDTA (Invitrogen ref. 25300). Após 2 min a 37°C, as células soltaram-se do fundo do frasco e a

6. Parte Experimental

tripsina foi inactivada por adição de meio de cultura (4 vezes o volume de solução de tripsina). A suspensão celular foi homogeneizada e as células distribuídas para novo frasco de cultura. A cultura prosseguiu com mudança do meio de 2 em 2 dias.

Os estudos com células foram efectuados com a colaboração da Doutora Fernanda Marques (investigadora do grupo onde o trabalho apresentado nesta tese foi realizado).

6.11.1. Viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade e radiotoxicidade foram realizados por um teste denominado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-11)-2,5-difeniltetrazólio) que avalia a viabilidade das células após a sua exposição aos compostos em estudo. As células que se mantêm viáveis reduzem o MTT a formazan, durante a respiração celular, nas mitocôndrias. A detecção do formazan formado é uma indicação da integridade das mitocôndrias e da viabilidade celular.¹⁸²

6.11.1.1. Citotoxicidade de Ligandos e Complexos de Rénio (I)

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (cerca de 9000 células/200 µL/poço) durante 16 h para garantir a sua adesão. Após este período adicionaram-se soluções dos compostos em estudo preparadas em meio de cultura por diluições sucessivas de uma solução mãe. Utilizaram-se 8 poços para cada concentração estudada. As soluções ficaram 36 h a 37°C nos poços, após o que as células foram lavadas com PBS e posteriormente adicionada uma solução de MTT (0,5 mg/mL). Ao fim de 3 a 4 h a 37°C as células foram lavadas com PBS e adicionados 200 µL de DMSO, para dissolver os cristais de formazan formados. A absorvância das soluções foi medida a 570 nm num espectrofotómetro de placas.

6.11.1.2. Radiotoxicidade de Complexos de Tecnécio (I)

As células foram aplicadas em placas de 96 poços (cerca de 7000 células/200 µL/poço) durante 16 h para garantir a sua adesão. Após este período adicionaram-se as soluções dos complexos de ^{99m}Tc, previamente purificados por HPLC. Para o mesmo complexo de ^{99m}Tc utilizaram-se quantidades diferentes, obtidas por diluição sucessiva de uma solução mãe. Os

complexos de ^{99m}Tc ficaram a reagir com as células durante 36 h a 37°C, após o que as células foram lavadas com PBS. Utilizámos 8 poços para cada concentração de um mesmo composto. De seguida, adicionou-se uma solução de MTT (0,5 mg/mL) às células e deixou-se reagir durante 3 a 4 h a 37°C. Após lavagem com PBS, adicionou-se 200 μL de DMSO, para dissolver os cristais de formazan formados e leu-se a absorvância a 570 nm, num espectrofotómetro de placas.

6.11.2. Captação Celular e Internalização Nuclear de Ligandos, Complexos de Rénio (I) e Complexos de Tecnécio (I)

De modo a determinar a localização celular de compostos e complexos de rénio (I) utilizámos as propriedades fluorescentes das diferentes unidades intercaladoras em estudo e recorreremos à microscopia de fluorescência. Foi necessário assegurar uma concentração de cromóforo que permitisse a aquisição de imagens mas que não compromettesse a viabilidade das células. Este parâmetro foi estabelecido com base nos estudos de citotoxicidade.

Nos ensaios de microscopia de fluorescência apenas obtemos informação qualitativa relativamente à localização celular dos complexos. Para que esta localização possa ser quantificada é necessário recorrer aos complexos de ^{99m}Tc uma vez que a medida da actividade presente em cada fracção celular (citoplasma e núcleo) permite quantificar a fracção de complexo que fica no citoplasma e que fica no núcleo.

6.11.2.1. Estudos de Captação Celular e Nuclear de Ligandos e Complexos de Rénio (I) por Microscopia de Fluorescência

Foram cultivadas 5×10^4 células B16-F1 em lamelas estéreis, colocadas em placas de 6 poços. Após uma noite de incubação o meio foi aspirado e foi adicionado novo meio contendo os compostos a estudar (L1, L2, Re1 e Re2) numa concentração de 70 μM e incubou-se novamente por 3 h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas em 3% de paraformaldeído em PBS, durante 20 min à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS as células foram incubadas durante 20 min à temperatura ambiente com soluções 5 μM de

6. Parte Experimental

compostos de referência que coram o núcleo das células, emitindo fluorescência a comprimentos de onda conhecidos: DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) para **L1** e **Re1**; DRAQ5 (1,5-bis{[2-(di-metilamino)etil]amino}-4, 8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona) para **L2** e **Re2**. A seguir, as lamelas foram lavadas 3 vezes com PBS e montadas em lâminas de microscópio em glicerol. Para os compostos **L2** e **Re2** foi necessário adicionar uma solução a 3% de galato de propilo ao meio de montagem para impedir o rápido desaparecimento de fluorescência emitida por estes compostos e melhorar as condições de visualização das amostras.

As amostras foram observadas num microscópio de fluorescência Leica DMRA2, utilizando uma objectiva de 100x 1,2 NA e um filtro UV Chroma +A4 para avaliar a fluorescência do DAPI ($\lambda_{\text{ex,max}} = 359 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 461 \text{ nm}$) e de **L2** e **Re2**, um filtro Y5 Cy5 para o DRAQ5 ($\lambda_{\text{ex,max}} = 647 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,max}} = 670 \text{ nm}$) e um filtro L5 FITC para **L1** e **Re1**. As imagens foram obtidas com uma máquina fotográfica CoolSNAP HQ 1,3 Mpixel cooled CCD e tratadas com o software MetaMorph.

A avaliação da captação celular por microscopia de fluorescência foi efectuada pelos Doutores Fernanda Marques e Gabriel G. Martins no Instituto Gulbenkian da Ciência.

6.11.2.1.1. Microscopia Confocal de Fluorescência com Células Fixadas

Células B16-F1 e PC-3 foram preparadas tal como se encontra descrito no ponto anterior e foram incubadas com os compostos **L1**, **L3**, **Re1** e **Re3** (70 μM) e uma solução de DAPI 5 μM . Após lavagem, as lamelas foram montadas em lâminas e as amostras foram observadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) equipado com uma objectiva 63x 1,4 Apochromat. A fluorescência dos compostos foi avaliada com um laser Argon/2 de 488 nm e um filtro de emissão BP 505-550 nm. A fluorescência do DAPI foi avaliada com um laser Diode 405 nm e um filtro de emissão BP 420-480 nm.

A avaliação da captação celular por microscopia confocal de fluorescência foi efectuada pelos Doutores Fernanda Marques e José Rino no Instituto de Medicina Molecular.

6.11.2.1.2. Microscopia Confocal de Fluorescência com Células Vivas

Foram aplicadas células PC-3 numa densidade 10^5 células/mL em placas de Petri (MatTek Corporation, USA). Após 24 h de incubação a 37°C adicionou-se uma solução de dihidroetídio (Molecular Probes, USA) a $1\ \mu\text{g/mL}$. O dihidroetídio é uma sonda neutra que atravessa a membrana celular de células vivas. Uma vez no interior das células, o corante é oxidado a brometo de etídio.¹⁸³ Após 20 min a 37°C as células foram lavadas 3 vezes e mantidas em DMEM/F12 sem o indicador vermelho de fenol. As células foram visualizadas num microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) equipado com uma incubadora para controlo de temperatura a 37°C (Pecon, Germany) utilizando uma objectiva PlanApochromat 63x/1.4. A fluorescência do brometo de etídio foi detectada com um laser Argon de 514 nm (45 mW nominal output) e um filtro de emissão LP 615 nm. A fluorescência dos compostos **Re1**, **Re6** e **Re7** foi detectada com o mesmo laser a 488 nm e um filtro BP 500-550 nm. O *pinhole* (abertura confocal) foi ajustado em ambos os canais para se ter a mesma espessura óptica da amostra ($1\ \mu\text{m}$). Após adição das soluções dos complexos de rénio ($15\ \mu\text{M}$) ao meio celular, foram obtidas imagens sequenciais em verde (complexos de rénio) e vermelho (brometo de etídio) minuto a minuto durante 1 h.

6.11.2.2. Captação Celular e Internalização Nuclear de Complexos de Tecnécio (I)

Nos estudos de captação celular e internalização nuclear foram cultivadas células PC-3 ou B16-F1 em placas de 24 poços (cerca de 2×10^5 células/500 μL /poço). As células ficaram a aderir às placas durante 16 a 18 h. Após este período, foram adicionadas soluções dos compostos radioactivos em estudo, purificados por HPLC, diluídos nos meios de cultura das células: RPMI para células PC-3 e DMEM para B16-F1. As células foram mantidas numa atmosfera húmida com 5% de CO_2 a 37°C . Esta incubação foi interrompida ao fim de tempos seleccionados (5 min, 15 min, 30 min, 1, 2, 3 e 4 h) por remoção dos meios de cultura e lavagem das células, duas vezes, com uma solução de PBS com 0,2% de BSA a 4°C .

Em seguida, foram adicionados 500 μL de uma solução de glicina-HCl (50 mM, pH 2,8) e deixou-se a incubar com as células durante 3 min à temperatura ambiente. Repetiu-se este

6. Parte Experimental

passo por mais 3 min, com nova adição de solução glicina-HCl, com a finalidade de se retirar o complexo radioactivo associado à membrana das células (lavagem àcida). As fracções correspondentes ao meio de incubação, às lavagens com solução de PBS e às lavagens com solução ácida foram recolhidas para contagem da radioactividade.

Após lavagem das células com 500 µL de uma solução de PBS procedeu-se à destruição da membrana celular pela adição de 500 µL de tampão de lise (Tris 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 3 mM, NaCl 10 mM) e 2,5 µL de Nonidet NP-40 a 10%. Após 1 h a suspensão de células lisadas foi retirada dos poços e centrifugada a 1300 g durante 5 min. O precipitado obtido (que contém o núcleo das células) e o sobrenadante (com o restante conteúdo celular) foram separados e a actividade de cada um deles medida. A actividade medida no precipitado corresponde à percentagem de composto internalizado no núcleo das células. A captação celular total corresponde à soma das actividades medidas no precipitado e no sobrenadante. Para cada tempo foram efectuados ensaios em triplicado. Os resultados foram expressos como percentagem da actividade total nos poços (actividade não ligada à célula + actividade associada à membrana das células + actividade internalizada pelas células).

6.11.2.3. Efluxo de Complexos de Tecnécio (I)

Procedeu-se ao estudo do efluxo que permite avaliar como se processa a libertação dos complexos radioactivos ao longo do tempo, após a sua captação pelas células. Para avaliar o efluxo, foram aplicadas células PC-3 ou B16-F1 em placas de 24 poços (cerca de 2×10^5 células/500 µL/poço) e deixadas a aderir durante 16 a 18 h. Ao fim deste tempo adicionaram-se soluções dos compostos radioactivos, purificados por HPLC, e diluídos em meio de cultura das células: RPMI para PC-3 e DMEM para B16-F1. Após 1 h a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂, o meio de cultura das células foi aspirado e lavaram-se as células com solução de PBS com 0,2% de BSA, solução de glicina-HCl (50 mM, pH 2,8) e novamente com solução de PBS com 0,2% de BSA. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio de cultura e ao fim de tempos seleccionados (5 min, 15 min, 30 min, 1, 2, 3, e 4 h) foi avaliada a quantidade de complexo libertado pelas células. Procedeu-se à lavagem das células tal como referido na secção anterior (6.11.2.2). Neste caso, as células foram solubilizadas com uma solução de

NaOH 1 N para determinação da radioactividade internalizada. Para cada tempo foram efectuados ensaios em triplicado. Os resultados foram expressos como percentagem da actividade total nos poços (actividade não ligada às células + actividade associada à membrana das células + actividade internalizada pelas células).

6.12. Estudos Biológicos / Farmacocinética

6.12.1. Estudos de Biodistribuição

A biodistribuição dos complexos de ^{99m}Tc foi estudada em ratinhos fêmea CD-1, sendo o peso de cada animal aproximadamente de 20-25 g. Os animais foram injectados intravenosamente (iv) na veia da cauda com 100 μL (2,5-12,5 MBq) da preparação radioactiva e foram mantidos com dieta normal *ad libitum*. Após 1 e 4 h de administração iv (ou 30 min e 1 h), os ratinhos foram sacrificados por deslocação cervical. A actividade administrada e a actividade no animal sacrificado foram medidas numa câmara de ionização. Foi assumido que a diferença de actividade no animal após injeção e sacrifício era devida à excreção. Os órgãos principais foram então removidos, pesados e contados num contador gama. A acumulação de actividade nos tecidos foi calculada e expressa em percentagem da dose injectada por órgão (% DI/órgão) e/ou por grama de tecido (% DI/g de órgão). Para o sangue, osso e músculo, a actividade total foi calculada assumindo que estes órgãos representam, respectivamente, 6, 10 e 40% do peso total do animal. A urina foi também recolhida no momento do sacrifício.

As condições experimentais de realização dos ensaios biológicos satisfaziam as orientações técnicas relativas ao alojamento e cuidados a prestar a pequenos roedores, aprovadas na Portaria 1131/97 para aplicação dos Decretos-Lei nº 129/92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro, que transpõem para a ordem jurídica interna a Directiva Comunitária nº 86/609/CEE a qual estabelece as normas mínimas relativas à protecção de animais para fins experimentais e outros fins científicos.

6.12.2. Estabilidade *in vivo* / Metabolização

A estabilidade *in vivo* foi avaliada por análise da urina e do soro de ratinhos utilizando para tal HPLC. A recolha da urina e do sangue foi realizada 1 e 4 h (ou 30 min e 1 h) após a injeção intravenosa do composto em estudo. A urina foi recolhida no momento do sacrifício e centrifugada durante 10 min a 2000 rpm, e o sobrenadante foi analisado por HPLC. Relativamente ao soro, o sangue recolhido dos ratinhos foi imediatamente centrifugado durante 10 min, a 3000 rpm e a 4°C. O soro foi separado e alíquotas de 75 µL foram tratadas com 150 µL de EtOH frio, para precipitação das proteínas. As amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. M. D. Bartholomä, A. S. Louie, J. F. Valliant, J. Zubieta, Technetium and gallium radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2903-2920.
2. U. Abram, R. Alberto, Technetium and rhenium – coordination chemistry and nuclear medical applications, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 1486-1500.
3. S. Liu, The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals, *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 445-461.
4. F. Tisato, C. Bolzati, M. Porchia, F. Refosco, Contribution of electrospray mass spectrometry for the characterization, design, and development of nitrido technetium and rhenium heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals, *Mass. Spectrom. Rev.*, **2004**, 23, 309-332.
5. G. F.-Flores, C. A. Murphy, L. M.-Alafort, Third-generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy, *Curr. Pharm. Analysis*, **2006**, 2, 339-352.
6. R. M. Reilly, Monoclonal antibody and peptide-targeted radiotherapy of cancer, **2010**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
7. S. L. Pimlott, A. Sutherland, Molecular tracers for PET and SPECT imaging of disease, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 149-162.
8. M. J. Welch, C. S. Redvanly, Handbook of radiopharmaceuticals - radiochemistry and applications, **2003**, Wiley, New York.
9. J. Stepanek, S. A. Ilvonen, J. S. Lampinen, S. E. Savolainen, P. J. Välimäki, A. A. Kuronen, Radiation spectra of ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$ and $^{114\text{m}}\text{In}$, *Acta Oncol.*, **2000**, 39, 667-671.
10. A. I. Kassis, M. A. Walicka, S. J. Adelstein, Double-strand break yield following ^{125}I decay, *Acta Oncol.*, **2000**, 39, 721-726.
11. F. Buchegger, F. P. Adamer, Y. M. Dupertis, A. B. Delaloye, Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2006**, 33, 1352-1363.

12. A. I. Kassis, S. J. Adelstein, Radiobiologic principles in radionuclide therapy, *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46, 4S-12S.
13. F. Marques, A. Paulo, M. P. Campello, S. Lacerda, R. F. Vitor, L. Gano, R. Delgado, I. Santos, Radiopharmaceuticals for targeted radiotherapy, *Radia. Prot. Dosimetry*, **2005**, 116, 601-604.
14. M. Gijnj, K. Hinni, S. Tschumi, S. Schulz, H. R. Maecke, Trifunctional somatostatin-based derivatives designed for targeted radiotherapy using Auger electron emitters, *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46, 2097-2103.
15. M. J. Adams, D. S. Wilbur, Radiohalogens for imaging and therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 153-163.
16. A. I. Kassis, Cancer therapy with auger electrons: are we almost there?, *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1479-1481.
17. K. G. Hofer, Biophysical aspects of Auger processes, *Acta Oncol.*, **2000**, 39, 651-657.
18. T. Storr, K. M. Thompson, C. Orvig, Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 534-544.
19. A. A. S. Tavares, J. M. R. S. Tavares, ^{99m}Tc Auger electrons for targeted tumor therapy: a review, *Int. J. Radia. Biol.*, **2010**, 86, 261-270.
20. L. S. Yasuki, K. G. Hofer, Role of mitochondrial DNA in cell death induced by ^{125}I decay, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1986**, 49, 601-610.
21. L. M. Ickenstein, K. Edwards, S. Sjöberg, J. Carlsson, L. Gedda, A novel ^{125}I -labeled daunorubicin derivative for radionuclide-based cancer therapy, *Nucl. Med. Biol.*, **2006**, 33, 773-783.
22. R. W. Howell, Auger processes in the 21st century, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2008**, 84, 959-975.
23. P. Balagurumoonthy, K. Wang, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, DNA double-strand breaks induced by decay of ^{123}I -labeled Hoechst 33342: role of DNA topology, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2008**, 84, 976-983.
24. R. B. Michel, P. M. Andrews, M. E. Castillo, M. J. Mattes, *In vitro* cytotoxicity of carcinoma cells with ^{111}In -labeled antibodies to HER-2, *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, 4, 927-937.

25. R. B. Michel, A. V. Rosario, P. M. Andrews, D. M. Goldenberg, M. J. Mattes, Therapy of small subcutaneous B-lymphoma xenografts with antibodies conjugated to radionuclides emitting low-energy electrons, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 777-786.
26. P. Chen, J. Wang, K. Hope, L. Jin, J. Dick, R. Cameron, J. Brandwein, M. Minden, E. M. Reilly, Nuclear localizing sequences promote nuclear translocation and enhance the radiotoxicity of the anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 labeled with ^{111}In in human myeloid leukemia cells, *J. Nucl. Med.*, **2006**, 47, 827-836.
27. K. E. Bailey, D. L. Constantini, Z. Cai, D. A. Scollard, Z. Chen, R. M. Reilly, Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the nuclear localization and cytotoxicity of the Auger electron-emitting radiopharmaceutical ^{111}In -DTPA-human epidermal growth factor, *J. Nucl. Med.*, **2007**, 48, 1562-1570.
28. A. Otte, E. Jermann, M. Behe, M. Goetze, H. C. Bucher, H. W. Roser, A. Heppeler, J. M.-Brand, H. R. Maecke, DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1997**, 24, 792-795.
29. M. J. G. Oyen, L. Bodei, F. Giammarile, H. R. Maecke, J. Tennvall, M. Luster, B. Brans, Targeted therapy in nuclear medicine – current status and future prospects, *Annals Oncol.*, **2007**, 18, 1782-1792.
30. M. L. Schipper, C. G. Riese, S. Seitz, A. Weber, M. Behe, T. Schurrat, N. Schramm, B. Keil, H. Alfke, T. M. Behr, Efficacy of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertechnetate and ^{131}I radioisotope therapy in sodium/iodide symporter (NIS)-expressing neuroendocrine tumors *in vivo*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 638-650.
31. P. Häfliger, N. Agorastos, A. Renard, G. G.-Brugnoli, C. Marty, R. Alberto, Cell uptake and radiotoxicity studies of a nuclear localization signal peptide-intercalator conjugate labeled with $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 582-587.
32. P. Häfliger, N. Agorastos, B. Spingler, O. Georgiev, G. Viola, R. Alberto, Induction of DNA-double-strand breaks by auger electrons from $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes with DNA-binding ligands, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 414-421.
33. R. F. Vitor. T. Esteves, F. Marques, P. Raposinho, A. Paulo, S. Rodrigues, J. Rueff, S. Casimiro, L. Costa, I. Santos, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl complexes functionalized with anthracenyl

- fragments: synthesis, characterization, and evaluation of their radiotoxic effects in murine melanoma cells, *Cancer Bioth. Radiopharm.*, **2009**, 24, 551-563.
34. R. F. Vitor, I. Correia, M. Videira, F. Marques, A. Paulo, J. C. Pessoa, G. Viola, G. G. Martins, I. Santos, Pyrazolyl-diamine ligands that bear anthracene moieties and their rhenium (I) tricarbonyl complexes: synthesis, characterization and DNA-binding properties, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 131-142.
35. N. Agorastos, L. Borsig, A. Renard, P. Antoni, G. Viola, B. Spingler, P. Kurz, R. Alberto, Cell-specific and nuclear targeting with $[M(CO)_3]^+$ ($M = {}^{99m}\text{Tc}$, Re)-based complexes conjugated to acridine orange and bombesin, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 3842-3852.
36. S. Alves, A. Paulo, J. D. G. Correia, L. Gano, C. J. Smith, T. J. Hoffman, I. Santos, Pyrazolyl derivatives as bifunctional chelators for labeling tumor-seeking peptides with the *fac*- $[M(CO)_3]^+$ moiety ($M = \text{Re}$, ${}^{99m}\text{Tc}$): synthesis, characterization, and biological behavior, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 438-449.
37. S. Alves, J. D. G. Correia, I. Santos, B. Veerendra, G. L. Sieckman, T. J. Hoffman, T. L. Rold, S. D. Figueroa, L. Retzlöff, J. McCrate, A. Prasanphanich, C. J. Smith, Pyrazolyl conjugates of bombesin: a new tridentate ligand framework for the stabilization of *fac*- $[M(CO)_3]^+$ moiety, *Nucl. Med. Biol.*, **2006**, 33, 625-634.
38. J. R. Dilworth, S. J. Parrott, The biomedical chemistry of technetium and rhenium, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 43-55.
39. G. B. Saha, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, **2004**, 5th edition, Springer, New York.
40. M. A. M. Rojas, B. I. Khasinov, A. Y. Tsvivadze, Recent advances on technetium complexes: coordination chemistry and medical applications, *J. Coord. Chem.*, **2006**, 59, 1-63.
41. R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A. P. Schubiger, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7987-7988.

42. R. Alberto, K. Ortner, N. Wheatley, R. Schibli, A. P. Schubiger, Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient *in situ* CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 3135-3136.
43. R. J. Kowalsky, S. W. Falen, Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine, **2004**, 2nd ed, American Pharmacists Association, Washington.
44. R. Schibli, P. A. Schubiger, Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2002**, 29, 1529.
45. J. D. G. Correia, A. Paulo, P. D. Raposinho, I. Santos, Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy, *Dalton Trans.*, **2011**, DOI: 10.1039/c0dt01599g.
46. G. Dirscherl, B. König, The use of solid-phase synthesis techniques for the preparation of peptide-metal complex conjugates, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 597-634.
47. S. R. Banerjee, M. K. Levadala, N. Lazarova, L. Wei, J. F. Valliant, K. A. Stephenson, J. W. Babich, K. P. Maresca, J. Zubieta, Bifunctional single amino acid chelates for labeling of biomolecules with the $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ and $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ cores. Crystal and molecular structures of $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NH}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{X(Y)\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}]\text{Br}$ (X = Y = 2-pyridylmethyl; X = 2-pyridylmethyl, Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl; X = Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl), $[\text{ReBr}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}]$, and $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}]$, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6417-6425.
48. C. Moura, T. Esteves, L. Gano, P. D. Raposinho, A. Paulo, I. Santos, Synthesis, characterization and biological evaluation of tricarbonyl M (I) (M = Re, $^{99\text{m}}\text{Tc}$) complexes functionalized with melanin-binding pharmacophores, *New J. Chem.*, **2010**, 34, 2564-2578.
49. C. Xavier, J.-K. Pak, I. Santos, R. Alberto, Evaluation of two chelators for labelling a PNA monomer with the *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ moiety, *J. Organomet. Chem.*, **2007**, 692, 1332-1339.
50. C. Xavier, C. Giannini, L. Gano, S. Maiorana, R. Alberto, I. Santos, Synthesis, characterization and evaluation of a novel $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ pyrazolyl conjugate of a peptide nucleic acid sequence, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, 13, 1335-1344.

51. J. C. Sheehan, J. Preston, P. A. Cruickshank, A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2492-2493.
52. G. J. Ho, K. M. Emerson, D. J. Mathre, R. F. Shuman, E. J. J. Grabowski, Carbodiimide-mediated amide formation in a two-phase system. A high-yield and low-racemization procedure for peptide synthesis, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3569-3570.
53. T. Fukuyama, M. Cheung, C. K. Jow, T. Kan, 2,4-Dinitrobenzenesulfonamides: a simple and practical method for the preparation of a variety of secondary amines and diamines, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 5831-5834.
54. D. A. Campbel, The synthesis of phosphonate esters; an extension of the Mitsunobu reaction, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 6331-6335.
55. M. Inovye, M. Ueno, K. Tsuchiya, N. Nakayama, T. Konoshi, T. Kitao, Alkali-metal cation recognition induced isomerization of spirobenzopyrans and spironaphthoxiazins possessing a crown ring as a recognition site: multifunctional artificial receptors, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 5377-5383.
56. D. M. Dishong, C. J. Diamond, M. I. Cinoman, G. W. Gokel, Crown cation complex effects. 20. Syntheses and cation binding properties of carbon-pivot lariat ethers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 586-593.
57. H. Ihmels, D. Otto, Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA – general principles and recent developments, *Top Curr. Chem.*, **2005**, 258, 161-204.
58. Z. Ma, J. R. Choudury, M. W. Wright, C. S. Day, G. Saluta, G. L. Kucera, U. Bierbach, A non-cross-linking platinum-acridine agent with potent activity in non-small-cell lung cancer, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 23, 7574-7580.
59. T. Bentin, P. E. Nielsen, Superior duplex DNA strand invasion by acridine conjugated peptide nucleic acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 21 6378-6379.
60. T. Shiraishi, P. E. Nielsen, Down-regulation of MDM2 and activation of p53 in human cancer cells by antisense 9-aminoacridine-PNA (peptide nucleic acid) conjugates, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, 4893-4902.
61. S. Bartoli, C. Bazzicalupi, S. Biagini, L. Borsani, A. Bencini, E. Faggi, C. Giorgi, C. Sangregorio, B. Valtancoli, Cu (II) complexation with an acridine-containing macrocycle.

- Assembly of water cluster chains within the cavity of tetranuclear metallomacrocycles, *Dalton Trans.*, **2009**, 1223-1230.
62. A. Valentini, D. Pucci, A. Crispini, G. Federici, S. Bernardini, Acridine orange based platinum (II) complexes inducing cytotoxicity and cell cycle perturbation in spite of GSTP1 up-regulation, *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, 161, 241-250.
63. A. Crispini, D. Pucci, S. Sessa, A. Cataldi, A. Napoli, A. Valentini, M. Ghedini, Synthesis and characterization of new transition metal complexes containing DNA intercalators of acridine family, *New J. Chem.*, **2003**, 27, 1497-1503.
64. M. Wu, W. Wu, X. Gao, X. Lin, Z. Xie, Synthesis of a novel fluorescent probe based on acridine skeleton used for sensitive determination of DNA, *Talanta*, **2008**, 75, 995-1001.
65. A. K. El-Naggar, J. G. Batsakis, K. Taegue, G. Giacco, V. F. Guinee, D. Swanson, Acridine orange flow cytometric analysis of renal cell carcinoma, *Am. J. Pathol.*, **1990**, 137, 275-280.
66. A. Scorilas, K. Agiamarnioti, K. Papadopoulos, Novel biotinylated acridinium derivatives: new reagents for fluorescence immunoassays and proteomics, *Clin. Chim. Acta*, **2005**, 357, 159-167.
67. A. A. Waldrop III, J. Fellers, C. P. H. Vary, Chemiluminescent determination of hydrogen peroxide with 9-acridinecarbonylimidazole and use in measurements of glucose oxidase and alkaline phosphatase activity, *Luminescence*, **2000**, 15, 169-182.
68. C. V. Kumar, E. H. Punzalan, W. B. Tan, Adenine-thymine base pair recognition by an anthryl probe from the DNA minor groove, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 7027-7040.
69. M. R. Duff Jr., V. K. Mudhivarthi, C. V. Kumar, Rational design of anthracene-based DNA binders, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 6, 1710-1721.
70. C. V. Kumar, E. H. Asuncion, Sequence dependent energy transfer from DNA to a simple aromatic chromophore, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 470-472.
71. N. K. Modukuru, K. J. Snow, B. S. Perrin Jr., J. Thota, C. V. Kumar, Contributions of a long side chain to the binding affinity of an anthracene derivative to DNA, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 11810-11818.

72. S. Moghaddas, P. Hendry, R. J. Geue, C. Qin, A. M. T. Bygott, Interaction of substituted cobalt (III) cage complexes with DNA, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 2085-2089.
73. C. Xavier, Tricarbonyl complexes for the design of specific radiopharmaceuticals for endogenous gene expression and membrane receptor imaging, Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa, **2009**.
74. M. B. Lyles, I. L. Cameron, Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA, *Biophys. Chem.*, **2002**, 96, 53-76.
75. E. Fredericq, C. Houssier, Study of the interaction of DNA and acridine orange by various optical methods, *Biopolymers*, **1972**, 11, 2281-2308.
76. B. E. Bowler, K. J. Ahmed, W. I. Sundquist, L. S. Hollis, E. E. Whang, S. J. Lippard, Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of (1,2-diaminoethane)platinum (II) complexes linked to the DNA intercalator acridine orange by trimethylene and hexamethylene chains, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 11, 1299-1306.
77. J. H. Tan, Q. Zhang, Z. Huang, Y. Chen, X. Wang, L. Gu, J. Wu, Synthesis, DNA binding and cytotoxicity of new pyrazole emodin derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, 41, 1041-1047.
78. S. J. Atherton, A. Murrison, Photochemistry of intercalated methylene blue: photoinduced hydrogen atom abstraction from guanine and adenine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 1816-1822.
79. E. Kuruvilla, P. C. Nandajan, G. B. Schuster, D. Ramaiah, Acridine-viologen dyads: selective recognition of single-stranded DNA through fluorescence enhancement, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 4295-4298.
80. J. Dey, J. L. Hayres, I. M. Warner, A. K. Chandra, Fluorescence spectral study of 9-acridine carboxylic acid and its methyl-ester. Understanding the unusual fluorescence behavior of 9-anthracic acid, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101, 2271-2278.
81. W. A. Denny, G. J. Atwell, B. C. Baguley, L. P. G. Wakelin, Potential antitumor agents. 44. Synthesis and antitumor activity of new classes of diacridines: importance of linker chain

- rigidity for DNA binding kinetics and biological activity, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 1568-1574.
82. N. C. Santos, M. Prieto, M. A. R. B. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes. An emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, 1612, 123-135.
83. M. R. Duff, W. B. Tan, A. Bhambhani, B. S. Perrin, Jr., J. Thota, A. Rodger, C. V. Kumar, Contributions of hydroxyethyl groups to the DNA binding affinities of anthracene probes, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 20693-20701.
84. L.Zékány, I. Nagypál, Computational Methods for the Determination of Stability Constants, **1985**, Plenum Press, New York.
85. N. Kure, T. Sano, S. Harada, T. Yasunaga, Kinetics of the interaction between DNA and acridine orange, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1988**, 61, 643-653.
86. J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz, Interactions of acridine orange with double stranded nucleic acids. Spectral and affinity studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1987**, 5, 127-143.
87. A. Rodger, S. Taylor, G. Adlam, I. S. Blagbrough, I. S. Haworth, Multiple DNA binding modes of anthracene-9-carbonyl-N¹-spermine, *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 861-872.
88. A. M. Pyle, J. P. Rhemann, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, Mixed-ligand complexes of rhenium (II): factors governing binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3051-3058.
89. J. M. Crenshaw, D. E. Graves, W. A. Denny, Interactions of acridine antitumor agents with DNA: binding energies and groove preferences, *Biochemistry* **1995**, 34, 13682-13687.
90. S. Far, A. Kossanyi, C. V. Béauer, N. Gresh, E. Taillandier, M. P. Fauvet, Bis- and tris-DNA intercalating porphyrins designed to target the major groove: synthesis of acridylbis-arginyl-porphyrins, molecular modelling of their DNA complexes, and experimental tests, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1781-1797.
91. D. E. Troutner, W. A. Volkert, T. J. Hoffman, R. A. Holmes, A neutral lipophilic complex of ^{99m}Tc with a multidentate amine oxime, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1984**, 35, 467-470.
92. A. Lansiaux, F. Tanius, Z. Mishal, L. Dassonneville, A. Kumar, C. E. Stephens, Q. Hu, W. D. Wilson, D. W. Boykin, C. Bailly, Distribution of furamidine analogues in tumor cells:

- targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 7219-7229.
93. R. Vitor, Complexos de rénio e tecnécio com ligandos N-heterocíclicos dirigidos ao núcleo de células tumorais: da imagiologia molecular à radioterapia com ^{99m}Tc , Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa, **2007**.
94. E. G. Garayoa, D. Rüegg, P. Bläuenstein, M. Zwimpfer, I. U. Khan, V. Maes, A. Blanc, A. G. B. Sickinger, D. A. Tourwé, P. A. Schubiger, Chemical and biological characterization of new $\text{Re}(\text{CO})_3/[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3$ bombesin analogues, *Nucl. Med. Biol.*, **2007**, 34, 17-28.
95. T. W. Moody, Peptides and growth factors in non-small cell lung cancer, *Peptides*, **1996**, 17, 545-555.
96. Y. Qin, T. Ertl, R. Z. Cai, G. Halmos, A. V. Schally, Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cells *in vivo* and *in vitro*, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 1035-1041.
97. S. Radulovic, A. V. Schally, H. Reile, G. Halmos, K. Szepeshazi, K. Groot, S. Milovanovic, G. Miller, T. Yano, Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice, *Acta Oncol.*, **1994**, 33, 693-701.
98. J. J. Leban, A. Laandavazo, J. D. McDermed, E. J. Diliberto, M. Jansen, B. Stockstill, F. C. Kull, Potent gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists derived from GRP(19-27) with a C-terminal $^{\text{D}}\text{Pro}_{\psi}[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Phe-NH}_2$ and N-terminal aromatic residues, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 439-445.
99. K. Szepeshazi, A. V. Schally, K. Groot, G. Halmos, Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14-27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters, *Int. J. Cancer*, **1993**, 54, 282-289.
100. B. E. Rogers, H. M. Bigott, D. W. McCarthy, D. D. Manna, J. Kim, T. L. Sharp, M. J. Welch, MicroPET imaging of a gastrin-releasing peptide receptor-positive tumor in a mouse model of human prostate cancer using a ^{64}Cu -labeled bombesin analogue, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 756-763.

101. A. F. Prasanphanich, P. K. Nanda, T. L. Rold, L. Ma, M. R. Lewis, J. C. Garrison, T. J. Hoffman, G. L. Sieckman, S. D. Figueroa, C. J. Smith, [⁶⁴Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂] targeting vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2007**, 104, 12462-12467.
102. T. J. Hoffman, T. P. Quinn, W. A. Volkert, Radiometallated receptor-avid conjugates for specific *in vivo* targeting of cancer cells, *Nucl. Med. Biol.*, **2001**, 28, 527-539.
103. M. de Jong, W. H. Bakker, W. A. P. Breeman, B. F. Bernard, L. J. Hofland, T. J. Visser, A. Srinivasan, M. Schimdt, M. Behe, H. R. Macke, E. P. Krenning, Pre-clinical comparison of [DTPA⁰] octreotide, [DTPA⁰,Tyr³] octreotide as carriers for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy, *Int. J. Cancer*, **1998**, 75, 406-411.
104. M. de Jong, W. H. Bakker, E. P. Krenning, W. A. P. Breeman, M. E. Plujim, B. F. Bernerd, T. J. Visser, E. Jermann, M. Behe, P. Powell, H. R. Macke, Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA⁰,D-Phe¹,Tyr³]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1997**, 24, 368-371.
105. B. E. Rogers, S. F. McLean, R. L. Kirkman, D. D. Manna, S. J. Bright, C. C. Olsen, A. D. Myracle, M. S. Mayo, D. T. Curiel, D. J. Buchsbaum, *In vivo* localization of [¹¹¹In]-DTPA-D-Phe¹-Octreotide to human ovarian tumor xenografts induced to express the somatostatin receptor subtype 2 using an adenoviral vector, *Clin. Cancer. Res.*, **1999**, 5, 383-393.
106. T. Martins, J. S. Lino, S. Ramos, L. Oliveira, ^{99m}Tc-Depreotide scintigraphy in the evaluation of indeterminate pulmonary lesions: clinical experience, *Cancer Bioth. Radiopharm.*, **2004**, 19, 253-259.
107. M. Ginj, J. Chen, M. A. Walter, V. Eltschinger, J. C. Reubi, H. R. Maecke, Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 1136-1145.
108. M. van Essen, E. P. Krenning, W. H. Bakker, W. W. Herder, M. O. van Aken, D. J. Kwekkeboom, Peptide receptor radionuclide therapy with ¹⁷⁷Lu-octreotate in patients with foregut carcinoid tumours of bronchial, gastric and thymic origin, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 1219-1227.

109. B. A. Nock, A. Nikolopoulou, A. Galanis, P. Cordopatis, B. Waser, J.-C. Reubi, T. Maina, Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with ^{99m}Tc : a preclinical study, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 100-110.
110. E. G. Garayoa, C. Schweinsberg, V. Maes, L. Brans, P. Blauenstein, D. A. Tourwe, R. Schibli, P. A. Schubiger, Influence of the molecular charge on the biodistribution of bombesin analogues labeled with the $[\text{Tc}(\text{CO})]$ -core, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2409-2416.
111. A. Anastasi, V. Erspamer, M. Bucci, Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes, *Experientia*, **1971**, 27, 166-7.
112. J. J. Parry; T. S. Kelly, R. Andrews, B. E. Rogers, *In vitro* and *in vivo* evaluation of ^{64}Cu -labeled DOTA-linker-bombesin(7-14) analogues containing different amino acid linker moieties, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 1110-1117.
113. H. O. Hamazaki, M. Iwabuchi, F. Maekawa, Development and function of bombesin-like peptides and their receptors, *Int. J. Dev. Biol.*, **2005**, 49, 239-300.
114. C. J. Smith, H. Gali, G. L. Sieckman, C. Higginbotham, W. A. Volkert, T. J. Hoffman, Radiochemical investigations of $\text{Tc-NS-X-BBN}[7-14]\text{NH}_2$: an *in vitro/in vivo* structure/activity relationship study where X = 0-, 3-, 5-, 8-, and 11- carbon tethering moieties, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 93-102.
115. A. Fleischmann, U. Läderach, H. Friess, M. W. Buechler, J. C. Reubi, Bombesin receptors in distinct tissue compartments of human pancreatic diseases, *Lab. Invest.*, **2000**, 80, 1807-1817.
116. C. J. Smith, W. A. Volkert, T. Hoffman, Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes, *Nucl. Med. Biol.*, **2005**, 32, 733-740.
117. F. Scopinaro, G. Vicentis, A. D. Varvarigou, Use of radiolabeled bombesin in humans, *J. Clin. Oncol.*, **2005**, 23, 3170-3171.
118. E. A. Fragogeorgi, C. Zikos, E. Gourni, P. Bouziotis, M. P. Petsotas, G. Loudos, N. Mitsokapas, S. Xanthopoulos, M. M. Vavayanni, E. Livaniou, A. D. Varvarigou, S. C. Archimandritis, Spacer site modifications for the improvement of the *in vitro* and *in vivo*

- binding properties of Tc-N₃S-X-bombesin[2-14] derivatives, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 856-867.
- 119.** C. J. Smith, H. Gali, G. L. Sieckman, D. L. Hayes, N. K. Owen, D. G. Mazuru, W. A. Volkert, T. J. Hoffman, Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH₂: an *in vitro/in vivo* assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells, *Nucl. Med. Biol.*, **2007**, *30*, 101-109.
- 120.** T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2858-2902 .
- 121.** M. Giblin, B. Veerendra, C. J. Smith, Radiometallation of receptor-specific peptides for diagnosis and treatment of human cancer, *In Vivo*, **2005**, *19*, 9-30.
- 122.** S. Liu, D. S. Edwards, Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 7-34.
- 123.** M. Shokeen, C. J. Anderson, Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (PET), *Acc Chem. Res.*, **2009**, *42*, 832-841.
- 124.** R. E. Mewis, S. J. Aschibald, Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, *254*, 1686-1712.
- 125.** A. E. Goeta, J. A. K. Howard, D. Maffeo, H. Puschmann, J. A. G. Williams, D. S. Yufit, Cooper (II) complexes of isomeric tetraazamacrocyclic ligands 1,11- and 1,8-bis(2-pyridylmethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane and of the 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-5,12-dione analogue at neutral and basic pH, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 1873-1880.
- 126.** X. Chen, R. Park, Y. Hou, M. Tohme, A. H. Shahinian, J. R. Bading, P. S. Conti, MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys³]bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts, *J. Nucl. Med.*, **2004**, *45*, 1390-1397.
- 127.** J. Fichna, A. Janecka, Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 3-17.

128. L. M. L.-Rodriguez, Z. Kovacs, The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 391-402.
129. Z. Liu, G. Niu, F. Wang, X. Chen, ^{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.
130. H. Zhang, J. Schuhmacher, B. Waser, D. Wild, M. Eisenhut, DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 1198-1209.
131. Z. Liu, Y. Yan, S. Liu, F. Wang, X. Chen, ^{18}F , ^{64}Cu , and ^{68}Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 1016-1025.
132. M. Hoffman, S. Machtens, C. Stief, F. Länger, A. R. Boerner, H. Maecke, W. H. Knapp., Feasibility of Ga-68-DOTABOM PET in prostate carcinoma patients, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2004**, 31, S253.
133. W. R. Harris, V. L. Pecoraro, Thermodynamic binding constants for gallium transferrin, *Biochemistry*, **1983**, 22, 292-299.
134. W. R. Harris, Y. Chen, K. Wein, Equilibrium constants for the binding of indium (III) to human serum transferrin, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4991-4998.
135. C. T. Wang, Y. Li, S. Liu, Synthesis and structural characterization of complexes of a DO3A-conjugated triphenylphosphonium cation with diagnostically important metal ions, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 8988-8997.
136. H. Zhang, J. Chen, C. Waldherr, K. Hinni, B. Waser, J. C. Reubi, H. R. Maecke, Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of Pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-77, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 6707-6715.
137. M. de Visser, H. F. Bernard, J. L. Erion, M. A. Schmidt, A. Srinivasan, B. Waser, J. C. Reubi, E. P. Krenning, M. de Jong, Novel ^{111}In -labeled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumours, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 1228-1238.

138. C. L. Ho, L. C. Chen, W. C. Lee, S. P. Chiu, W. C. Hsu, Y. H. Wu, C. H. Yeh, M. G. Stabin, M. L. Jan, W. J. Lin, T. W. Lee, C. H. Chang, Receptor-binding, biodistribution, dosimetry, and microSPECT/CT imaging of ^{111}In -[DTPA1, Lys³, Tyr⁴]-bombesin analogue in human prostate tumor-bearing mice, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2009**, 24, 435-443.
139. L. E. Lantry, E. Cappelletti, M. E. Maddalena, J. S. Fox, W. Feng, J. Chen, R. Thomas, S. M. Eaton, N. J. Bogdan, T. Arunachalam, J. C. Reubi, N. Raju, E. C. Metcalfe, K. E. Linder, R. E. Swenson, H. F. Tweedle, A. D. Nunn, ^{177}Lu -AMBA: Synthesis and characterization of a selective ^{177}Lu -labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer, *J. Nucl. Med.*, **2006**, 47, 1144-1152.
140. B. Waser, V. Eltschinger, K. Linder, A. Nunn, J. C. Reubi, Selective *in vitro* targeting of GRP and NMB receptors in human tumors with the new bombesin tracer ^{177}Lu -AMBA, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 95-100.
141. M. E. Maddalena, J. Fox, J. Chen, W. Feng, A. Cagnolini, K. E. Linder, M. F. Tweedle, A. D. Nunn, L. E. Lantry, ^{177}Lu -AMBA biodistribution, radiotherapeutic, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression, *J. Nucl. Med.*, **2009**, 50, 2017-2024.
142. R. Thomas, J. Chen, M. M. Roudier, R. L. Vessella, L. E. Lantry, A. D. Nunn, *In vitro* binding evaluation of ^{177}Lu -AMBA, a novel ^{177}Lu -labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy in human tissues, *Clin. Exp. Metastasis*, **2009**, 26, 105-119.
143. <http://www.bioadvance.com/portfolio.asp>
144. B. E. Rogers, D. D. Manna, A. Safavy, *In vitro* and *in vivo* evaluation of a ^{64}Cu -labeled polyethylene glycol-bombesin conjugate, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2004**, 19, 25-34.
145. K. S. Woodin, K. J. Heroux, C. A. Boswell, E. H. Wong, G. R. Weisman, W. Niu, S. A. Tomellini, C. J. Anderson, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, Kinetic inertness and electrochemical behavior of copper (II) tetraazamacrocyclic complexes: possible implications for *in vivo* stability, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, 23, 4829-4833.
146. A. F. Prasanphanich, L. Retzlöff, S. R. Lane, P. K. Nanda, G. L. Sieckman, T. L. Rold, L. Ma, S. D. Figueroa, S. V. Sublett, T. J. Hoffman, C. J. Smith, *In vitro* and *in vivo* analysis of [^{64}Cu -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*, 171-181.
- 147.** S. R. Lane, P. Nanda, T. L. Rold, G. L. Sieckman, S. D. Figueroa, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson, C. J. Smith, Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists, [⁶⁴Cu-NO2A-(X)-BBN(7-14)NH₂], in a prostate tumor xenografted mouse model, *Nucl. Med. Biol.*, **2010**, *37*, 751-761.
- 148.** K. Lin, A. Luu, K. E. Baidoo, H. H. Gargari, M. K. Chen, K. Brennenman, R. Pili, M. Pomper, M. A. Carducci, H. N. Wagner Jr., A new high affinity technetium-99m-bombesin analogue with low abdominal accumulation, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 43-50.
- 149.** K. Abiraj, R. Mansi, M. L. Tamma, F. Forrer, R. Cescato, J. C. Reubi, K. G. Akyel, H. R. Maecke, Tetraamine-derived bifunctional chelators for technetium-99m labelling: synthesis, bioconjugation and evaluation as targeted SPECT imaging probes for GRP-receptor-positive tumours, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 2115-2124.
- 150.** B. L. Faintuch, R. L. S. R. Santos, A. L. F. M. Souza, T. J. Hoffman, M. Greeley, C. J. Smith, ^{99m}Tc-HYNIC-bombesin (7-14)NH₂: radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA=ethylenediamine-N,N'-diacet acid), tricine, and nicotinic acid, *Synt. React. Met-Org. Nano-Met. Chem.*, **2005**, *35*, 43-51.
- 151.** J. Shi, B. Jia, Z. Liu, Z. Yang, Z. Yu, K. Chen, X. Chen, S. iu, F. Wang, ^{99m}Tc-Labeled bombesin(7-14)NH₂ with favorable properties for SPECT imaging of colon cancer, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1170-1178.
- 152.** J. U. Kunstler, B. Veerendra, S. D. Figueroa, G. L. Sieckman, T. L. Rold, T. J. Hoffman, C. J. Smith, H. J. Pietzsch, Organometallic ^{99m}Tc (III) '4+1' bombesin (7-14) conjugates: synthesis, radiolabeling, and *in vitro/in vivo* studies, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 1651-1661.
- 153.** C. Van de Wiele, F. Dumont, R. V. Broecke, W. Oosterlinck, V. Cocquyt, R. Serreyn, S. Peers, J. Thornback, G. Slegers, R. A. Dierckx, Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2000**, *27*, 1694-1699.

154. C. Van de Wiele, P. Phonteyne, P. Pauwels, I. Goethals, R. Van den Broecke, V. Cocquyt, R. A. Dierckx, Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry, *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, 260-264.
155. B. Nock, A. Nikolopoulou, E. Chiotellis, G. Loudous, D. Maintas, J. C. Reubi, T. Maina, [^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2003**, 30, 247-258.
156. R. Cescato, T. Maina, B. Nock, A. Nikolopoulou, D. Charalambidis, V. Piccand, J. C. Reubi, Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting, *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, 318-326.
157. Technetium 99m Demobesin-4 for Imaging Procedures in Patients with Prostate Cancer, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00989105>.
158. R. Bella, E. G. Garayoa, M. Bähler, P. Bläuenstein, R. Schibli, P. Conrath, D. Tourwé, P. A. Schubiger, A ^{99m}Tc(I)-postlabeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 599-604.
159. C. J. Smith, G. L. Sieckman, N. K. Owen, D. L. Hayes, D. G. Mazuru, R. Kannan, W. A. Volkert, T. J. Hoffman, Radiochemical investigations of gastrin-releasing peptide receptor-specific [^{99m}Tc(X)(CO)₃-Dpr-Ser-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH₂)] in PC-3, tumor-bearing, rodent models: syntheses, radiolabeling, and *in vitro/in vivo* studies where Dpr= 2,3 diaminopropionic acid and X=H₂O or P(CH₂OH)₃, *Cancer Res.*, **2003**, 63, 4082-4088.
160. A. F. Prasanphanich, S. R. Lane, S. D. Figueroa, L. Ma, T. L. Rold, G. L. Sieckman, T. J. Hoffman, J. M. Mccrate, C. J. Smith, The effects of linking substituents on the *in vivo* behavior of site- directed, peptide-based, diagnostic radiopharmaceuticals, *In Vivo*, **2007**, 21, 1-16.
161. K. Zelenka, L. Borsig, R. Alberto, Trifunctional ^{99m}Tc radiopharmaceuticals: metal-mediated conjugation of a peptide with a nucleus targeting intercalator, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 1071-1078.

162. S. L. Lane, B. Veerendra, T. L. Rold, G. L. Sieckman, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson, C. J. Smith, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DTMA}$ bombesin conjugates having high affinity for the GRP receptor, *Nucl. Med. Biol.*, **2008**, 35, 263-272.
163. E. A. Nigg, Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation, *Nature*, **1997**, 386, 779-787.
164. P. Fanara, M. R. Hodel, A. H. Corbett, A. E. Hodel, Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin α interaction through fluorescence depolarization, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 21218-21223.
165. W. Yang, J. Gelles, S.M. Musser, Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101, 12887-12892.
166. M. Stewart, Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle, *Mol. Cell Bio.*, **2007**, 8, 195-208.
167. R. B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
168. M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biol.*, **2006**, 33, 239-254.
169. W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal, *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 18, 93-105.
170. S. Alves, Complexos com a unidade $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ para o desenvolvimento de radiofármacos específicos para receptores de péptidos, Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa, **2005**.
171. S. M. Okarvi, I. A. Jammaz, Synthesis and evaluation of a technetium-99m labeled cytotoxic bombesin peptide conjugate for targeting bombesin receptor-expressing tumors, *Nucl. Med. Biol.*, **2010**, 37, 277-288.
172. D. D. Perrin, W. L. Armarego, Purification of Laboratory Chemicals, 3rd edition, Pergamon Press, Oxford **1988**.
173. A. Wada, S. Kozawa, Instrument for the studies of differential flow dichroism of polymer solutions, *J. Polym. Sci. Part A*, **1964**, 2, 853-864.

174. D. P. Shrout, D. A. Lightner, An improved procedure for mono C-alkylation of pentone 2,4-dione with ω -bromoacid esters, *Synth. Commun.*, **1990**, 20, 2075-2080.
175. R. F. Vitor, S. Alves, J. D. G. Correia, A. Paulo, I. Santos, Rhenium (I) and technetium (I) tricarbonyl complexes anchored by bifunctional pyrazole-diamine and pyrazole-dithioether chelators, *J. Organomet. Chem.*, **2004**, 689, 4764-4774.
176. A. P. Karpacho, C. S. Kuell, Mono-protected diamines. N-*tert*-butoxycarbonyl- α,ω -alkanediamines from α,ω -alkanediamines, *Synthetic Comm.*, **1990**, 20, 2559-2564.
177. A. Drews, H. J. Pietzsch, R. Syhre, S. Seifert, K. Varnäs, H. Hall, C. Halldin, W. Kraws, P. Karlsson, C. Johnsson, H. Spies, B. Johannsen, Synthesis and biological evaluation of technetium (III) mixed-ligand complexes with high affinity for the cerebral 5-HT_{1A} receptor and the alpha1- adrenergic receptor, *Nucl. Med. Biol.*, **2002**, 29, 389-398.
178. M. Bullpit, W. Kitching, D. Doddrell, W. Adcock, Substituent effect of the bromomethyl group. Carbon-13 magnetic resonance study, *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 760-766.
179. N. Lazarova, S. James, J. Babich, J. Zubieta, A convenient synthesis, chemical characterization and reactivity of [Re(CO)₃(H₂O)₃]Br: the crystal and molecular structure of [Re(CO)₃(CH₃CN)₂]Br, *Inorg. Chem. Comm.*, **2004**, 7, 1023-1026.
180. C. V. Kumar, E. H. Asuncion, DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 8547-8553.
181. R. S. Lloyd, C. W. Haidle, D. L. Robberson, Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA, *Biochemistry*, **1978**, 17, 1890-1896.
182. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.
183. J. R. Abney, B. Cutler, M. L. Fillbach, D. Axelrod, B. A. Scalettar, Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure, *J. Cell Biol.*, **1997**, 137, 1459-1468.