

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**Análogos do Neuropeptídeo Y marcados com
⁶⁷Ga para Imagiologia Molecular dos
Recetores Y1 no Cancro de Mama**

Isabel Sofia Caldeira Rodrigues

Dissertação

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica

Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Análogos do Neuropeptído Y marcados com
⁶⁷Ga para Imagiologia Molecular dos
Recetores Y1 no Cancro de Mama**

Isabel Sofia Caldeira Rodrigues

Dissertação orientada pela Doutora Célia Maria da Cruz Fernandes e
co-orientada pela Doutora Isabel Rego dos Santos

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica
Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2014

A presente tese de dissertação enquadra-se no **Mestrado em Química Inorgânica Biomédica – Aplicações em Diagnóstico e Terapia** desenvolvido pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Departamento de Química e Bioquímica em parceria com o Instituto Superior Técnico – Campus Tecnológico e Nuclear (IST/CTN).

O trabalho experimental foi desenvolvido no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas (GCR) do IST/CTN sob orientação da Doutora Célia Maria da Cruz Fernandes e co-orientação da Professora Doutora Isabel Rego dos Santos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Célia, pelos conhecimentos transmitidos e pela orientação que prestou na tarefa de me acompanhar neste trilha de estudo, sempre com a sua voz crítica, conselheira e postura paciente. Agradeço, ainda, a dedicação, o incentivo e a amizade.

À Doutora Isabel, pelo desafio lançado para este estudo de investigação e pelo privilégio de ter aceite co-orientar cientificamente os trabalhos desenvolvidos. Agradeço, ainda, a oportunidade que me concedeu para realizar este trabalho no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.

À Doutora Paula Raposinho agradeço o empenho na realização dos estudos em linhas celulares e estudos de biodistribuição, os conhecimentos transmitidos, a sempre disponibilidade e as sugestões durante a escrita da tese.

À Elisabete Correia agradeço a realização dos estudos de biodistribuição.

Aos meus colegas do Grupo de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas agradeço a colaboração, o incentivo e a amizade. Agradeço em especial aos meus colegas de laboratório, Sofia, Susana, Filipe e Maurício.

Aos restantes investigadores do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas, em especial ao Doutor António Paulo e à Doutora Paula Campelo pelos conhecimentos transmitidos e pela sempre disponibilidade.

Aos meus colegas da Faculdade de Ciências, em especial à Patrícia pelo incentivo e amizade.

A todos os meus amigos agradeço o estímulo e amizade e, em especial à Lú, Sofia, Joana e Isabel simplesmente pela sua presença no meu caminho.

Ao Amadeu pela dedicação, incentivo e companheirismo durante a escrita da tese.

À família e, em especial à minha avó.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, sem eles nada disto teria sido possível. Agradeço-lhes a confiança, o incentivo e o exemplo.

Isabel

Resumo

O cancro de mama é a patologia do foro oncológico mais frequente na mulher ocidental, liderando a taxa de mortalidade devida a neoplasias malignas. Estudos recentes demonstraram que os recetores do Neuropeptido Y (NPY) se encontram sobreexpressos numa grande variedade de tumores, nomeadamente no cancro de mama. A elevada incidência do recetor Y1 (RY1) nos tumores da mama conduziu ao desenvolvimento de análogos do NPY quer para uso diagnóstico quer terapêutico. É neste âmbito que se insere o trabalho apresentado nesta tese, onde se descreve a síntese e avaliação biológica de novos análogos do NPY radiomarcados, que devem permanecer seletivos para o recetor Y1, explorando o seu potencial como radiofármacos para imagiologia molecular de cancro de mama.

Neste contexto foram preparados e avaliados análogos do NPY, contendo na sua estrutura química o ligando DOTA para posterior marcação com $^{67/68}\text{Ga}$. Os radiopéptidos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ – $^{67}\text{GaL3}$) foram obtidos com elevado rendimento e elevada pureza radioquímica (> 95%) a baixas concentrações de ligando. A sua avaliação *in vitro* mostrou que os radiopéptidos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ são estáveis em condições fisiológicas (PBS pH = 7,4; temperatura de 37°C) até às 48 horas de incubação. Além disso, os complexos são estáveis na presença de apotransferrina, uma proteína essencial ao transporte do Ferro e com capacidade de ligação ao Ga^{3+} . Adicionalmente, os complexos não sofreram transquelatação relevante na presença de DTPA.

Estudos de biodistribuição em ratinhos fêmea CD-1 saudáveis revelaram que os radiopéptidos em estudo ($^{67}\text{GaL1}$ – $^{67}\text{GaL3}$) são rapidamente excretados por via urinária e não apresentam acumulação preferencial em nenhum órgão ou tecido, exceto nos órgãos relacionados com as vias de excreção.

Foram efetuados estudos de internalização celular dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ em células tumorais MCF-7 (células do cancro de mama humano que expressam o RY1) e B16F1. Apesar da boa captação celular observada em ambas as linhas celulares para o radiopéptido $^{67}\text{GaL3}$, observou-se uma baixa internalização celular, apontando para um mecanismo de fixação não mediado pelo recetor ou sugerindo um eventual comportamento antagonista, que deverá ser investigado.

Abstract

Breast cancer is the most common oncologic disease in western woman, leading the mortality rate due to malignant neoplasms. Recent studies have shown that Neuropeptide Y receptors (NPY) are overexpressed in a variety of tumors, including breast cancer. The high incidence of Y1 receptor in breast tumors has led to the development of NPY analogs either for diagnostic or therapeutic use. These studies prompted us to design new radiolabeled NPY analogs, which should remain Y1-receptor selective, to exploit their potential as radiopharmaceuticals for breast cancer.

In this context, were prepared and evaluated new DOTA-based NPY analogs for subsequent radiolabeling with $^{67/68}\text{Ga}$. The radiopeptides of ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ – $^{67}\text{GaL3}$) were obtained in high radiochemical yield and purity (> 95%) at low ligand concentration. The *in vitro* studies showed that radiopeptides $^{67}\text{GaL1}$ and $^{67}\text{GaL3}$ are stable under physiological conditions (PBS pH = 7,4; 37 °C) for up to 48 hours of incubation. Moreover, the complexes are stable in the presence of physiological concentrations of apo-transferrin, which is a relevant protein in the transport of iron and has the capability to bind Ga^{3+} . Additionally, the complexes do not undergo relevant transchelation in the presence of DTPA.

Biodistribution studies in healthy CD-1 female mice revealed that radiopeptides ($^{67}\text{GaL1}$ – $^{67}\text{GaL3}$) are rapidly excreted mainly by the urinary system and show no preferential accumulation to any organ or tissue, except in organs related to excretion pathways.

Cellular internalization studies was assessed in suitable human cancer cell lines, such as MCF-7 (human breast cancer cells expressing Y1R) and B16F1. Despite the good cellular uptake observed in both cell lines for $^{67}\text{GaL3}$ only a low cellular internalization was found indicating a non-receptor mediated uptake or an antagonistic behavior, that should be further investigated.

Palavras – chave

Cancro de mama

Imagiologia Molecular

Radiofármacos Específicos

NPY

Recetor Y1

Complexos de $^{67/68}\text{Ga}$

Keywords

Breast Cancer

Molecular Imaging

Specific Radiopharmaceuticals

NPY

Y1 receptor

$^{67/68}\text{Ga}$ complexes

Índice Geral

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Palavras – chave	xiii
Keywords	xiii
Índice Geral	xv
Índice de Figuras	xvii
Índice de Esquemas	19
Índice de Tabelas	xxi
Lista de símbolos e abreviaturas	xxiii
Preâmbulo	xxvii
1. Introdução	3
1.1. Cancro de mama	3
1.1.1. Patogénese e diagnóstico	3
1.2. Medicina Nuclear e radiofármacos: considerações gerais	3
1.3. Radiofármacos no diagnóstico de cancro de mama	5
1.4. Sondas radioativas baseadas em radiometais	7
1.4.1. Gálio	8
1.4.2. Ligandos bifuncionais para o Gálio	12
1.3.3. Sondas radioativas	14
1.5. Objetivo do trabalho	21
2. Complexos de ⁶⁷Ga de análogos do NPY	25
2.1 Introdução	25
2.2 Radiosíntese e caracterização dos complexos [⁶⁷ GaL]	27
2.3 Estudos de Estabilidade <i>in Vitro</i>	36
2.3.1 Estabilidade à temperatura ambiente	37
2.3.2. Estabilidade em PBS 0,1M pH7,4 a 37°C	38
2.3.3. Estabilidade na presença de DTPA e apotransferrina	39

2.3.4. Determinação da Ligação às Proteínas Plasmáticas	40
2.4 Avaliação biológica dos complexos [⁶⁷ GaL]	42
2.4.1 Internalização em linhas celulares MFC-7 e B16F1	42
2.4.2 Estudos de biodistribuição e estabilidade <i>in vivo</i> / metabolização	47
3. Conclusão e Perspetivas	63
4. Procedimento Experimental	67
4.1. Solventes e reagentes	67
4.2. Técnicas de caracterização e purificação dos complexos [⁶⁷ GaL]	67
4.2.1. Condições de manipulação de compostos radioativos	67
4.2.2. Medição da atividade das soluções radioativas	67
4.2.3. Medição de pH	67
4.2.4. Espectrofotometria UV-Vis	68
4.2.5. Cromatografia instantânea de camada fina - sílica gel (ITLC-SG)	68
4.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	68
4.3. Radiosíntese de [⁶⁷ GaCl ₃]	70
4.4. Radiosíntese e caracterização dos complexos [⁶⁷ GaL]	70
4.4.1. Radiosíntese do complexo [GaDOTA]-NPY1 (⁶⁷ GaL1)	70
4.4.2. Radiosíntese do complexo [Lys(DOTA)]-NPY1 (⁶⁷ GaL2)	70
4.4.3. Radiosíntese do complexo Ac-[Lys(DOTA)]-NPY1 (⁶⁷ GaL3)	71
4.5. Estudos de estabilidade <i>in vitro</i>	71
4.5.1. Estabilidade à temperatura ambiente	71
4.5.2. Estabilidade em tampão fosfato salino PBS 0,1M (pH 7,4) a 37°C e/ou NaCl 0,9% a 37°C	72
4.5.3 Estabilidade na presença de DTPA e apotransferrina	72
4.5.4. Determinação da ligação às proteínas plasmáticas	72
4.5.5. Determinação da lipofilia dos complexos de ⁶⁷ Ga pelo método de <i>Shake-Flask</i>	73
4.6 Avaliação biológica dos complexos [⁶⁷ GaL]	73
4.6.1. Internalização em linhas celulares MFC-7 e B16F1	73
4.6.2. Estudos de biodistribuição em murganhos <i>Charles River</i>	75
5. Referências Bibliográficas	79

Índice de Figuras

Figura 1.1 Abordagem bifuncional para conceção de radiofármacos específicos de elementos metálicos.	4
Figura 1.2 Sondas moleculares para diagnóstico de cancro de mama.	6
Figura 1.3 Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.	10
Figura 1.4 Esquema de decaimento do ^{68}Ge .	10
Figura 1.5 Produção de ^{68}Ge pela reação ($p,2n$) em alvos de ^{68}Ga .	11
Figura 1.6 Fórmula estrutural do DOTA-TOC (a) e farmacocinética do ^{68}Ga -DOTA-TOC num paciente com TNE do pulmão (b) .	11
Figura 1.7 LBF acíclicos: (a) ácido cítrico, (b) EDTA, (c) DTPA e (d) DFO.	12
Figura 1.8 Fórmula estrutural do DOTA (a) e do proquelato monoreativo DOTA($t\text{-Bu}$) ₃ (b) .	13
Figura 1.9. LBF macrocíclicos: (a) NOTA, (b) DOTA e (c) TRAP.	14
Figura 2.1 Componentes usados na síntese e radiomarcagem dos análogos NPY.	25
Figura 2.2 Estrutura química do péptido NPY1.	26
Figura 2.3 Esquema de acoplamento entre o DOTA e o NPY1.	26
Figura 2.4 Estrutura química dos conjugados peptídicos L1 (E1), L2 (E2) e L3 (E3) com os diferentes espaçadores.	27
Figura 2.5 Variação do rendimento de marcação (%) em função da concentração final de ligando L1 (M) usando como precursor o Citrato de Gálio.	28
Figura 2.6 Variação do rendimento de marcação (%) em função da concentração final de ligando L1 (M) usando como precursor o $^{67}\text{GaCl}_3$.	30
Figura 2.7 Radiocromatogramas do $^{67}\text{GaL1}$ em (A) NaCl 0,9%/HCl 0,1M e (B) Metanol/HCl 6M (95/5).	31
Figura 2.8 Cromatogramas de HPLC (deteção γ) do complexo $^{67}\text{GaL1}$ após purificação e do $^{67}\text{GaCl}_3$.	31
Figura 2.9 Cromatogramas de HPLC do complexo GaL1 (deteção UV a 256 nm) e do complexo análogo $^{67}\text{GaL1}$ (deteção γ).	32
Figura 2.10 Variação do rendimento de marcação (%) em função do pH final para o complexo $^{67}\text{GaL2}$.	33
Figura 2.11 Cromatogramas de HPLC (deteção γ) do complexo $^{67}\text{GaL2}$ após purificação e do $^{67}\text{GaCl}_3$.	34
Figura 2.12 Estabilidade à temperatura ambiente dos complexos de ^{67}Ga nos diferentes intervalos de tempo.	37
Figura 2.13 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ (deteção γ) à temperatura ambiente nos diferentes intervalos de tempo.	37

Figura 2.14 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ (deteção γ) em PBS 0,1M (pH7,4; 37°C).	38
Figura 2.15 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL2}$ (deteção γ) em NaCl0,9% a 37°C.	38
Figura 2.16 Estabilidade do complexo $^{67}\text{GaL3}$ na presença de DTPA.	39
Figura 2.17 Estudo de competição com a apotransferrina dos complexos [$^{67}\text{GaL1}$] e [$^{67}\text{GaL3}$] nos diferentes intervalos de tempo.	40
Figura 2.18 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ relativos à estabilidade em apotransferrina após incubação a 37°C às 0,5h, 24h e 72h.	40
Figura 2.19 Percentagem de ligação às proteínas plasmáticas dos complexos de ^{67}Ga nos vários tempos de incubação (37°C).	41
Figura 2.20 Estabilidade em soro humano dos complexos de ^{67}Ga nos diferentes tempos em estudo.	41
Figura 2.21 Captação celular (captação na membrana celular e internalização) dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ (a) e $^{67}\text{GaL3}$ (b) em células MCF-7 para diferentes períodos de tempo (37°C). A atividade associada à membrana celular e internalizada foram expressas em percentagem de atividade total (média \pm desvio padrão de quatro replicados).	43
Figura 2.22 Internalização (a) e captação na membrana (b) dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ em linhas celulares MCF-7 para diferentes períodos de tempo (37°C).	44
Figura 2.23 Captação celular e internalização do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado em células MCF-7 nos diferentes períodos de tempo (37°C) com e sem bloqueio do recetor Y1. A associação à membrana celular e a atividade de internalização está expressa em percentagem de atividade total (média \pm desvio padrão de quatro replicados).	45
Figura 2.24 Internalização (a) e captação na membrana (b) do complexo $^{67}\text{GaL1}$ em linhas celulares MCF-7 e B16F1 para diferentes períodos de tempo (37°C).	46
Figura 2.25 Internalização (a) e captação na membrana (b) do complexo $^{67}\text{GaL3}$ em linhas celulares MCF-7 e B16F1 para diferentes períodos de tempo (37°C).	47
Figura 2.26 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 60 e 120 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado.	50
Figura 2.27 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado e do sangue de murganhos recolhido aos 60 minutos p.i. (deteção γ).	51
Figura 2.28 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado e da urina de murganhos recolhida aos 60 e 120 minutos p.i. (deteção γ).	51

Figura 2.29 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 30 e 60 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo ⁶⁷ GaL2 não purificado e purificado.	53
Figura 2.30 Resultados da biodistribuição (% A.I./g órgão) esplênica, hepática e pulmonar aos 30 e 60 minutos para o complexo ⁶⁷ GaL2 antes e após purificação.	54
Figura 2.31 Cromatogramas de HPLC do complexo ⁶⁷ GaL2 purificado e do sangue de murganhos recolhido aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).	54
Figura 2.32 Cromatogramas de HPLC do complexo ⁶⁷ GaL2 purificado e da urina de murganhos recolhida aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).	55
Figura 2.33 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 30 e 60 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo ⁶⁷ GaL3 não purificado e purificado.	57
Figura 2.34 Cromatogramas de HPLC do complexo ⁶⁷ GaL3 purificado e do sangue de murganhos recolhido aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).	58
Figura 2.35 Cromatogramas de HPLC do complexo ⁶⁷ GaL3 purificado e da urina de murganhos recolhida aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).	58
Figura 2.36 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 60 minutos para os principais órgãos/tecidos dos complexos ⁶⁷ GaL1, ⁶⁷ GaL2 e ⁶⁷ GaL3 após purificação.	59

Índice de Esquemas

Esquema 2.1 Radiosíntese do complexo [⁶⁷ GaL1].	30
Esquema 2.2 Radiosíntese do complexo [⁶⁷ GaL2].	34
Esquema 2.3 Radiosíntese do complexo [⁶⁷ GaL3].	35

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Sondas moleculares para diagnóstico de cancro de mama em uso clínico e em investigação.	6
Tabela 1.2 Radiopéptidos em estudos clínicos na Europa, respetivos recetores peptídicos e indicações clínicas.	16
Tabela 1.3 Expressão dos recetores do NPY em tumores humanos e nos tecidos normais correspondentes.	18
Tabela 2.1 Condições de otimização de marcação para o complexo [⁶⁷ GaL1].	29
Tabela 2.2 Condições de otimização de marcação para o complexo [⁶⁷ GaL2].	32
Tabela 2.3 Condições de otimização de marcação para o complexo [⁶⁷ GaL3]	35
Tabela 2.4 Condições experimentais de preparação e características dos complexos de ⁶⁷ Ga.	36
Tabela 2.5 Valores de Log D _{O/w} determinados para os complexos de ⁶⁷ Ga.	42
Tabela 2.6 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 60 e 120 minutos do complexo ⁶⁷ GaL1 após purificação.	49
Tabela 2.7 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 30 e 60 minutos do complexo ⁶⁷ GaL2 antes e após purificação.	52
Tabela 2.8 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 30 e 60 minutos do complexo ⁶⁷ GaL3 antes e após purificação.	56
Tabela 2.9 Valores de D _{O/w} (pH7,4) e excreção total (%A.I./g órgão) aos 60 minutos determinados para os complexos de ⁶⁷ Ga purificados.	59
Tabela 4.1 Sequência de eluição e respetivos gradientes no método 1.	69
Tabela 4.2 Sequência de eluição e respetivos gradientes no método 2.	69
Tabela 4.3 Condições experimentais usadas na preparação dos complexos de ⁶⁷ Ga.	71
Tabela 4.4 Valores de Log D _{O/w} determinados para os complexos de ⁶⁷ Ga.	73

Lista de símbolos e abreviaturas

¹⁸F- FDG - [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose

A.I. - atividade injetada

ACN - acetonitrilo

Adc - adenocarcinoma

ALARP - *As Low as reasonably practicable*

AMBA - DO₃A-CH₂CO-Gly-4-aminobenzoil-Q-W-A-V-G-H-L-M-NH₂

Aoc - ácido amino octanóico

BBN - bombesina

BRCA - *BReast CAncer*

BSA - albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

Ca - carcinoma

CCK - colecistoquinina

CE - captura eletrónica

cpm - contagens por minuto

CT - Tomografia Computorizada

D.I. - dose injetada

Da - Dalton

DFO - desferrioxamina

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Do_w - coeficiente de distribuição octanol-água

DOTA - ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

DTPA - ácido dietilenotriaminopentacético

e⁻ - electrão

e.g. - por exemplo

e.v. - via endovenosa

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGFR - recetor do fator de crescimento epidérmico

ESI-MS - espectrometria de massa com ionização por *Electrospray*

eV - electrão-volt

FBS - soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

Fmoc - 9-Fluorenilmetiloxicarbonil

GCR - Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas

GIST - tumores do estroma gastrointestinal

GPCR - recetor acoplado à proteína G

GRP-R - recetor do péptido libertador de gastrina
HEPES - ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-etanosulfónico
HER2 - recetor 2 do fator de crescimento da epiderme humana
HPLC - cromatografia líquida de alta pressão
HT - terapia hormonal
IC₅₀ - concentração inibidora 50%
IGF-1R - recetores dos fatores de crescimento insulina tipo-1
IST/CTN - Instituto Superior Técnico/Campus Tecnológico e Nuclear
ITLC-SG - cromatografia instantânea de camada fina, sílica gel
LBF - ligandos bifuncionais
MEM - meio essencial mínimo
min - minutos
Nd - não disponível
NIRS - Espectroscopia de Infravermelho Próximo
NMB - neuromedina B
NOTA - ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
NPY - neuropéptido Y
N^αHis-ac - N^α-histidinil acetil
P - coeficiente de partição
p.i. - pós-injeção
PBS - tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)
PEM - Mamografia por Emissão de Positrões
PET - Tomografia por Emissão de Positrões
PP - polipéptido pancreático
PYY - polipéptido YY
QT - quimioterapia
RE - recetores de estrogénios
RGD - sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico
RM - Ressonância Magnética
RP - recetores de progesterona
rpm - rotações por minuto
RT - radioterapia
RY1 - recetor Y1
SNC - sistema nervoso central
SNP - sistema nervoso periférico
SPECT - Tomografia por Emissão de Fóton Único

SPPS - síntese automática em fase sólida

sst - recetor da somatostatina

t_{1/2} - tempo de semi-vida

tBu - terc-butilo

TFA - ácido trifluoroacético

TNM - tumor, envolvimento ganglionar e metastização

t_r - tempo de retenção

TRAP - 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-tris[metil(2-carboxietil)ácido fosfínico]

uPA-PAI1 - uroquinase-inibidor do ativador da plasminogénio

UV - Ultravioleta

UV-Vis - ultravioleta-visível

VEGFR - recetores dos fatores de crescimento vascular endotelial

vs - *versus*

°C - graus centígrados

β - beta

η - rendimento

λ - comprimento de onda

α - alfa

γ - gama

Preâmbulo

O cancro de mama constitui uma das principais causas de morte do foro oncológico nos países desenvolvidos, afetando predominantemente doentes do sexo feminino. Anualmente, cerca de 1,67 milhões de novos casos de neoplasia da mama são diagnosticados a nível mundial, a maior parte dos quais revela prognóstico reservado.¹ Nos últimos anos, a taxa de sobrevivência aumentou devido à introdução de medidas de rastreio, novas modalidades de diagnóstico, novas técnicas cirúrgicas como a mastectomia radical e conceitos inovadores ao nível terapêutico como a radioterapia (RT), a quimioterapia (QT) e a terapia hormonal (HT).^{1,2}

Apesar da eficácia da cirurgia no tratamento de tumores de mama em estadios precoces com doença localizada, repercussões graves de índole físico e/ou psicossocial estão associadas à técnica. A radioterapia e a quimioterapia estão disponíveis, mas a sua eficácia é limitada por efeitos colaterais graves e pelo desenvolvimento de multi-resistência a fármacos. Assim, torna-se indispensável implementar novas ferramentas diagnósticas com o objetivo de detectar precocemente as alterações tumorais e minimizar o recurso a técnicas invasivas e, ainda selecionar alvos terapêuticos específicos para otimização e personalização da terapia.

Neste contexto, a introdução das técnicas nucleares de imagem como a Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) e a Tomografia por Emissão de Positrões (PET) possibilitam a deteção tumoral em estadios mais precoces comparativamente aos métodos convencionais de diagnóstico, sustentados em alterações morfológicas – Mamografia, Ultrassonografia, Tomografia Computorizada (CT) e Ressonância Magnética (RM) – e associados a valores de sensibilidade e especificidade muito variáveis. Além disso, a deteção *in vivo* e caracterização tumoral por sondas imagiológicas permitiu a classificação dos diferentes processos tumorais como a proliferação, a angiogénese e a metastização, sendo possível monitorizar a biologia tumoral. Adicionalmente, o desenvolvimento de sistemas híbridos como a SPECT/CT, a PET/CT e a PET/RM permitem obter informação anatómica e funcional simultaneamente, contribuindo para minimizar as limitações de resolução espacial associadas às técnicas de imagiologia molecular.^{3,4}

Os péptidos reguladores atuam em múltiplos alvos moleculares. A sobreexpressão de muitos recetores peptídicos em processos tumorais tornou os péptidos agentes atraentes para diagnóstico e terapia de tumores. Recentemente, confirmou-se a expressão dos recetores Y em vários processos neoplásicos, nomeadamente no neuroblastoma, nos tumores do estroma gastrointestinal (GIST), no carcinoma das células renais e nos tumores da mama. Reubi et al. descreveram a sobreexpressão do RY1 em 85% dos carcinomas da mama e em 100% das metástases linfáticas enquanto o tecido mamário saudável expressa preferencialmente o recetor Y2. Como o recetor do subtipo Y1 do NPY está abundantemente sobreexpresso no cancro de mama, pode ser considerado um alvo inovador bastante promissor para a sua

deteção *in vivo*, visto que o NPY ativa estes recetores com uma afinidade na ordem dos nanomolar.⁵⁻⁷

Neste contexto, vários análogos do NPY foram desenvolvidos com afinidade dirigida ao recetor do subtipo Y1, nomeadamente o [Leu³¹,Pro³⁴]NPY e o [Phe⁷, Pro³⁴]NPY. Recentemente surgiu o primeiro análogo seletivo para o RY1 com atividade agonista, o [Pro³⁰-Nle³¹-Bpa³²-Leu³⁴]NPY (28-36), potencialmente útil na deteção de cancro de mama.^{6,8,9}

A PET é uma técnica de diagnóstico que requer o uso de isótopos emissores de positrão com semi-vida curta como o ¹⁸F, o ¹¹C, o ¹⁵O e o ¹³N. Alternativamente podem ser utilizados radiometais como o ⁶⁸Ga. A introdução do gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga independente da instalação de um ciclotrão *in situ* e com favorável razão custo/benefício permitiu a obtenção do ⁶⁸Ga de uma forma contínua nos centros de Medicina Nuclear. O gerador ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga pode contribuir e facilitar a formulação de novos radiofármacos para aplicação em PET – como os já existentes ⁶⁸Ga- ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) - Octreótido – numa dimensão comparável à implementação do gerador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc com uso em SPECT, conduzindo a um novo impacto clínico no diagnóstico em Medicina Nuclear através da PET.

A Química de Coordenação do Ga³⁺ em conjugação com a introdução de ligandos bifuncionais permitiu o desenvolvimento de complexos de ⁶⁸Ga funcionalizados com moléculas biologicamente ativas. Além disso, o ⁶⁸Ga é um emissor de positrão com um tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) física de 67,71 minutos (min), o qual é compatível com a farmacocinética da maioria dos radiofármacos compostos por moléculas de baixo peso molecular e pequenos péptidos.¹⁰

É neste âmbito que se insere o trabalho apresentado nesta tese em que se pretende desenvolver sondas imagiológicas de ^{67/68}Ga com elevada afinidade e selectividade para o recetor do subtipo Y1 do NPY para deteção de cancro de mama em estadios precoces.

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Cancro de mama

1.1.1. Patogénese e diagnóstico

Apesar dos avanços a nível do diagnóstico e terapêutico, o cancro de mama ainda constitui uma das principais causas de morte em Oncologia nas sociedades desenvolvidas, verificando-se um aumento global na sua incidência com 1,67 milhões de novos casos por ano, correspondendo a 25% dos diagnósticos em patologia oncológica. Em Portugal, a incidência de cancro de mama é de 12,4% e a prevalência aos 5 anos em 18,1%.^{1,11}

A probabilidade de desenvolvimento de cancro de mama é condicionada por fatores como: predisposição genética (expressão dos genes BRCA1 e BRCA2), hiperplasia atípica do tecido mamário, antecedentes pessoais de tumor do ovário ou endométrio, terapêutica hormonal com estrogénio e progesterona, exposição a radiação ionizante, nuliparidade, aumento da idade, regime alimentar e hábitos etílicos.^{2,12}

As duas variantes histológicas principais são a lobular e a ductal. O estadiamento da patologia é definido pela extensão local do tumor (T), o envolvimento ganglionar (N) e a existência de depósitos secundários (M), classificados no sistema TNM. A secundarização tumoral ocorre, predominantemente, nos gânglios linfáticos e esqueleto e, também no mediastino, pulmões e fígado.²

No diagnóstico de cancro de mama recorre-se a estudos anatomo-histológicos, modalidades de imagem morfológica (mamografia, ecografia mamária, CT e RM) e técnicas de imagem funcional [SPECT, PET e Mamografia por Emissão de Positrões (PEM) com [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose (¹⁸F-FDG) e a Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIRS)].^{13,14}

Nas modalidades terapêuticas incluem-se: (i) a cirurgia (conservadora ou mastectomia total na doença localizada), (ii) a RT e (iii) a terapia sistémica (QT e bifosfonatos na metastização óssea). As novas abordagens terapêuticas incidem na medicina personalizada, tendo em conta a expressão de biomarcadores como o recetor de estrogénio (RE), o recetor 2 do fator de crescimento da epiderme humana (HER2) e/ou o recetor da progesterona (RP), a uroquinase-inibidor do ativador da plasminogénio (uPA-PAI1) e o Ki67. Outro método terapêutico inclui a administração sistémica de radiofármacos que se concentram em locais de turnover ósseo. As metástases ósseas de cancro de mama induzem uma resposta osteoblástica conduzindo a uma hipercaptação do radiofármaco.^{12,15}

1.2. Medicina Nuclear e radiofármacos: considerações gerais

A Medicina Nuclear permite simultaneamente o diagnóstico imagiológico não invasivo e/ou o tratamento da patologia, através da administração em concentrações baixas (10^{-6} a 10^{-12} M) de um isótopo radioativo associado a uma molécula específica para dirigir e transportar o radionuclídeo para o tecido patológico, denominando-se este complexo como radiofármaco.¹⁶⁻¹⁸

Os radionuclídeos incorporados nos radiofármacos de diagnóstico e/ou terapia diferem nas propriedades físicas, nomeadamente no tipo e energia da radiação emitida e no $t_{1/2}$. Os radionuclídeos utilizados na preparação de radiofármacos são produzidos em reatores nucleares ou em ciclotrões.^{16,19}

Em **terapia** o radionuclídeo é emissor de partículas carregadas — α , β^- , elétrões (e^-) de conversão interna ou e^- Auger — caracterizadas por baixo poder de penetração e elevada transferência linear de energia. Como exemplos de radionuclídeos com interesse em terapia podem-se citar o ^{131}I , o ^{90}Y , o ^{177}Lu , o ^{188}Re , o ^{90}Sr , o ^{153}Sm , o ^{213}Bi e o ^{223}Ra , entre outros.²⁰⁻²²

Os radiofármacos usados em **diagnóstico** incluem um radionuclídeo emissor de fotões γ , emitidos diretamente pelos radionuclídeos ou resultantes da interação de positrões (β^+) com elétrões do meio. Os fotões γ apresentam baixo poder de ionização e elevada capacidade de penetração nos tecidos, permitindo a eficiente deteção externa. O $t_{1/2}$ deve ser curto para minimizar a dose de radiação, mas suficientemente longo para permitir a preparação, distribuição e acumulação do radiofármaco no órgão/tecido alvo e a aquisição de imagem.^{16,23}

Os radiofármacos podem ser classificados em radiofármacos de primeira geração ou perfusão e radiofármacos de segunda geração ou específicos. A biodistribuição dos radiofármacos de **perfusão** é determinada pelas propriedades químicas e físicas do composto radioativo como o tamanho, a carga e a lipofilia do complexo. Os radiofármacos atingem o órgão-alvo na proporção do fluxo sanguíneo e não apresentam locais de ligação específicos.^{16,19,23}

Os radiofármacos **específicos** incluem uma molécula biologicamente ativa como um anticorpo ou um péptido com elevada afinidade e selectividade para um recetor expresso em determinado órgão/tecido, bem como, substratos ou inibidores de enzimas, açúcares ou nucleótidos. Para a preparação de radiofármacos específicos contendo um metal são utilizados ligandos bifuncionais (LBF) que apresentam capacidade para coordenar e estabilizar o metal e que, ao mesmo tempo, apresentam grupos funcionais adequados para ligação à biomolécula e um espaçador que permite a ligação entre o LBF e a biomolécula (figura 1.1).^{17,24,25}

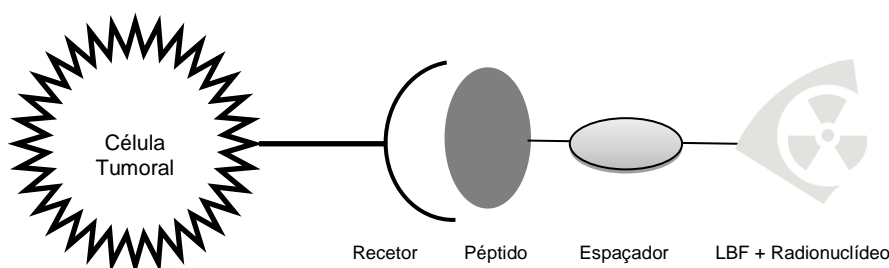


Figura 1.1 Abordagem bifuncional para concepção de radiofármacos específicos de elementos metálicos.²³

As duas modalidades para obtenção de imagem para fins de diagnóstico são a **SPECT** e a **PET**. A emissão radioativa é detetada por câmaras específicas constituídas por detetores de radiação e eletrónica que a transformam em sinal, podendo posteriormente ser reconstruída para uma imagem bi ou tridimensional com acumulações radioativas proporcionais à captação

do radiofármaco. A utilização da SPECT e da PET em contexto clínico é influenciada pelos seguintes fatores: i) custo, ii) sensibilidade e resolução da técnica e iii) disponibilidade do radionuclídeo apropriado.¹⁷

A modalidade SPECT baseia-se na aquisição de imagens adquiridas a partir de eventos radioativos provenientes de radiofármacos constituídos por radionuclídeos emissores de fótons γ com energia idealmente compreendida entre os 100 e os 150keV através de uma câmara-gama constituída por detetores de radiação que integram um cristal de NaI(Tl).²⁶ A sequência de imagens planares é adquirida em torno de uma órbita pré-definida e, posteriormente, submetida a métodos de reconstrução de imagem que a tornam numa imagem única tridimensional. O ^{99m}Tc é o principal radionuclídeo utilizado em SPECT, sendo que o ^{123}I , o ^{111}In e o ^{67}Ga têm também um papel relevante no diagnóstico com esta técnica.^{17,19,27}

As imagens PET baseiam-se na deteção em coincidência de dois fótons γ de 511keV, resultantes do processo de aniquilação de um eletrão, do meio biológico em estudo, com um positrão resultante do decaimento de radionuclídeos instáveis com excesso de prótons.¹⁹ Os fótons γ de 511keV são emitidos, numa primeira aproximação, em direção diametralmente oposta. A deteção simultânea destes eventos por detetores define uma linha reta, denominada de linha de resposta, ao longo da qual se assume a ocorrência do processo de aniquilação. A localização da aniquilação é estabelecida por colimação eletrónica com base numa janela temporal definida. A maior parte dos radionuclídeos com interesse em PET são de elementos não metálicos (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) em diferentes classes de biomoléculas como derivados de aminoácidos, nucleósidos ou açúcares.^{17,27,28} Os emissores β^+ de elementos não metálicos apresentam um $t_{1/2}$ muito curto que condiciona a síntese dos radiofármacos e limita a sua utilização clínica. Por esta razão, devido às suas propriedades químicas favoráveis, alguns radiometais emissores de positrões como o ^{64}Cu e o ^{68}Ga têm vindo a assumir uma importância crescente na investigação de radiofármacos para PET. O ^{68}Ga tem a vantagem de poder ser obtido a partir de um gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.^{18,20,29}

A complementaridade com a CT ou a RMN e os *softwares* específicos de fusão transformaram a SPECT e a PET técnicas híbridas com melhores propriedades de aquisição e interpretação de imagem. A imagem de fusão com a CT possibilita a correção de atenuação e o mapeamento anatómico.^{3,30}

1.3. Radiofármacos no diagnóstico de cancro de mama

O desenvolvimento de sondas de imagem molecular com aplicação ao cancro de mama permitem entender os mecanismos moleculares ou a acção de determinados fármacos durante o processo de diagnóstico e terapêutica. Os recetores hormonais de estrogénios e progesterona, os recetores de fatores de crescimento [HER2, recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), recetores dos fatores de crescimento insulina tipo-1 (IGF-1R)], os fatores angiogénicos [recetores dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFR), integrinas $\alpha_v\beta_3$], entre outros, foram considerados alvos específicos para a deteção e monitorização da terapêutica no cancro de mama (figura 1.2).^{31,32}

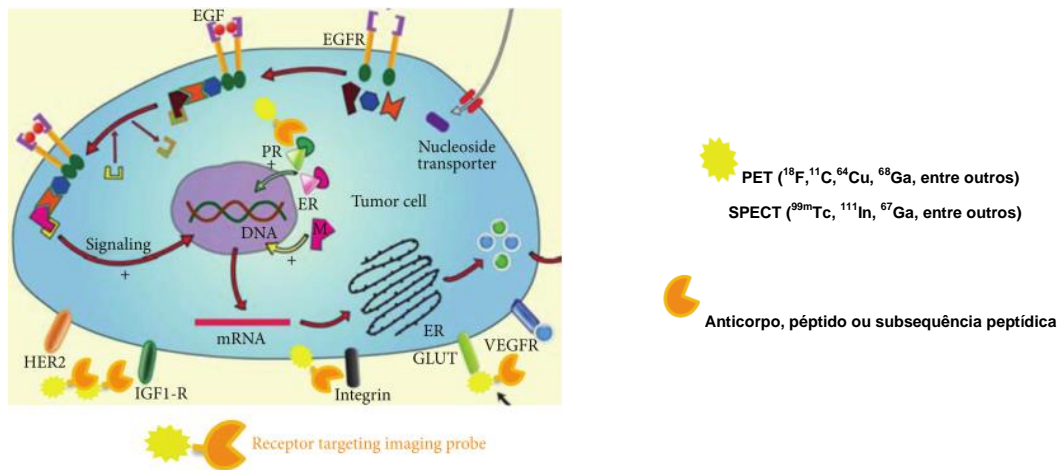


Figura 1.2 Sondas moleculares para diagnóstico de cancro de mama.^{31,32}

Na tabela 1.1 estão descritas algumas sondas moleculares com interesse para o diagnóstico de cancro de mama e descreve-se de forma sucinta a sua aplicação.

Tabela 1.1 Sondas moleculares para diagnóstico de cancro de mama em uso clínico e em investigação.³¹

Recetor/ Biomarcador	Radiofármaco	Modalidade de Imagem
Metabolismo da Glucose	^{18}F -FDG	PET
Síntese de DNA	^{18}F -FLT; ^{11}C -timidina	PET
RE	^{18}F -Fluoro-17 β -estradiol e seus análogos	PET
	^{18}F -Fluorotamoxifeno	PET
RP	^{18}F -fluoro-16- α -metil-19-norprogesterona	PET
HER2	^{89}Zr -Trastuzumab	PET
	^{111}In -Trastuzumab	SPECT
	^{68}Ga -ABY-002	PET
EGFR	$[^{11}\text{C}]$ -PD ₁₅₃₀₃₅	PET
IGF-1R	^{89}Zr ou ^{111}In – R1507	PET/SPECT
VEGFR	^{64}Cu -DOTA-VEGF(DEE)	PET
Integrinas	^{18}F -galacto-RGD	PET
	^{64}Cu -DOTA-dímero RGD	PET
	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692	SPECT

A ^{18}F -FDG é o radiofármaco para PET mais utilizado no âmbito oncológico. O transporte de FDG, um análogo da glucose, é realizado através da membrana plasmática pelos transportadores da glucose, o Glut-1 e o Glut-3. O FDG é convertido em FDG-6-fosfato sob acção da hexoquinase. Por ausência do grupo hidroxilo na posição 2, não é possível a metabolização do FDG, ocorrendo uma acumulação intracelular em tecidos metabolicamente ativos.^{31,33}

A ^{18}F -fluorotimidina (FLT) é um análogo da piridina que sofre fosforilação na fase S do ciclo celular pela timidina-quinase 1. Assim, a sua utilização em PET permite estudar processos de proliferação celular, permitindo a detecção de tumores de mama e metástases loco-regionais. Os resultados obtidos indicaram que a utilização do ^{18}F -FLT é vantajosa para avaliação de resposta terapêutica, dado que se notou diminuição da captação tumoral em pacientes sujeitos a Docetaxel[®].^{31,34}

O RE é um fator de transcrição que controla a proliferação celular no cancro de mama e são conhecidos dois subtipos: o subtipo α (recetor no cancro de mama) e o subtipo β . Os estudos efetuados com radiofármacos com ligação aos recetores de estradiol revelaram fixação proporcional à quantidade de estradiol α encontrado nas células malignas através de análises imunohistoquímicas, o que permite inferir a sua importância no diagnóstico inicial e follow-up terapêutico. No entanto, nem todos os subtipos de células malignas mamárias causam um aumento de estradiol.^{31,35}

O RP é crucial para o crescimento tumoral mamário. As moléculas utilizadas nos radiofármacos deste tipo são progestinas esteróides. Devido a alterações hormonais fisiológicas e concentrações de progesterona noutros órgãos, atribuem-se piores resultados a estes radiofármacos em relação aos recetores do estradiol.^{31,36}

O HER2 está presente em 25-30% dos tumores da mama e regula mecanismos de proliferação celular. O *Trastuzumab (Herceptin[®])* é um anticorpo que se liga seletivamente ao HER2, pelo que têm sido desenvolvidas sondas radioativas com ^{111}In e ^{89}Zr para diagnóstico e monitorização terapêutica de cancro de mama.^{31,37,38}

Os IGF-1R são recetores de tirosinas transmembranares que sinalizam a proliferação e sobrevivência celular. Heskam et al. sintetizou o R1507 (anticorpo monoclonal) com ^{89}Zr ou ^{111}In para aplicação em PET ou SPECT, respetivamente. Os resultados obtidos demonstraram diminuição da expressão do IGF-1R após HT, o que indica que esta técnica pode ser utilizada na monitorização e predição terapêutica individual em pacientes com tumores da mama.^{31,39}

O VEGFR é representativo do processo de revascularização envolvido na angiogénese tumoral. Assim, os anticorpos associados aos radioisótopos permitem a visualização da angiogénese das lesões primárias e respetivas metástases. As integrinas correspondem a recetores de adesão celular e encontram-se aumentadas no cancro de mama e processos de metastização. Vários estudos descrevem a complexação de péptidos a radionuclídeos formando radiofármacos com afinidade para estes recetores, permitindo predizer a existência de neoplasia da mama. Os resultados obtidos são promissores ao nível destes radiofármacos sendo que são ineficazes no controlo terapêutico, dado que o processo de angiogénese não permite predizer qual a evolução das lesões.^{31,40,41}

1.4. Sondas radioativas baseadas em radiometais

Um grande número de radionuclídeos com propriedades nucleares interessantes para aplicação em Medicina Nuclear são radiometais, pelo que existe um grande interesse em

desenvolver radiofármacos específicos com isótopos radioativos de elementos metálicos. Contudo, trata-se de uma tarefa complexa, uma vez que é necessário associar a biomolécula a um dado radiometal sem alterar significativamente as suas propriedades biológicas.

A abordagem bifuncional tem sido a mais explorada e pode-se considerar que contém: i) um **radiometal**, ii) um **LBF**, iii) um **espaçador** e iv) uma **sonda biológica** com afinidade para um determinado alvo. Geralmente, o vetor é uma biomolécula (péptido, anticorpo ou fragmento de anticorpo) com elevada afinidade para determinados recetores sobreexpressos em células tumorais; as biomoléculas são os veículos que permitem o transporte de radioatividade especificamente para o tumor. O radiometal é escolhido com base no objetivo de uso clínico do radiofármaco: radionuclídeos emissores γ ou β^+ para diagnóstico ou radionuclídeos emissores α , β^- ou de e^- de Auger para terapia, como já referido anteriormente. O LBF contém um conjunto de átomos doadores capazes de coordenar e estabilizar o metal e, ao mesmo tempo, apresenta grupos funcionais para ligação à biomolécula. A seleção do LBF é determinada pela natureza e pelo estado de oxidação do metal, podendo incluir um espaçador entre o metal e a biomolécula. O espaçador permite afastar o quelato da biomolécula, minimizando possíveis interferências com a parte biologicamente ativa, podendo ainda ser usado para modelar o perfil farmacocinético dos compostos.^{17,23,42,43}

Na seleção dos componentes deve considerar-se a sua complementaridade. Por exemplo, de existir um compromisso entre o tempo de semi-vida biológico da biomolécula com o tempo de semi-vida físico do radionuclídeo. Em geral, radiometais com tempos de semi-vida longos devem ser incorporados com biomoléculas com elevados tempos de semi-vida biológica (como os anticorpos) e, cuja circulação sanguínea e acumulação no tumor são prolongadas. Por outro lado, isótopos com tempos de semi-vida curtos devem ser conjugados com biomoléculas de tempos de semi-vida biológicos curtos (como pequenas moléculas ou péptidos), cuja *clearance* sanguínea e acumulação no tumor são rápidas e, portanto, adequadas ao $t_{1/2}$ do radionuclídeo.¹⁷

Vários radiometais foram considerados para uso clínico em imagem nuclear. A introdução do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ e a química de coordenação bem estabelecida do Ga^{3+} contribuirá para a utilização crescente de ^{68}Ga na formulação de novos radiofármacos para aplicação em PET.

1.4.1. Gálio

1.4.1.1. Propriedades químicas/radioquímicas e comportamento *in vivo* do Gálio

O Gálio é um elemento metálico do grupo IIIA da tabela periódica e, em solução aquosa existe unicamente no estado de oxidação +3. O Ga(III) apresenta elevada afinidade para o OH^- numa gama alargada de valores de pH, o que condiciona fortemente a preparação de radiofármacos. Em solução aquosa os catiões hidratados de Ga^{3+} , $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, só são estáveis em condições ácidas ($\text{pH} < 4$). De facto, quando se aumenta o pH da solução aquosa ($\text{pH} > 4$), na ausência de ligandos adequados, observa-se a formação de hidróxidos insolúveis de $\text{Ga}(\text{OH})_3$, e para valores de pH superiores a 7, o $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ hidrolisa, ocorrendo a

formação do anião galato $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$, o que pode conduzir a processos de desmetalização dos complexos.^{10,26,44,45}

O ião Ga^{3+} pode ser classificado como “ácido duro” de Lewis formando complexos termodinamicamente estáveis com ligandos considerados “bases duras” de Lewis. Estes ligandos contêm átomos doadores de azoto e oxigénio, tais como grupos carboxilato, fosfonato, hidroxamatos e aminas.¹⁰

A química de coordenação do $\text{Ga}(\text{III})$ é muito semelhante à do $\text{Fe}(\text{III})$ o que tem importantes implicações no que respeita à sua utilização na preparação de radiofármacos. Para poderem ser aplicados como radiofármacos, os radionuclídeos de Gálio devem ser estabilizados com ligandos que formem complexos de Gálio termodinamicamente estáveis relativamente à hidrólise a pH fisiológico e cineticamente inertes para evitar reações de transquelatação dos complexos durante o tempo de uso clínico por troca de ligando com a proteína transferrina presente no sangue. A transferrina contém dois locais de ligação para o Ferro, apresentando elevada afinidade para este ião metálico, e também tem afinidade para o Ga^{3+} . As constantes de estabilidade dos complexos Ferro-transferrina ($\log_{K1}=22,8$ e $\log_{K2}=21,5$) são mais elevadas comparativamente às constantes de estabilidade dos complexos de Gálio com a transferrina ($\log_{K1}=20,3$ e $\log_{K2}=19,3$). Neste contexto, os complexos de Ga^{3+} devem apresentar estabilidade superior comparativamente aos complexos Ga-transferrina ou serem cineticamente inertes para não ocorrer troca com a proteína, o que poderia resultar numa acumulação do metal a nível pulmonar e hepático.^{10,17,26,46}

Em Medicina Nuclear, os dois radioisótopos mais usados são o ^{67}Ga (SPECT) e o ^{68}Ga (PET). O ^{67}Ga decai 100% por captura eletrónica (CE) [$t_{1/2}=78,3$ horas, $E_{\gamma}=93\text{keV}$ (40%), 184keV (24%), 296keV (22%) e 388keV (7%)] e encontra-se disponível na forma química de Citrato de Gálio. A produção em ciclotrão implica o transporte do radioisótopo aos centros de diagnóstico. O ^{67}Ga é administrado via endovenosa (e.v.) na forma de Citrato de Gálio para (i) diagnóstico, estadiamento e monitorização da resposta terapêutica de vários tumores, como o linfoma e o rabdomiossarcoma e (ii) deteção de patologia inflamatória/ infecciosa.^{19,47}

O interesse na produção de ^{68}Ga surge pelas características físicas adequadas a aplicação em PET com um $t_{1/2}=67,71$ minutos, emissão de positrão ($\beta^+=89\%$, $E_{\beta^+}=1,92\text{MeV}$) e energia média por desintegração de 740keV, permitindo uma melhor resolução espacial comparativamente ao isótopo mais usado em PET, o ^{18}F .^{29,48}

1.4.1.2. Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

A introdução do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ independente da instalação de um ciclotrão *in situ* permite a formulação de novos kits que podem ser reconstituídos e radiomarcados em tempo útil, como acontece com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.⁴⁹

Os primeiros sistemas de geradores $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ eram constituídos por matrizes inorgânicas de Al_2O_3 ou ZrO_2 . O ^{68}Ge encontrava-se fixo na coluna e procedia-se à eluição do ^{68}Ga com uma solução de 5mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), obtendo-se o $^{68}\text{Ga}(\text{EDTA})^-$. Posteriormente substituiu-se a matriz de Al_2O_3 por Sb_2O_5 e o EDTA por uma

solução de oxalato de sódio (2%). Contudo, o ^{68}Ga continuava a ser obtido na forma de complexo o que limitava a sua utilização. O grande impacto no desenvolvimento de sondas radioativas de ^{68}Ga ocorreu quando se desenvolveram geradores para obtenção de $^{68}\text{Ga}^{3+}$, livre de agente complexante.^{10,50,51} Neste contexto foram desenvolvidos diversos sistemas de geradores em que o ^{68}Ga é eluído na forma iónica em soluções aquosas de HCl com diferentes concentrações. As eventuais impurezas do eluído são o ^{68}Ge , o metal proveniente do enchimento da coluna e o Zn (resultante do decaimento de ^{68}Ga). De forma a reduzir o nível de impurezas, acoplaram-se módulos automáticos de purificação aos geradores desenvolvidos. (figura 1.3).^{10,52,53}



Figura 1.3 Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.⁵⁴

As diferenças entre as propriedades químicas entre o Ge(IV) e o Ga(III) permitem a separação eficiente dos dois iões.^{10,53}

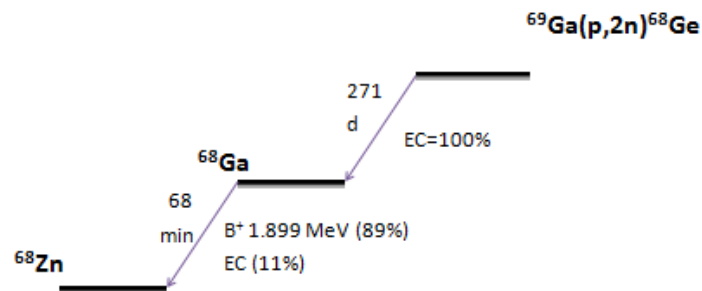


Figura 1.4 Esquema de decaimento do ^{68}Ge .⁵³

O ^{68}Ge é produzido num acelerador através da reação nuclear principal (p, 2n) em alvos de ^{69}Ga (figura 1.5).¹⁰

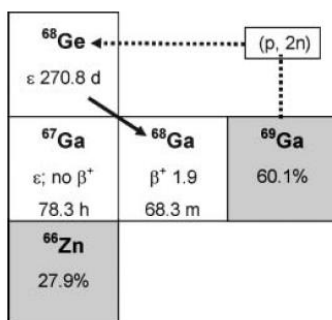


Figura 1.5 Produção de ^{68}Ge pela reação (p,2n) em alvos de ^{69}Ga .¹⁰

O uso do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ permitiu o desenvolvimento de péptidos marcados com ^{68}Ga , nomeadamente de sondas radioativas para deteção dos recetores da somatostatina. Um composto promissor o [$^{67/68}\text{Ga}$ -DOTA,Tyr³]-octreótido ($^{67/68}\text{Ga}$]-DOTA-TOC) (figura 1.6) mostrou elevada afinidade para o recetor da somatostatina 2 (sst₂), sendo considerado o novo *gold standard* para deteção de tumores neuroendócrinos (TNE). Outros análogos da somatostatina foram marcados com $^{67/68}\text{Ga}$ como o [DOTA,1-NaI³]octreótido (DOTA-NOC) e [DOTA,Tyr³,Thr⁸]octreótido (DOTA-TATE).⁵⁵⁻⁵⁸

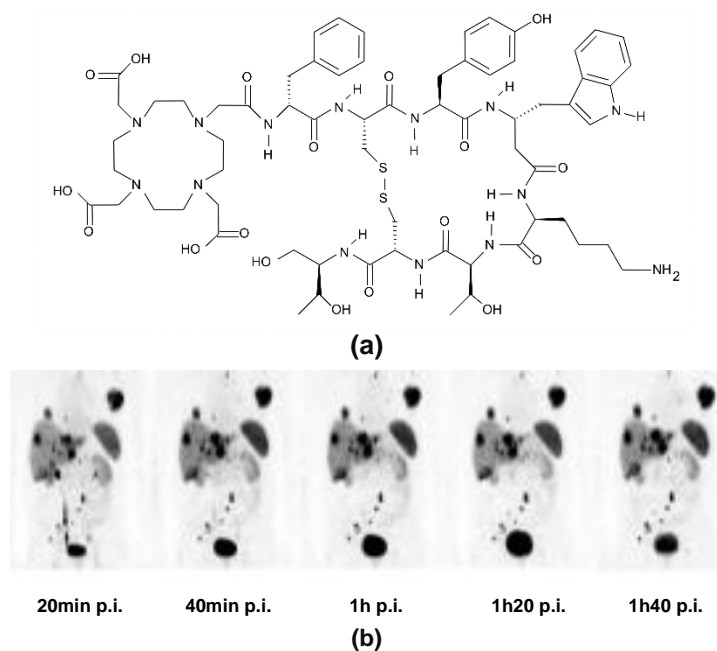


Figura 1.6 Fórmula estrutural do DOTA-TOC (a) e farmacocinética do ^{68}Ga -DOTA-TOC num paciente com TNE do pulmão (b).¹⁰

Vários péptidos marcados com ^{68}Ga estão em estudo clínico, entre eles:

- I. o [^{68}Ga -DOTA]bombesina, um péptido com ligação a três subtipos de recetores da bombesina, sendo usado para deteção de tumores do estroma gastrointestinal, cancro do cólon e cancro da próstata;⁵⁹
- II. o [^{68}Ga]-DO₃A-CH₂CO-Gly-4-aminobenzoil-Q-W-A-V-G-H-L-M-NH₂ (^{68}Ga -AMBA), um péptido que se liga a dois recetores da bombesina [neuromedina B (NMB) e recetor do péptido libertador da gastrina (GRP-R)];⁶⁰

- III. o [^{68}Ga -DOTA-D-Glu]Gastrina em estudo para deteção de tumores medulares da tiróide.^{10,58}

1.4.2. Ligandos bifuncionais para o Gálio

Um ligando que apresenta uma funcionalidade que permite uma ligação covalente a um determinada sonda biológica, como um péptido ou anticorpo e, que por outro lado permite a ligação a um metal catiónico designa-se de quelato ou ligando bifuncional.¹⁰

Os LBFs podem ser agrupados em duas classes: **acíclicos** (cadeia aberta) e **macrocíclicos** (cadeia fechada). Geralmente, os LBF acíclicos apresentam menor inércia cinética comparativamente aos macrocíclicos, mesmo quando a estabilidade termodinâmica é comparável. Os LBF acíclicos apresentam rápida cinética de ligação ao metal relativamente aos macrocíclicos, o que pode ser uma vantagem significativa quando usados isótopos de $t_{1/2}$ curto. Apesar das propriedades de coordenação específicas de cada metal, alguns LBFs são transversalmente usados em vários metais. A figura 1.7 mostra a estrutura de alguns ligandos acíclicos explorados na química do gálio.^{17,26,61,62}

O EDTA (N_2O_4) e o ácido dietilenotriamino-pentaacético (DTPA) (N_3O_5) são os ligandos acíclicos mais explorados em química radiofarmacêutica. O DTPA tem sido extensivamente usado para complexação com vários metais como o Cu(II), o Ga(III), o In(III), o Y(III) e o Zr(IV).²⁶

A desferrioxamina (DFO) (O_6) é um quelante acíclico com aplicação em terapia para complexação com ferro. O ligando é constituído por três grupos hidroxamato para quelatação com o metal e uma amina terminal primária para conjugação com biomoléculas. Devido às semelhanças entre o Fe(III) e o Ga(III), o DFO também é usado em complexos de Ga(III) resultando em complexos com elevada estabilidade termodinâmica para conjugação a pequenas moléculas ou péptidos. No entanto, demonstrou-se que baixas concentrações (<50nM de DFO) afetam a estabilidade do complexo DFO- Ga^{3+} .^{53,63,64}

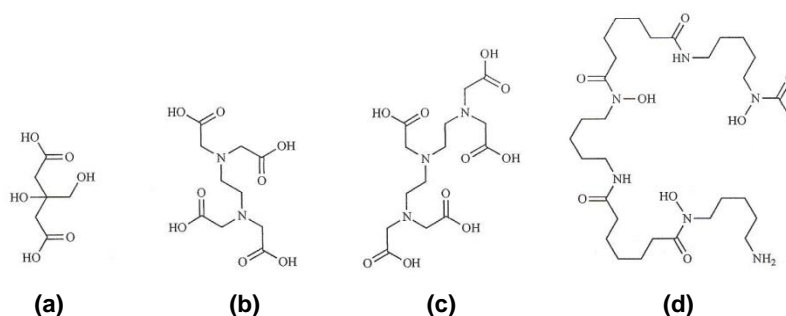


Figura 1.7 LBF acíclicos: (a) ácido cítrico, (b) EDTA, (c) DTPA e (d) DFO.⁵³

Os ligandos macrocíclicos (figura 1.9) são considerados os mais adequados para estabilizar o $^{67/68}\text{Ga}$ devido à sua estrutura pré-organizada. Estes ligandos polidentados cíclicos contêm átomos doadores incorporados no anel e grupos substituintes ligados ao esqueleto do anel. As principais vantagens que distinguem os macrociclos dos ligandos lineares são a elevada estabilidade dos complexos formados e a especificidade e seletividade relativamente

aos catiões a coordenar. A maior desvantagem reside na cinética lenta de formação dos complexos que é, no entanto, compensada pela igualmente lenta cinética de dissociação dos mesmos. Ao encapsularem o ião metálico, protegem-no eficazmente de ligandos competidores, nomeadamente, no caso do Gálio, da transferrina (proteína plasmática transportadora de ferro), o principal competidor para o Ga^{3+} na corrente sanguínea.^{17,53}

O ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) (N_3O_3) e o DOTA (N_4O_4) são os ligandos macrocíclicos mais explorados para complexação com Ga(III). Ambos apresentam um braço carboxílico que pode ser utilizado em estratégias de conjugação para formar ligações peptídicas.^{17,53}

O NOTA é comumente utilizado na complexação com Ga(III) ($\log K_{\text{ML}} = 31,0$), formando complexos hexadentados.¹⁷ O NOTA tornou-se atrativo para o uso com o Ga^{3+} , dado que permite a marcação a temperatura ambiente o que pode ser vantajoso quando usadas biomoléculas que se degradem a temperaturas elevadas, sendo que os complexos finais apresentam elevada estabilidade *in vivo*.⁶⁵⁻⁶⁷

O DOTA é muito estável para radiometais trivalentes, nomeadamente o Ga (III) ($\log K_{\text{ML}}=21,3$).¹⁷ O proquelato monoreativo DOTA(t-Bu)₃ (figura 1.8) pode ser acoplado ao terminal N dos péptidos.^{10,68}

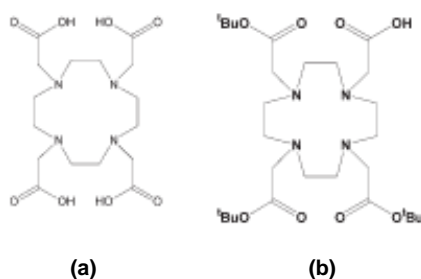


Figura 1.8 Fórmula estrutural do DOTA (a) e do proquelato monoreativo DOTA(t-Bu)₃ (b).¹⁰

A constante de estabilidade termodinâmica dos complexos de Ga-DOTA é inferior aos complexos Ga-NOTA, justificada pela cavidade de maiores dimensões do DOTA. Assim, os ligandos triaza apresentam elevada capacidade conformacional e tamanho seletivo para os iões Ga(III), pelo que podem encapsular os iões com elevada selectividade.^{69,70}

Apesar do NOTA formar complexos de maior estabilidade e a cinética complexação ser mais rápida comparativamente ao DOTA (implicando tempos de reação e temperatura superiores para complexação com o ^{67/68}Ga), este último tem sido escolhido como LBF, mostrando biodistribuições *in vivo* favoráveis. Este facto mostra a importância do compromisso entre a estabilidade metal-complexo sem comprometer a biodistribuição do biovetor. A complexação com o DOTA implica o uso de temperaturas elevadas, o que pode condicionar a integridade das biomoléculas.^{17,65}

sanguínea elevada; (v) elevada excreção renal, dependendo da hidrofília e carga; (vi) fácil produção por síntese automática em fase sólida (SPPS); (vii) fácil conjugação a LBFs; (viii) baixa toxicidade e (ix) baixa imunogenicidade. As limitações associadas à utilização de péptidos consistem: biodisponibilidade reduzida do recetor no tecido alvo, rápida degradação metabólica por degradação proteolítica por peptidases endógenas e variações significativas nos perfis de densidade e expressão dos subtipos do recetor.⁷⁶⁻⁷⁸

A rápida acumulação tumoral e a *clearance* elevada dos péptidos sugerem a conjugação com radioisótopos de semi-vida curta, sendo que o ⁶⁸Ga tem sido a escolha nos recentes estudos clínicos. De forma a evitar a degradação enzimática e a melhorar a estabilidade metabólica dos péptidos, podem ser incorporados resíduos de aminoácido sintetizados laboratorialmente, amino-álcoois ou péptidos cíclicos, sendo que estas modificações não devem afetar a afinidade do péptido para o recetor.^{65,79-81}

O primeiro péptido radiomarcado, usado em imagem SPECT, foi um análogo da Somatostatina (Octreoscan[®]) expresso em tumores neuroendócrinos.^{5,76,82}

A cinética de eliminação, a estabilidade metabólica e a elevada afinidade para uma variedade de recetores conduziram ao estudo de novos ligandos e à respetiva radiomarcagem peptídica. Assim, a obtenção de sondas de imagem com péptidos radiomarcados surge a partir da expressão de péptidos específicos reguladores existentes em processos neoplásicos, permitindo o mapeamento dos recetores e avaliação de resposta terapêutica.⁷⁷

Vários requisitos essenciais devem ser considerados na radiomarcagem peptídica, sendo eles: (1) o péptido deverá manter elevada afinidade e especificidade para o recetor; (2) expressão agonista, permitindo processos de internalização; (3) rendimentos de marcação superiores a 99,5%; (4) estabilidade em condições fisiológicas; (5) hidrofília para privilegiar a excreção por via renal, com baixa reabsorção tubular; (6) elevada atividade específica para evitar a saturação de recetores e (7) captação reduzida em tecidos não-alvo.^{65,83}

Os parâmetros farmacocinéticos considerados essenciais em radiomarcagem peptídica incluem: (1) afinidade do ligando, (2) densidade do recetor, (3) frequência de expressão do recetor, (4) as taxas de internalização, considerando ligandos agonistas e, (5) baixa atividade em tecidos não-alvo.⁷⁷

O padrão de excreção é determinado pelo perfil de expressão do recetor, comportamento metabólico e características físico-químicas do péptido como a lipofília e a distribuição de carga. A excreção hepatobiliar, associada a valores de lipofília superiores, apresenta padrões de captação abdominal, podendo contribuir para o aumento de falsos-negativos. A via e velocidade de excreção dos péptidos podem ser modeladas através de diferentes estratégias, incluindo: a introdução de aminoácidos hidrofílicos na cadeia peptídica, a glicolisação ou a ligação a cadeias de polietilenoglicol. A estabilidade do péptido radiomarcado condiciona a biodisponibilidade no recetor e a cinética de eliminação. A afinidade ao recetor, na ordem dos nano ou subnanomolar, influencia a ligação péptido-recetor. Nos

ligandos agonistas, a capacidade de internalização do radiocomplexo é considerada um pré-requisito para uma acumulação intracelular eficiente.^{77,80}

O espaçador pode também ser introduzido no final do péptido, antes da sua conjugação com o LBF, para minimizar ou eliminar as interferências entre os dois componentes ou modificar propriedades farmacocinéticas. A maioria dos espaçadores incluem sequências curtas de aminoácidos (dímeros ou trímeros da β-Ala, Gly ou N^ε-amino ácido hexanóico), glicose polietileno com baixo peso molecular ou cadeias hidrocarbonadas. O comprimento, flexibilidade, hidrofobicidade e carga devem ser considerados na seleção de espaçadores, dado que a sua introdução pode afetar a biodistribuição do radiofármaco.⁸⁰

Como referido anteriormente, o recetor alvo deve estar sobreexpresso no tecido tumoral. Adicionalmente, alguns recetores internalizam os ligandos, permitindo a retenção do radiofármaco no interior da célula. Esta condição pode ser vantajosa em terapia. Vários recetores têm sido investigados e os respetivos péptidos integrados em radiofármacos como a Somatostatina, a Bombesina (BBN), a Colecistoquinina (CCK), a Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD), a Melanocortina, o NPY, entre outros (tabela 1.2).^{80,84}

Tabela 1.2 Radiopéptidos em estudos clínicos na Europa, respetivos recetores peptídicos e indicações clínicas.⁸⁴

Péptido	Recetor	Indicação Clínica	Radiopéptido
Somatostatina	sst2	TNE	¹¹¹ In-DOTA-Landeotido ¹¹¹ In- ⁹⁰ Y- ¹⁷⁷ Lu- ⁶⁸ Ga-DOTATOC ¹⁷⁷ Lu- ⁶⁸ Ga-DOTATATE ¹¹¹ In-DOTA-BASS ^{99m} Tc-HYNIC-TOC/-TATE ^{99m} Tc-N4-TATE ^{99m} Tc-Depreotido ¹⁸ F-deoxifructosil-TATE
	sst2/sst3/sst5		⁶⁸ Ga-DOTANOC
BBN	GRP-R	Cancro da próstata, Cancro de mama e GIST	^{99m} Tc-RP527 ⁶⁸ Ga-BZH3 ⁶⁴ Cu-CBC-AR06 ⁶⁸ Ga- ¹⁷⁷ Lu-AMBA
CCK	CCK2r	Carcinoma medular da tiróide	¹¹¹ In-DTPA-D-Glu-minigastrina ^{99m} Tc-demogastrin 2
Péptidos RGD	Integrina α _v β ₃	Melanoma	[¹⁸ F]Galacto-RGD
Substância P	Neuroquinina 1	Glioblastoma	²¹³ Bi-DOTA-substância P
			¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y-DOTAGA-substância P

Os recetores do NPY são candidatos promissores para alveijamento de tumores com recurso aos respetivos análogos do NPY para diagnóstico e/ou terapia, à semelhança dos análogos de somatostatina já em uso clínico.

1.3.3.1. Neuropeptido Y: considerações gerais

A elevada afinidade dos neuropeptidos NPY, Polipeptido YY (PYY) e Polipeptido pancreático (PP) para os respetivos recetores e a possibilidade de síntese de subsequências peptídicas homólogas permitiram a incorporação dos péptidos em isótopos radioativos.⁸⁵

O péptido endógeno NPY, um neurotransmissor constituído por 36 aminoácidos (Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Agr-Gln-Arg-Tyr-NH₂), pertence à família das hormonas polipeptídicas pancreáticas ou família do Neuropeptido Y.^{76,78}

O NPY é um dos péptidos mais abundantes no cérebro, sendo expresso no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). No SNC desempenha funções na indução do apetite e inibição da ansiedade, enquanto no SNP regula o controlo do processo de vasoconstrição, motilidade e secreção gastrointestinal, libertação de insulina, função renal e predisposição a hábitos etílicos. As funções são reguladas por recetores Y (Y1-Y6) enquadrados na classe A dos recetores acoplados à proteína G (GPCR). A caracterização funcional dos recetores Y1, Y2, Y4 e Y5 é conhecida, ao invés do recetor Y6, um pseudogene, ainda sem associação a qualquer função.^{85,76,78}

Vários análogos do NPY, em particular antagonistas dos recetores Y1 e Y2, foram desenvolvidos para uso terapêutico nos distúrbios alimentares e no controlo da ansiedade. O BIBP3226 foi o primeiro antagonista não peptídico do NPY desenvolvido para estudo de doença cardiovascular e estados de obesidade.⁸⁶

O NPY ativa os recetores Y1 e Y2 numa afinidade na ordem dos nanomolar, sendo possível a internalização, ao invés dos recetores Y5 onde não está comprovado o processo de internalização.^{76,78}

Recentemente, confirmou-se a expressão dos recetores Y em vários processos neoplásicos, nomeadamente no neuroblastoma, no adenocarcinoma (Adc) do ovário, no carcinoma (Ca) das células renais e nos tumores da mama (tabela 1.3). Estudos *in vitro* corroboram que o NPY1 está expresso em 85% dos carcinomas da mama, bem como em 100% dos gânglios linfáticos invadidos. Os recetores Y2 expressam-se no tecido mamário normal, enquanto os recetores Y1 estão estreitamente associados ao tecido mamário neoplásico. A elevada incidência do recetor Y1 nos tumores da mama conduziu ao desenvolvimento de análogos do NPY quer para uso diagnóstico quer terapêutico.^{76,78}

Tabela 1.3 Expressão dos recetores do NPY em tumores humanos e nos tecidos normais correspondentes.⁸⁷

Tumor	Incidência de recetores do NPY no tumor	Subtipos de recetores do NPY expressos no tumor	Densidade dos recetores do NPY no tumor	Expressão dos recetores do NPY nos tecidos normais
Ca da Mama	76/89 (85%)	Y1>Y2	+++	Y2
Adc do ovário	7/22 (32%)	Y1+Y2	+	Nd
Tumores do estroma dos cordões sexuais do ovário	10/10 (100%)	Y1+Y2	++	Y1-estroma perivascular Y2-células de Leydig
Tumores adrenais corticais	14/15 (93%)	Y1	+++	Y1
Feocromocitomas	7/20	Y1<Y2	++	-
Paragangliomas	14/23 (61%)	Y1<Y2	+++	Nd
Tumores Neuroblásticos	18/20 (90%)	Y2	++	Nd
Carcinoma das células renais	14/24 (56%)	Y1	++	Y1
Neuroblastomas	8/10 (80%)	Y1+Y2	++	Y1

+++ densidade elevada; ++ densidade moderada; + densidade baixa; Nd não disponível

Apenas estão descritos na literatura alguns exemplos de análogos do NPY marcados com radiometais.^{88,89}

1.4.3.2. Análogos longos do Neuropeptídeo Y radiomarcados

Nos estudos de Zwanziger D. *et al* foram desenvolvidos vários análogos do NPY, entre os quais o [Phe⁷, Pro³⁴]NPY que apresentou uma afinidade na ordem dos subnanomolar para o recetor Y1. Os análogos foram conjugados ao DOTA (posição N-terminal ou posição N^ε da cadeia lateral da Lys⁴). O conjugado mais promissor, o [Lys(DOTA)⁴,Phe⁷,Pro³⁴]NPY, manteve uma elevada afinidade de ligação para o recetor Y1 em células de adenocarcinoma da mama humano MCF-7 (9,1±0,1pKi). Neste contexto, o bioconjugado foi marcado com ¹¹¹In resultando no complexo [Lys(¹¹¹In-DOTA)⁴,Phe⁷,Pro³⁴]NPY com uma pureza radioquímica de 80%. Os estudos de biodistribuição do complexo [¹¹¹In-DOTA-Lys⁴,Phe⁷,Pro³⁴]NPY em *nude mice* com tumores induzidos com células MCF-7 de carcinoma da mama revelaram uma baixa captação tumoral do radioligando (1,7%D.I./g aos 30 minutos após injeção) e uma elevada acumulação renal (86,8%D.I./g às 4 horas após injeção). Os resultados obtidos foram justificados com a natureza do próprio LBF utilizado, a degradação enzimática do composto *in vivo* e com a ausência de processos de purificação (separação do péptido não marcado) que pode levar à saturação dos recetores impedindo a ligação do radioligando. Os compostos conjugados com o DOTA na posição N^ε da cadeia lateral da Lys⁴ demonstraram maior afinidade comparativamente

aos péptidos conjugados ao DOTA na posição N-terminal. Assim, demonstrou-se que a flexibilidade do N-terminal é um fator crucial para a interação do bioconjugado com o RY1. A sequência peptídica do NPY ([Phe⁷, Pro³⁴]NPY) foi conjugada ao DTPA (acoplamento na posição N-terminal) e foi marcado com ¹¹¹In. O complexo ¹¹¹In-DTPA-[Phe⁷, Pro³⁴]NPY com uma pureza radioquímica superior a 95%, demonstrou uma elevada estabilidade nos estudos *in vitro*. O complexo apresentou valores de internalização de 5,36 ± 0,56% aos 30 minutos e 22,03 ± 1,68% às 4h em células tumorais humanas SK-N-MC, indicando que o processo é mediado por uma ligação específica ao recetor Y1, podendo ocorrer elevada captação e retenção no tecido-alvo. A farmacocinética do composto foi determinada em ratos *Lewis* machos saudáveis, tendo-se observado uma rápida depuração sanguínea. Os valores de captação (%D.I./g órgão) observados nos rins e no fígado às 24h p.i. são indicativos de excreção urinária e hepatobiliar.^{5,65,88,90}

Em estudos recentes, o mesmo análogo do NPY – [Phe⁷,Pro³⁴]-NPY – foi marcado com ^{99m}Tc, recorrendo à aproximação tricarbonílo [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ e, usando o quelato N^α-histidinil acetil (N^αHis-ac). O complexo de Re inativo Lys⁴(Re(CO)₃-(N^αHis-ac))- [Phe⁷, Pro³⁴]NPY apresentou elevada afinidade para o recetor Y1 com valores de IC₅₀ nas linhas celulares MCF-7 de 5,2 ± 1,0nM e 1,3 ± 0,1nM nas SK-N-MC.

O acoplamento do análogo na posição N^ε da cadeia lateral da Lys constituiu uma estratégia mais eficaz comparativamente à conjugação do análogo na posição N-terminal, dado que os valores de afinidade de ligação para o recetor são superiores.^{91,92}

Nos estudos de internalização em células HEK293-hY1-EYFP que expressam o recetor Y1, o conjugado referido demonstrou elevada atividade agonista. Quando marcado com ^{99m}Tc, verificou-se uma farmacocinética favorável nos estudos de biodistribuição em coelhos com rápida *clearance* plasmática e baixa captação renal. Assim, o complexo ^{99m}Tc-(N^αHis)-[Phe⁷,Pro³⁴]-NPY foi avaliado em pacientes com cancro de mama, constituindo o primeiro estudo clínico preliminar com análogos do NPY radiomarcados. A imagem cintigráfica revelou fixação do radiopéptido nos tumores primários e respetivas lesões secundárias aos 60 minutos após administração. O estudo indica que a sobreexpressão do recetor Y1 em tumores da mama oferece a possibilidade de alvejamento tumoral recorrendo a derivados do NPY. Adicionalmente estes análogos podem ser associados a agentes quimioterapêuticos para aplicação de terapia dirigida.^{91,92}

1.4.3.3. Análogos curtos do Neuropeptido Y radiomarcados

O desenvolvimento de análogos do NPY com cadeia peptídica reduzida mostrou-se vantajoso pela síntese menos dispendiosa e valores de eficiência de marcação promissores. No entanto, o *design* e síntese de análogos curtos do NPY estão dificultados pelo compromisso da afinidade de ligação ao recetor.⁷⁸

O [Pro³⁰, Tyr³², Leu³⁴]-NPY(28–36) (BVD15), um análogo curto do NPY com elevada afinidade para o recetor Y1 foi sintetizado (pureza química>90%) e conjugado ao DOTA em diferentes posições: no N-terminal do péptido (com recurso a um espaçador flexível de ácido

amino octanóico (Aoc)) ou na cadeia lateral da lisina do péptido. O estudo demonstrou que a introdução do LBF no N-terminal do péptido conduz a baixa afinidade para o recetor Y1. Pelo contrário, o conjugado com DOTA na cadeia lateral da lisina – [Lys(DOTA)⁴]-BVD15 – e respetivo complexo metálico de cobre, apresentaram boa afinidade em células humanas de cancro de mama MCF-7 ($K_i=63\pm 25\text{nM}$ e $29\pm 15\text{nM}$, respetivamente). A avaliação biológica do complexo radiometálico não foi determinada em modelos tumorais. A complexação do [Lys(DOTA)⁴]-BVD15 com outros radiometais para uso em imagem PET de cancro de mama está em investigação.⁹³

Recentemente, o mesmo antagonista curto do NPY - BVD15 - foi marcado com ^{18/19}F para deteção de neuroblastomas e tumores de mama por PET. O análogo ¹⁹F-ALK-BVD revelou uma boa afinidade nas células de adenocarcinoma da mama MCF-7 ($K_i = 31\pm 18\text{nM}$) e nas células de neuroblastoma SK-N-MC ($K_i= 14,8\pm 5,8\text{nM}$). Os estudos de biodistribuição demonstraram que o composto ¹⁸F-ALK-BVD apresentou uma farmacocinética favorável, mas com captação tumoral pouco significativa nos modelos animais com tumor da mama ($0,1\pm 0,04\%\text{D.I./g}$) e de neuroblastoma ($0,7\pm 0,2\%\text{D.I./g}$), o que pode indicar uma ligação não específica para o RY1. Nos estudos de imagem por PET visualizou-se maior captação em células de neuroblastomas comparativamente às células de cancro de mama. Os estudos de imunohistoquímica evidenciaram a expressão *ex vivo* do RY1 em ambos os modelos tumorais.⁹⁴

Recentemente, nos estudos de Beck-Sickinger A. *et al* foram sintetizados vários análogos curtos do NPY de acordo com as características de estrutura do péptido endógeno, já descritas na literatura, sendo que se demonstrou a importância das posições 33-36 do NPY, correspondentes ao terminal C, dado que as duas cargas da Arg nas posições 33 e 35 e a Tyr na posição 36 influenciam a ligação aos recetor Y1 (conjuntamente com a Pro³⁰). A Leu³⁴ promove a estrutura em hélice e as posições 31 e 32 interferem com as propriedades agonistas do péptido.⁷⁸

Um dos análogos curtos sintetizados, o [Pro³⁰,Nle³¹,Bpa³²,Leu³⁴]NPY(28-36) foi resultado da substituição com aminoácidos proteínogénicos e não-proteínogénicos. No estudo de linhas celulares MCF7-Y1, SMS-KAN-Y2 e HEC-1b-hY5-Y5, o [Pro³⁰, Nle³¹, Bpa³², Leu³⁴]NPY (28-36) revelou-se um agonista seletivo para o recetor Y1 ($IC_{50} = 29,7\pm 6,8\text{nM}$ para o receptor Y1 e $IC_{50} > 1000$ para os subtipos Y2 e Y5). A internalização seletiva mediada pelo recetor Y1 foi confirmada por microscopia em células HEK293-hY1R-EYFP. O análogo mostrou elevada estabilidade em plasma humano com uma semi-vida de aproximadamente 5 horas. Os padrões descritos confirmam a importância do terminal C como região determinante na função e seletividade do recetor. As propriedades *in vitro* favoráveis deste análogo curto do NPY evidenciaram o seu potencial como possível radiopéptido para imagiologia de tumores da mama que expressam o recetor Y1, pelo que se torna pertinente a complexação com isótopos que possibilitem imagem molecular.^{78,85}

1.5. Objetivo do trabalho

O trabalho apresentado nesta tese surge na sequência de estudos prévios realizados no GCR - IST/CTN. Foi previamente sintetizado um análogo curto do NPY com a sequência [Pro³⁰-Nle³¹-Bpa³²-Leu³⁴]NPY(28-36) e conjugado ao ligando bifuncional DOTA através de diferentes espaçadores. Usando esses conjugados, o objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de novas sondas radioativas de análogos do NPY com elevada afinidade e selectividade para o recetor Y1 para deteção de cancro de mama em estadios precoces. Pretendia-se também avaliar a influência dos diferentes espaçadores na modulação das características *in vitro*, assim como, no perfil farmacocinético dos conjugados marcados com ⁶⁷Ga. Para atingir este objetivo foram considerados os seguintes objetivos específicos:

1. Radiosíntese dos conjugados peptídicos com ⁶⁷Ga:
 - 1.1. Conversão do Citrato de Gálio a Cloreto de Gálio;
 - 1.2. Otimização das condições de marcação (concentração do ligando, pH, temperatura e tempo de reação);
 - 1.3. Caracterização dos complexos de ⁶⁷Ga por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e cromatografia em camada fina instantânea, sílica gel (ITLC-SG).
2. Determinação da estabilidade *in vitro* dos complexos de ⁶⁷Ga em diversas condições fisiológicas.
3. Avaliação da captação celular dos radiocomplexos em linhas celulares que expressam o recetor Y1.
4. Avaliação da farmacocinética e estabilidade *in vivo* dos radiopéptidos em animais saudáveis (murganhos CD1).

Capítulo 2

Complexos de ^{67}Ga de análogos do NPY

2. Complexos de ^{67}Ga de análogos do NPY

2.1 Introdução

Como referido anteriormente, o NPY endógeno é um neurotransmissor constituído por 36 aminoácidos com a seguinte sequência: H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Ihr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂ e pertence à família das hormonas polipeptídicas pancreáticas. As funções desempenhadas pelo péptido são reguladas por recetores Y (Y1-Y6). Recentemente comprovou-se que os recetores Y1 se encontram sobreexpressos em processos neoplásicos (proliferação, angiogénese e metastização), nomeadamente nos tumores da mama. O recetor Y2 expressa-se no tecido mamário normal, enquanto o recetor Y1 está estreitamente associado ao tecido mamário neoplásico. Estudos recentes revelam que o recetor Y1 está expresso em 90% dos carcinomas da mama e em 100% das adenopatias ganglionares linfáticas. A elevada incidência e densidade de expressão do recetor Y1 nos tumores da mama conduziu ao interesse no desenvolvimento e radiomarcção de análogos do NPY para uso diagnóstico e terapêutico em Oncologia Nuclear.^{5-7,76,78,85}

É neste âmbito que se insere o trabalho desenvolvido ao longo desta tese em que se pretendem marcar análogos curtos do NPY com $^{67/68}\text{Ga}$, mantendo elevada afinidade e selectividade para o recetor Y1. Estes análogos foram previamente sintetizados no GCR - IST/CTN e foram conjugados ao macrociclo DOTA através de diferentes espaçadores. Foram também sintetizados e caracterizados os respetivos complexos inativos de Gálio. Neste capítulo apresentam-se os estudos de otimização das condições de marcação destes conjugados peptídicos com ^{67}Ga bem como a sua avaliação *in vitro* e *in vivo*.

Para a síntese e radiomarcção dos análogos do NPY, vários componentes foram utilizados: (1) o péptido, (2) o radionuclídeo, (3) o LBF e (4) o espaçador (figura 2.1).

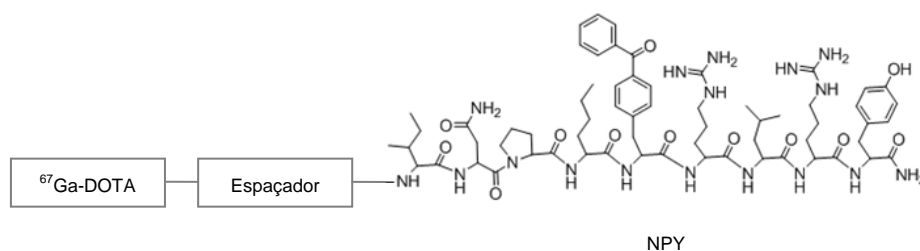


Figura 2.1 Componentes usados na síntese e radiomarcção dos análogos NPY.

1. O NPY1 (figura 2.2) com a sequência peptídica [Pro³⁰-Nle³¹-Bpa³²-Leu³⁴]NPY(28-36) é um análogo curto do NPY com afinidade para o recetor Y1, usado como vetor para atingir o tecido mamário neoplásico.

O NPY1 foi sintetizado por SPPS usando um sintetizador peptídico automático, com recurso à química 9-Fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). O quelato DOTA foi conjugado

manualmente ao péptido NPY1 por procedimento Fmoc no SPPS. Os conjugados peptídicos foram purificados por HPLC e obtidos com elevada pureza química (>95%), liofilizados e caracterizados por Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* ESI/MS e HPLC.

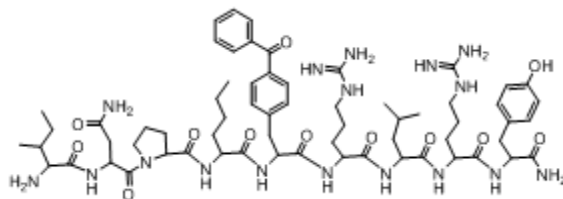


Figura 2.2 Estrutura química do péptido NPY1.

2. O radionuclídeo que permita a aquisição de imagem diagnóstica ($^{67/68}\text{Ga}$);
3. O quelato bifuncional DOTA para estabilizar o radionuclídeo e permitir a conjugação ao péptido NPY1. O DOTA é utilizado em metais trivalentes, nomeadamente o $^{67/68}\text{Ga}$, devido à sua elevada estabilidade termodinâmica e inércia cinética. Os conjugados peptídicos do NPY1 foram acoplados ao quelato bifuncional no terminal-N do NPY1 (figura 2.3).

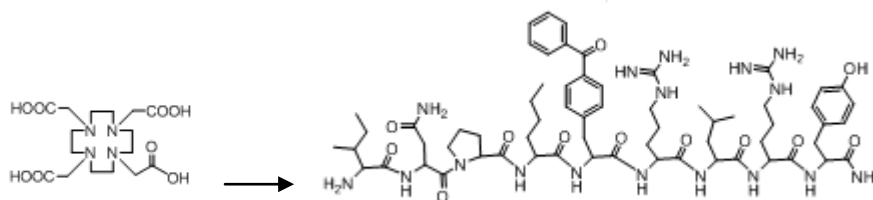


Figura 2.3 Esquema de acoplamento entre o DOTA e o NPY1.

Após conjugação entre o péptido e o DOTA é importante manter a afinidade de ligação do péptido para o recetor de forma a garantir um perfil de biodistribuição e características de alveamento tumoral adequados.

4. O espaçador (E) introduzido entre o péptido e o quelato bifuncional de forma a não comprometer a afinidade da biomolécula e/ou modulação da farmacocinética. A modulação pode implicar a alteração do carácter lipofílico da molécula com alteração do espaçador ou da carga.

Os conjugados peptídicos do NPY1 diferem nos espaçadores utilizados (assinalados na figura 2.4): no [GaDOTA]-NPY1 (**L1**) por ligação direta entre o DOTA e o NPY1 (**E1**), no Lys[GaDOTA]-NPY1 (**L2**) por introdução de uma lisina (**E2**) e no Ac-[Lys(DOTA)]-NPY1 (**L3**) por introdução de uma lisina acetilada (**E3**).

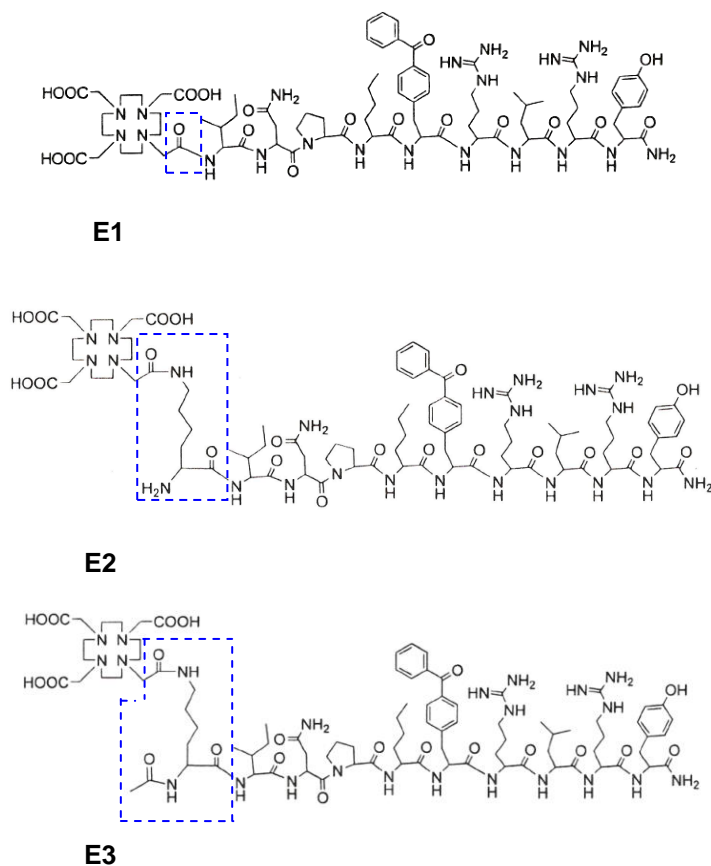


Figura 2.4 Estrutura química dos conjugados peptídicos L1 (E1), L2 (E2) e L3 (E3) com os diferentes espaçadores.

2.2 Radiossíntese e caracterização dos complexos [^{67}GaL]

O ^{67}Ga encontra-se comercialmente disponível sob a forma de Citrato de Gálio [^{67}Ga -Citrato] (*Mallinckrodt Medical B.V*, Holanda), um radiofármaco utilizado em diversos centros de Medicina Nuclear. Por este motivo, o conjugado peptídico **L1** foi inicialmente marcado com ^{67}Ga utilizando o ^{67}Ga -Citrato como precursor. Sucintamente, o complexo $^{67}\text{GaL1}$ foi obtido fazendo reagir o precursor ^{67}Ga -Citrato com o ligando **L1**, a pH 6, e aquecimento a 100°C durante 30 minutos. A avaliação do rendimento de marcação foi efetuada por ITLC-SG e por HPLC.

As condições reacionais, para a síntese do complexo $^{67}\text{GaL1}$, foram otimizadas estudando o efeito de vários parâmetros tais como o valor de pH, tempo e temperatura de marcação e concentração do conjugado peptídico **L1**. Esta otimização teve como base as condições mais favoráveis encontradas previamente no grupo para a síntese de complexos de ^{67}Ga com ligandos derivados do DOTA. Estes estudos demonstraram que para obter rendimentos de marcação elevados, usando como precursor o [^{67}Ga -Citrato], é necessário utilizar concentrações de conjugado peptídico **L1** relativamente elevadas, como se pode observar na figura 2.5 que relaciona a concentração de **L1** com a formação do complexo $^{67}\text{GaL1}$ (%).

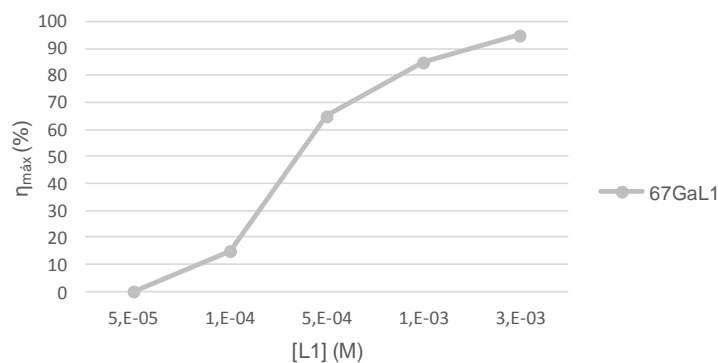


Figura 2.5 Variação do rendimento de marcação (%) em função da concentração final de ligando **L1** (M) usando como precursor o $[^{67}\text{Ga-Citrato}]$.

Pela análise do gráfico conclui-se que para atingir um elevado rendimento de marcação (>95%) é necessário utilizar uma concentração de conjugado peptídico **L1** relativamente elevada, na ordem dos $3 \times 10^{-3}\text{M}$ (100°C, 30 minutos, pH 6), conduzindo a uma preparação com uma atividade específica relativamente baixa. Este é um fator crucial que se deve ter em consideração durante o desenvolvimento de radiofármacos cujo mecanismo de acção envolve a ligação a recetores. Como a densidade dos recetores *in vivo* é muito baixa, a utilização de radiofármacos com baixa atividade específica pode conduzir à saturação dos recetores nas células tumorais. Para ultrapassar este problema, e obter uma preparação de $^{67}\text{GaL1}$ com elevada atividade específica, podem modificar-se as condições de marcação ou, alternativamente, efetuar uma purificação da mistura reacional por HPLC, separando o conjugado peptídico **L1** do complexo radioativo $^{67}\text{GaL1}$. Contudo, foi difícil otimizar um método de HPLC que permitisse separar convenientemente estes dois compostos. Além disso, esta possibilidade tem a desvantagem de exigir a síntese de uma grande quantidade de péptido, o que se torna crítico devido às condicionantes da síntese peptídica.

Devido às limitações referidas pela utilização de $^{67}\text{Ga-Citrato}$ como precursor e com o objetivo de obter complexos de ^{67}Ga com elevada atividade específica, procedeu-se à conversão do $[^{67}\text{Ga-Citrato}]$ a $[^{67}\text{GaCl}_3]$ utilizando um procedimento descrito na literatura em que foram introduzidas ligeiras modificações. Sucintamente, a conversão do Citrato de Gálio a Cloreto de Gálio foi efetuada por extração em fase sólida, utilizando mini-colunas de sílica gel (*Sep-Pak*, Waters, Irlanda). A solução aquosa de $[^{67}\text{Ga-Citrato}]$ foi aplicada na *Sep-Pak* que foi eluída com água destilada. Em seguida, a radioatividade retida na *Sep-Pak* foi eluída na forma de $[^{67}\text{GaCl}_3]$ usando HCl 0,1M como eluente ($V = 3\text{mL}$). A radioatividade de cada uma das frações foi medida em câmara de ionização e calculada a percentagem de conversão do citrato a cloreto que, em geral, foi obtida com rendimentos superiores a 95%.

A avaliação da pureza radioquímica do $[^{67}\text{GaCl}_3]$ preparado por esta metodologia foi determinada por ITLC-SG (ver 4.2.5) e HPLC (ver 4.2.6 – método 2) para averiguar se a conversão do citrato a cloreto foi completa e se havia a formação de espécies coloidais radioativas. No sistema de ITLC-SG (NaCl 0,9%/HCl 0,1M), as espécies coloidais ficam no ponto de aplicação ($R_f=0$), enquanto o $^{67}\text{GaCl}_3$ migra para a frente do solvente ($R_f=1$). A

análise dos radiocromatogramas permitiu-nos concluir que o $^{67}\text{GaCl}_3$ foi obtido com uma pureza radioquímica superior a 95%.

Uma vantagem inerente à utilização de $^{67}\text{GaCl}_3$ como precursor nas marcações com ^{67}Ga reside no facto do ^{68}Ga ser obtido do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ na mesma forma química ($^{68}\text{GaCl}_3$), permitindo otimizar as condições de marcação idênticas para a radiometalação de ligandos análogos com ^{68}Ga para aplicação em PET.

Otimização das condições de marcação dos complexos [^{67}GaL]

Genericamente, os complexos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) foram sintetizados por reação direta do [$^{67}\text{GaCl}_3$] com o respetivo conjugado peptídico (**L1-L3**), em tampão acetato de sódio. As condições reacionais para síntese dos complexos de ^{67}Ga , utilizando [$^{67}\text{GaCl}_3$] como precursor, foram otimizadas em relação à concentração de ligando, pH, temperatura e tempo de reação.

Otimização das condições de marcação do complexo [$^{67}\text{GaL1}$]

Na tabela 2.1 estão representadas as condições de otimização de marcação para o complexo $^{67}\text{GaL1}$.

Tabela 2.1 Condições de otimização de marcação para o complexo [$^{67}\text{GaL1}$].

Marcação	Concentração de ligando (M)	pH _{final}	Temperatura (°C)	Tempo de reação (min)	η (%)
A	1×10^{-5}	5	95	30	25
B	5×10^{-5}	5	95	30	75
C	8×10^{-5}	5	95	30	98
D	1×10^{-4}	5	95	30	99

Como já foi referido anteriormente, a reação de marcação com ^{67}Ga de conjugados peptídicos que contêm o ligando DOTA exigem, de um modo geral, temperaturas elevadas para obter elevados rendimentos de marcação. Este facto está relacionado com a elevada rigidez deste ligando, tendo como consequência uma cinética de complexação lenta e, no caso do Gálio a cavidade do macrociclo ser demasiado grande para encapsular o ião Ga^{3+} . Assim, optou-se por efetuar a marcação a 95°C , não se tendo observado qualquer degradação do conjugado peptídico ou dos complexos de ^{67}Ga a esta temperatura, pelo que se manteve ao longo do trabalho. No estudo da variação dos tempos de reação verificou-se que aumentando o tempo de marcação não ocorreu um aumento significativo no rendimento de marcação.

Relativamente ao valor de pH, observou-se que os rendimentos de marcação eram fortemente dependentes do pH da marcação. No caso de **L1** verificou-se que o rendimento de marcação era mais elevado quando se usavam valores de pH próximos de 5. Quando o valor de pH de marcação era demasiado baixo (pH <4,5) obtinha-se essencialmente cloreto de gálio livre. Por outro lado, para valores de pH superiores a 6 observava-se a formação de espécies coloidais insolúveis, comprometendo o rendimento de marcação (rendimento inferior a 60%).

Pela análise da tabela 2.1, verifica-se que usando concentrações de ligando (**L1**) inferiores a $5 \times 10^{-5}\text{M}$ se obtêm rendimentos de marcação inferiores a 75% (95°C , 30 minutos, pH5). A uma concentração de **L1** na ordem dos $8 \times 10^{-5}\text{M}$ atingiu-se um rendimento de marcação superior a 98% (similar ao uso de uma concentração de ligando de $1 \times 10^{-4}\text{M}$), pelo que foi a concentração utilizada na marcação do complexo $^{67}\text{GaL1}$. Nestas condições de marcação foi possível obter o complexo $^{67}\text{GaL1}$ com elevada atividade específica e elevado rendimento de marcação, obtendo-se elevada pureza radioquímica. A figura 2.6 ilustra a variação do rendimento de marcação em função da concentração final de **L1**.

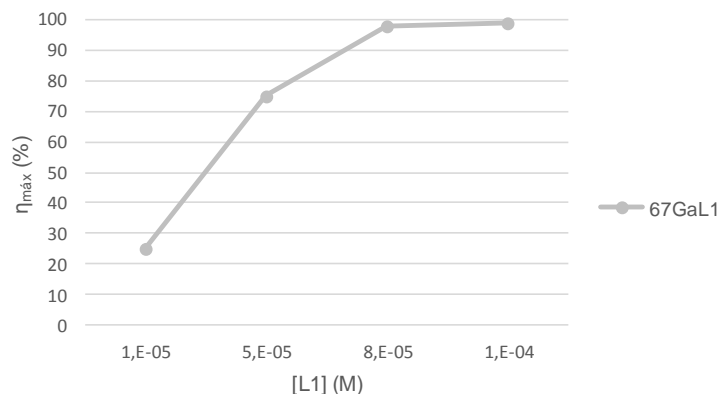
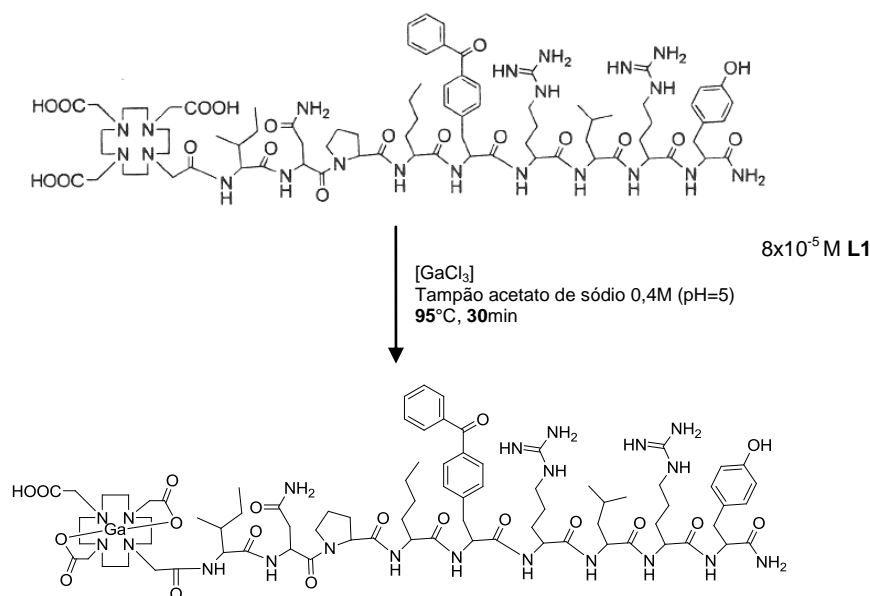


Figura 2.6 Variação do rendimento de marcação (%) em função da concentração final de ligando **L1** (M) usando como precursor o $^{67}\text{GaCl}_3$.

Após otimização das condições de marcação (esquema 2.1), o complexo foi obtido dissolvendo o conjugado peptídico **L1** (concentração final de $8 \times 10^{-5}\text{M}$) em tampão de acetato de sódio (0,4 M; pH=5). Após adição de $^{67}\text{GaCl}_3$ em HCl (0,1M), a solução foi incubada a 95°C durante 30 minutos até se obter o complexo final $^{67}\text{GaL1}$ com uma pureza radioquímica superior a 95% ($t_r=12,01$ min). O pH final de marcação foi de 5.



Esquema 2.1 Radiosíntese do complexo $^{67}\text{GaL1}$.

Posteriormente, o complexo $^{67}\text{GaL1}$ foi purificado por extração em fase sólida em coluna de sílica gel (*Sep-Pak C18*, Millipore, Suíça). Após aplicação da mistura reacional na *Sep-Pak*, a coluna foi lavada com H_2O para remoção do $^{67}\text{GaCl}_3$, eventualmente presente na marcação, seguida de eluição com $\text{TFA} 0,1\%/\text{CH}_3\text{CN}$ para recolha do complexo $^{67}\text{GaL1}$. Após neutralização com NaOH (0,1M) e evaporação do solvente, o complexo foi analisado e observou-se que não sofreu qualquer degradação.

A avaliação da pureza radioquímica do complexo foi realizada por ITLC-SG (ver 4.2.5) e HPLC (ver 4.2.6. – método 2). Os cromatogramas obtidos após eluição em NaCl 0,9%/HCl 0,1M (25/0,5ml) (Radiocromatograma A) ou em Metanol/HCl 6M (95/5) (Radiocromatograma B) são representados na figura 2.7.

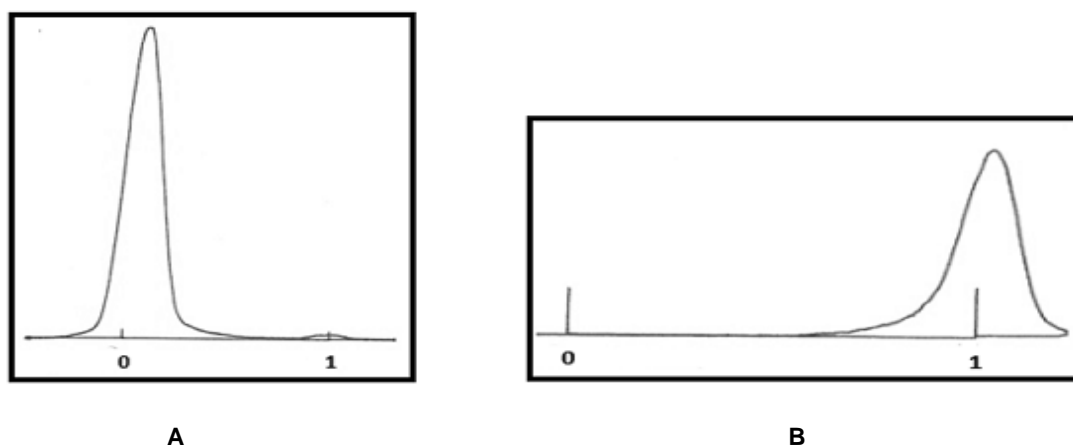


Figura 2.7 Radiocromatogramas do $[^{67}\text{GaL1}]$ em (A) NaCl 0,9%/HCl 0,1M e (B) Metanol/HCl 6M (95/5).

No sistema cromatográfico A (ITLC-SG/ NaCl 0,9%/HCl 0,1M), o complexo $^{67}\text{GaL1}$ e as espécies coloidais têm $R_f=0$ e o $[^{67}\text{GaCl}_3]$ tem $R_f=1$. No sistema cromatográfico B (ITLC-SG/ Metanol/HCl 6M (95/5)), o complexo $^{67}\text{GaL1}$ e o $[^{67}\text{GaCl}_3]$ têm $R_f=1$ e as espécies coloidais têm $R_f=0$. Pela análise dos cromatogramas A e B conclui-se que o complexo $^{67}\text{GaL1}$ tem uma pureza radioquímica superior a 98%, não sendo detetada a presença de colóides. A pureza radioquímica determinada por HPLC (98,8%) confirmou os resultados obtidos por ITLC-SG.

Na figura 2.8 apresenta-se o cromatograma obtido por HPLC para o complexo $^{67}\text{GaL1}$ nas condições de marcação otimizadas.

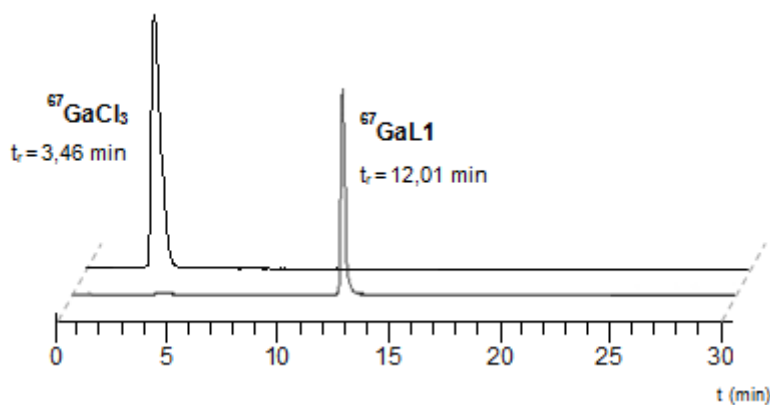


Figura 2.8 Cromatogramas de HPLC (deteção γ) do complexo $[^{67}\text{GaL1}]$ após purificação e do $[^{67}\text{GaCl}_3]$.

Como referido anteriormente, a caracterização dos complexos de ^{67}Ga não pode ser efetuada pelos métodos usuais em química inorgânica, devido às baixas concentrações dos complexos de ^{67}Ga em solução. Assim, admite-se que os complexos de ^{67}Ga tenham a mesma estrutura dos seus análogos inativos se apresentarem idêntico comportamento cromatográfico, quando analisados por HPLC, nas mesmas condições experimentais. Um detetor de radiação γ permite a deteção dos complexos de ^{67}Ga e um detetor de radiação ultravioleta-visível (UV-vis) permite a deteção dos complexos inativos de Gálio. Deste modo, a estrutura dos complexos de ^{67}Ga foi estabelecida por HPLC comparando o seu tempo de retenção (t_r) com o dos complexos análogos inativos, respetivamente (t_r ($^{67}\text{GaL1}$) = 20,9min; t_r ($^{67}\text{GaL1}$) = 21,6min). Na figura 2.9 apresentam-se os cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL1}$ e GaL1 (ver 4.2.6 – método 1). Os complexos inativos de gálio previamente sintetizados e caracterizados por ESI-MS e por HPLC permitem, não só caracterizar os conjugados peptídicos radioativos, mas também podem ser utilizados para determinar a afinidade de ligação ao recetor Y1.

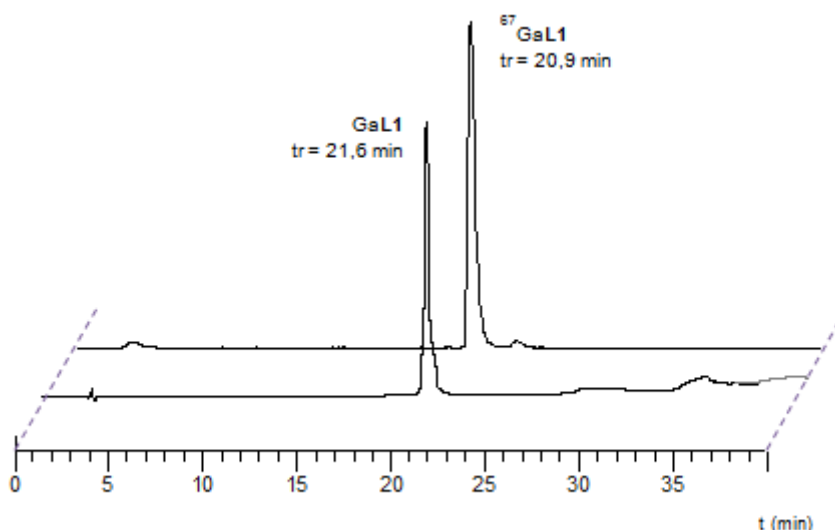


Figura 2.9 Cromatogramas de HPLC do complexo inativo GaL1 (deteção UV a 256nm) e do complexo análogo $^{67}\text{GaL1}$ (deteção γ).

Otimização das condições de marcação do complexo [$^{67}\text{GaL2}$]

Para otimização da marcação do complexo $^{67}\text{GaL2}$ (tabela 2.2) foram usadas, como referência, as condições previamente otimizadas para a síntese do complexo $^{67}\text{GaL1}$.

Tabela 2.2 Condições de otimização de marcação para o complexo [$^{67}\text{GaL2}$].

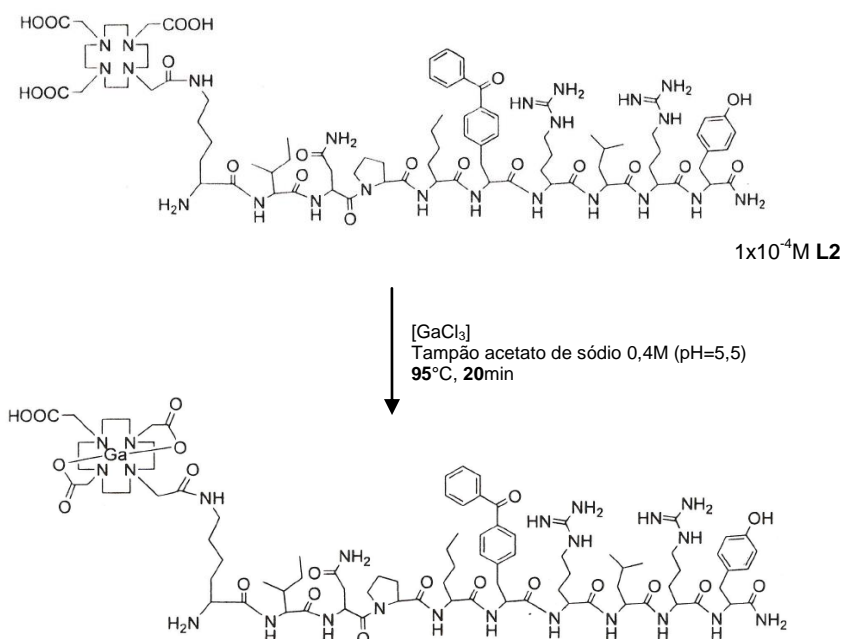
Marcação	Concentração de ligando (M)	pH _{final}	Temperatura (°C)	Tempo de reação (min)	η (%)
A	8×10^{-5}	5,5	95	20	60,26
B	8×10^{-5}	4,5	95	20	43,99
C	1×10^{-4}	5	95	20	98,6

No entanto, usando uma $[L2] = 8 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH}=5-5,5$ (95°C ; 20 minutos), verificou-se por ITLC-SG que ocorre a formação de colóides diminuindo significativamente o rendimento de marcação (rendimento de marcação: $^{67}\text{GaL2} \sim 60\%$). Neste contexto, foi necessário ajustar o pH de marcação para 4,5, mas para valores de pH abaixo de 5 observa-se a presença de $^{67}\text{GaCl}_3$ livre, diminuindo também o rendimento de marcação ($\eta \sim 44\%$). O pH mostrou-se um parâmetro fundamental na marcação do complexo, dado que modificações mínimas no valor de pH conduziram a intervalos de rendimentos de marcação muito variáveis (figura 2.10).



Figura 2.10 Variação do rendimento de marcação (%) em função do pH final para o complexo $[^{67}\text{GaL2}]$.

Os rendimentos de marcação e a pureza radioquímica com concentração final de ligando **L2** de $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ apresentavam valores $< 85\%$. Assim, procedeu-se ao ajuste da concentração limiar de marcação para 10^{-4} M . O complexo radioativo foi obtido por reação direta do $[\text{Lys(DOTA)}]\text{-NPY1}$ (concentração final de 10^{-4} M) com $[^{67}\text{GaCl}_3]$ em $0,1 \text{ M}$ de HCl numa solução tampão de acetato de sódio $0,4 \text{ M}$ a $\text{pH}=5,5$. A solução foi incubada a 95°C durante 20 minutos até se obter o complexo final $^{67}\text{GaL2}$ (esquema 2.2). O pH final da marcação foi de 5. A purificação radioquímica do complexo foi realizada nas condições referidas para o complexo $^{67}\text{GaL1}$.



Esquema 2.2 Radiosíntese do complexo [$^{67}\text{GaL2}$].

A análise dos cromatogramas de ITLC-SG (ver 4.2.5) para o complexo $^{67}\text{GaL2}$, após purificação, indicou a presença do complexo com uma pureza radioquímica superior a 95%, não sendo detetada a presença de colóides. A pureza radioquímica determinada por HPLC (ver 4.2.6 - método 2) foi de 98,6%. O cromatograma de HPLC obtido para o $^{67}\text{GaL2}$ ($t_r=11,46\text{min}$) está representado na figura 2.11.

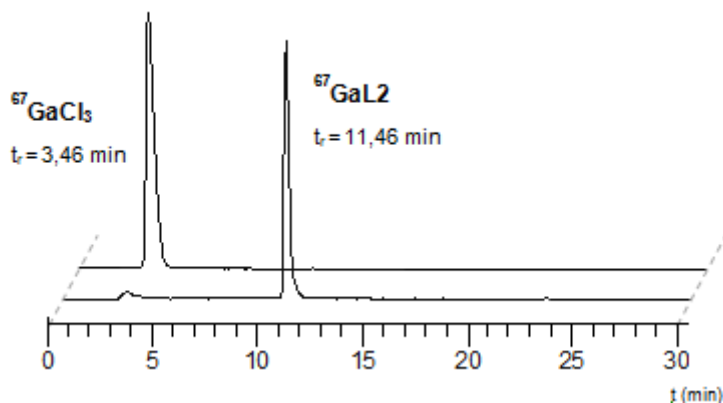


Figura 2.11 Cromatogramas de HPLC (deteção γ) do complexo [$^{67}\text{GaL2}$] após purificação e do [$^{67}\text{GaCl}_3$].

Como referido anteriormente, a caracterização do complexo [$^{67}\text{GaL2}$] foi feita por comparação com o perfil de HPLC do complexo de Gálio inativo (t_r ($^{67}\text{GaL2}$) = 19,21min; t_r (GaL2) = 19,76 min) (ver 4.2.6 – método 1).

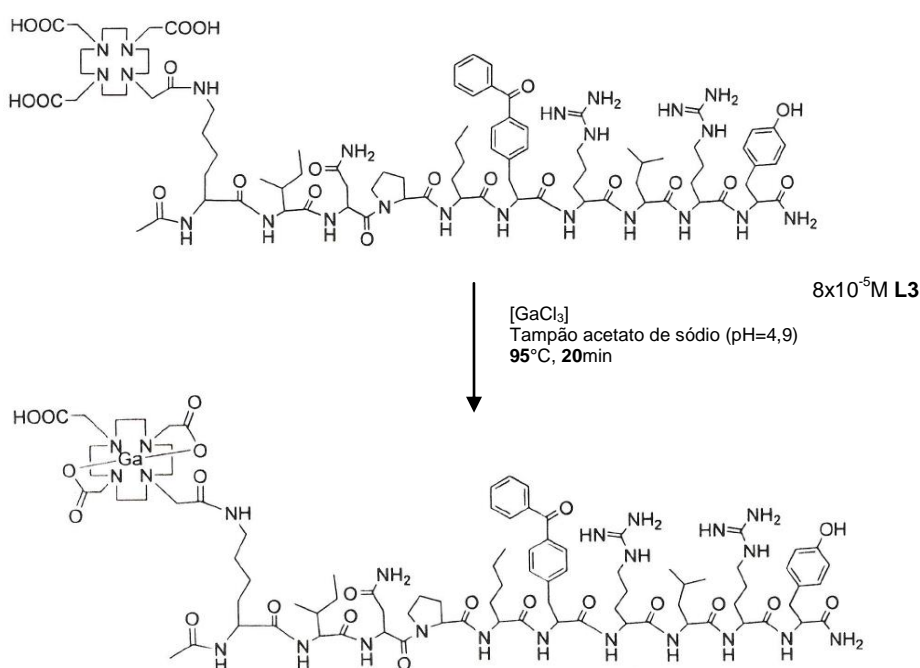
Otimização das condições de marcação do complexo [$^{67}\text{GaL3}$]

Na tabela 2.3 estão representadas as condições de otimização de marcação para o $^{67}\text{GaL3}$.

Tabela 2.3 Condições de otimização de marcação para o complexo $^{67}\text{GaL3}$.

Marcação	Concentração de ligando (M)	pH _{final}	Temperatura (°C)	Tempo de reação (min)	η (%)
A	8×10^{-5}	4,5	95	20	99,9
B	8×10^{-5}	4	95	20	<30
C	8×10^{-5}	5	95	20	<50

Pela análise da tabela 2.3 verifica-se que a pH 4 não ocorreu complexação ($\eta < 30\%$) e a pH 5 ocorreu a formação de colóides ($\eta < 50\%$). Após otimização das condições de marcação, o complexo foi preparado por dissolução do Ac-[Lys(DOTA)]-NPY1 (concentração de 8×10^{-5} M) em tampão de acetato de sódio 0,4M (pH=4,9). Após adição de $[\text{}^{67}\text{GaCl}_3]$ em HCl 0,1M, a solução foi incubada a 95°C durante 20 minutos até se obter o complexo final $[\text{}^{67}\text{GaL3}]$ com uma pureza radioquímica superior a 99% (esquema 2.3). O pH final de marcação foi de 4,5. A purificação radioquímica do complexo foi realizada nas condições referidas para o $[\text{}^{67}\text{GaL1}]$.

**Esquema 2.3** Radiosíntese do complexo $[\text{}^{67}\text{GaL3}]$.

A análise dos cromatogramas de ITLC-SG (ver 4.2.5) para o complexo $[\text{}^{67}\text{GaL3}]$ indicou a presença do complexo com uma pureza radioquímica superior a 95%. A pureza radioquímica determinada por HPLC (ver 4.2.6 - método 2) foi de 99,9% ($t_r = 12,12 \text{ min}$).

Tal como para os complexos já estudados, a caracterização do complexo $[\text{}^{67}\text{GaL3}]$ foi feita por comparação com o perfil de HPLC do complexo de Gálio inativo (t_r ($^{67}\text{GaL3}$) = 19,88 min; t_r (**GaL3**) = 21,09 min) (ver 4.2.6 – método 1).

Em resumo, as condições otimizadas para a preparação dos complexos $^{67}\text{GaL1}$, $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL3}$ são descritas na tabela 2.4:

Tabela 2.4 Condições experimentais de preparação e características dos complexos de ^{67}Ga .

Complexo	η (%)	Concentração de ligando (M)	Tempo de reação (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH_{final}	t_r (min)
$^{67}\text{GaL1}$	98,8%	8×10^{-5}	25	95	5	12,01
$^{67}\text{GaL2}$	98,6%	1×10^{-4}	20	95	5	11,46
$^{67}\text{GaL3}$	99,9%	8×10^{-5}	20	95	4,5	12,12

Pela análise da tabela 2.4 conclui-se que variações na estrutura dos conjugados peptídicos exigem condições de marcação ligeiramente diferentes para se obter os complexos de ^{67}Ga com elevada pureza radioquímica. O valor de pH e a concentração de ligando são os dois fatores que mais influenciaram o rendimento de marcação. A pH inferior a 4,5 e superior a 5,5 não são as condições ideais para a marcação dos complexos, dado que a pH baixo pode não ocorre complexação e a pH elevado ocorre a formação de colóides.

2.3 Estudos de Estabilidade *in Vitro*

Um parâmetro importante a ter em consideração durante o desenvolvimento de um composto radioativo com potencial aplicação clínica é a avaliação da sua estabilidade *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, um radiofármaco para aplicação clínica ou administração a animais de experiência deve possuir elevada pureza radioquímica, estar preferencialmente em solução aquosa e a pH fisiológico sendo, no entanto, admitidos valores de pH diferentes devido ao elevado poder tampão do sangue. Estas condições podem afetar a estabilidade do composto radioativo, devendo a sua estabilidade ser estudada *in vitro* nas mesmas condições em que vai ser mantida a preparação, de modo a avaliar se existe qualquer tipo de degradação do composto radioativo e avaliar o tempo e as condições em que este pode ser mantido, após marcação e antes da sua aplicação.

Os estudos de estabilidade *in vitro* também devem ser efetuados em condições que sejam preditivas da estabilidade dos complexos *in vivo*, face à degradação e transquelatação do ligando por substratos biológicos como proteínas, aminoácidos ou outras moléculas presentes em meio biológico ou tecidual e que apresentem afinidade para o metal. Assim, procedeu-se ao estudo da estabilidade *in vitro* dos complexos em condições fisiológicas, tampão fosfato salino (PBS 0,1 M, pH 7,4) ou NaCl 0,9% à temperatura de 37°C . Foram também efetuados estudos de competição com o DTPA e com a apotransferrina e determinação da ligação às proteínas plasmáticas.

2.3.1 Estabilidade à temperatura ambiente

Como referido, a estabilidade à temperatura ambiente permite avaliar o intervalo de tempo de uso clínico e as condições de conservação dos complexos de ^{67}Ga . Alíquotas das soluções contendo os complexos, mantidas à temperatura ambiente, foram analisadas por ITLC-SG (ver 4.2.5) e HPLC (ver 4.2.6 – método 2), ao longo do tempo (até às 48 h). Na figura 2.12 está representada a estabilidade dos complexos de ^{67}Ga , mantidos à temperatura ambiente, nos intervalos de tempo em estudo (12h, 24h e 48h). Nestas condições, todos os complexos ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) se mostraram estáveis, mesmo 24h após preparação. Contudo, o complexo $^{67}\text{GaL2}$ revelou uma estabilidade inferior quando mantido à temperatura ambiente durante 48 horas (pureza radioquímica = 86,2%) comparativamente aos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ que mantêm uma pureza radioquímica superior a 95%.

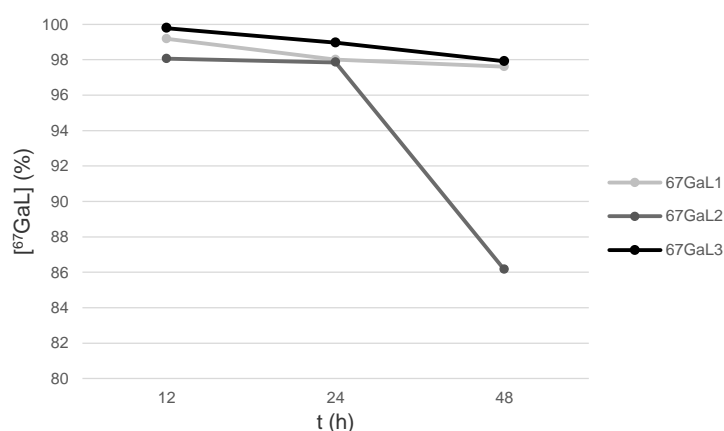


Figura 2.12 Estabilidade à temperatura ambiente dos complexos de ^{67}Ga nos diferentes intervalos de tempo.

A título ilustrativo, na figura 2.13 apresentam-se os radiocromatogramas obtidos para o complexo $^{67}\text{GaL3}$ após 12h, 24h e 48h de incubação à temperatura ambiente, respetivamente. Pela análise dos cromatogramas confirma-se que o complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=12,12$ min) é estável à temperatura ambiente até às 48 horas (pureza radioquímica =98,8 %).

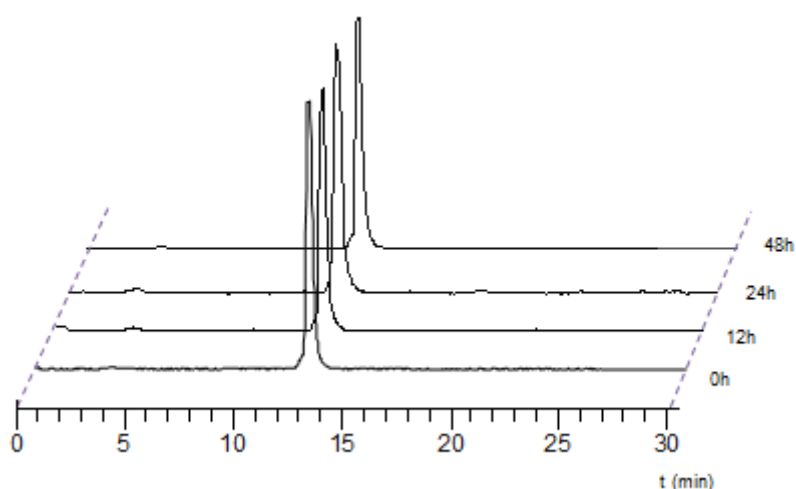


Figura 2.13 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ (detecção γ) à temperatura ambiente nos diferentes intervalos de tempo.

2.3.2. Estabilidade em PBS 0,1M pH7,4 a 37°C

Para avaliar a estabilidade dos complexos de ^{67}Ga em condições fisiológicas os complexos $^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$ foram diluídos em tampão fosfato salino pH=7,4 e/ou NaCl0,9% e incubados a 37°C. Após incubação, foram recolhidas alíquotas da solução e a pureza radioquímica foi analisada por ITLC-SG (ver 4.2.5) e HPLC (ver 4.2.6 - método 2) ao longo do tempo (12h, 24h e 48h). Estes estudos demonstraram que os radiocomplexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ não sofreram qualquer processo de degradação (pureza radioquímica > 98%) até às 48 horas de incubação, revelando elevada estabilidade *in vitro* em condições fisiológicas como se pode observar na figura 2.14 para o $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=12,12$ min) até às 48 horas após marcação.

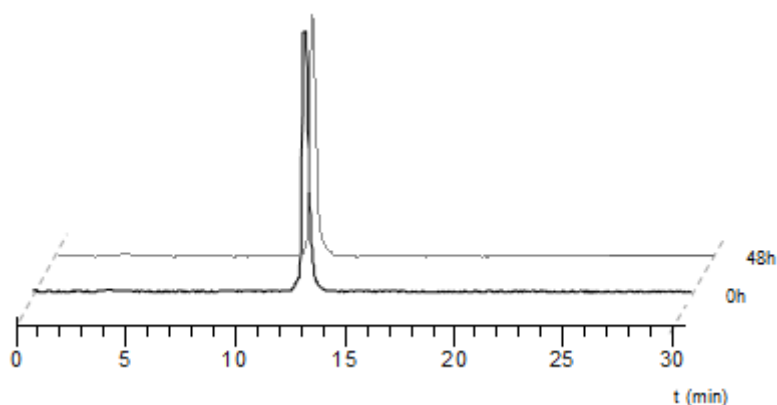


Figura 2.14 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ (deteção γ) em PBS 0,1M (pH7,4; 37°C).

O complexo $^{67}\text{GaL2}$ é instável em PBS 0,1M (pH 7,4) e à temperatura fisiológica, formando espécies radioquímicas mais hidrofílicas. De facto, após diluição em PBS e incubação a 37°C apenas 31,7 % e 13 % do complexo se mantinha intacto após 12 e 48 horas de incubação, respetivamente. Surpreendentemente, quando avaliada a pureza radioquímica deste complexo em soro fisiológico, a 37°C, não se observou processos de degradação significativos até às 48 horas de incubação (pureza radioquímica > 90%). Contudo, observa-se alguma tendência para a formação de uma espécie radioquímica com o mesmo tempo de retenção que o $^{67}\text{GaCl}_3$ (figura 2.15). A diferença de estabilidade encontrada em PBS e soro fisiológico pode estar relacionado com a força iónica do meio ou com o pH da solução.

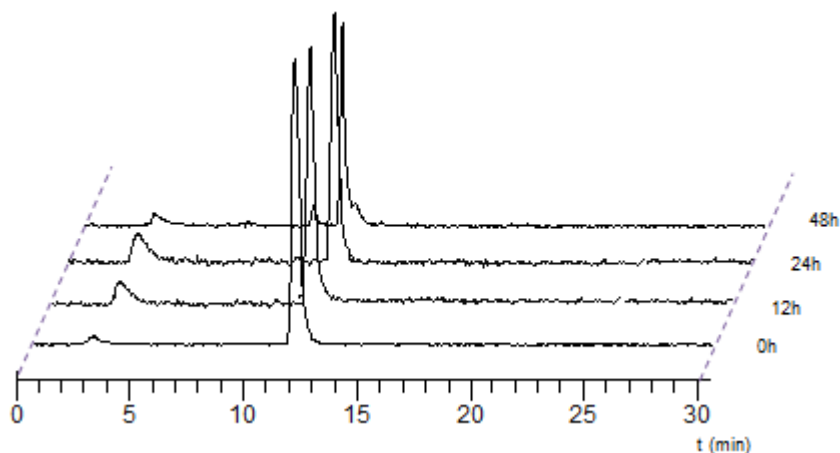


Figura 2.15 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL2}$ (deteção γ) em NaCl 0,9% a 37°C.

2.3.3. Estabilidade na presença de DTPA e apotransferrina

Como referido no capítulo introdutório, o Gálio liga-se facilmente à transferrina e a outras proteínas biológicas, podendo os complexos de Gálio sofrer reações de transquelatação *in vivo*. De modo a prever a influência de eventuais competidores biológicos na estabilidade *in vivo* dos complexos de ^{67}Ga face a processos de transquelatação foram desenvolvidos ensaios de competição na presença de DTPA e apotransferrina.

2.3.3.1. Estudos de competição com DTPA

Os complexos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) foram incubados com soluções de DTPA em tampão acetato de sódio 0,4 M (pH=5), a temperatura fisiológica (37°C), sendo a concentração final de DTPA de 10^{-3} M. As soluções resultantes foram analisadas e determinada a pureza radioquímica por HPLC (ver 4.2.6 - método 2), ao longo do tempo (30min, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h). Na figura 2.16 apresentam-se os resultados obtidos para o complexo $^{67}\text{GaL3}$ na presença de DTPA nos diferentes tempos em estudo. Estes estudos demonstraram que o complexo $^{67}\text{GaL3}$ não sofre transquelatação na presença de DTPA, tendo a preparação radioativa no final do ensaio uma pureza radioquímica de 94,4% (72 horas de incubação a 37°C). Não se verificou qualquer processo de transquelatação com o DTPA.

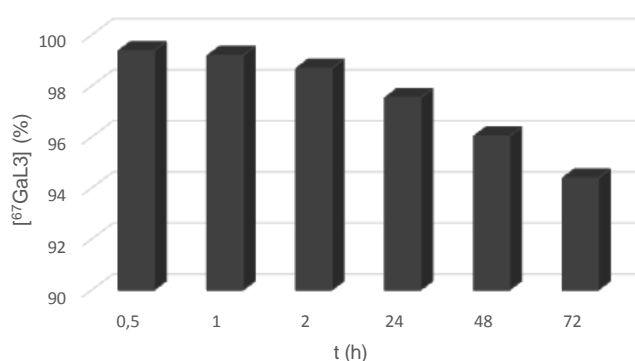


Figura 2.16 Estabilidade do complexo $^{67}\text{GaL3}$ na presença de DTPA.

2.3.3.2 Estudos de competição com a apotransferrina

Nos ensaios competitivos com a apotransferrina foi adicionada ao complexo de ^{67}Ga uma solução com excesso de proteína (3mg/ml) face à concentração de ligando. As soluções resultantes foram analisadas por HPLC (ver 4.2.6 - método 2) ao fim de 30min, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h de incubação a 37°C, de modo a avaliar a eventual degradação do complexo, nomeadamente através de processos de transquelatação. Os resultados obtidos para os complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ encontram-se representados na figura 2.17, respetivamente.

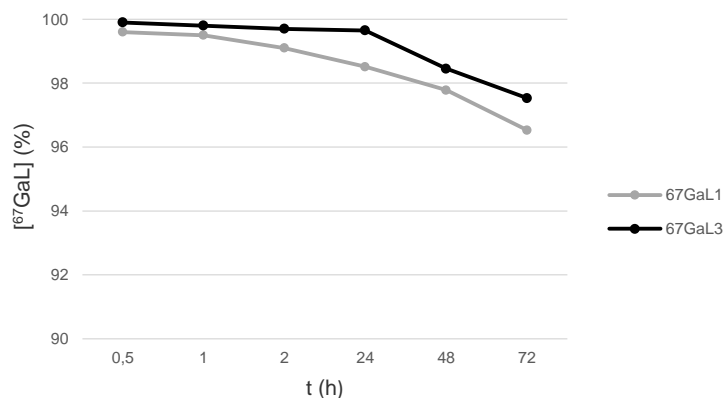


Figura 2.17 Estudo de competição com a apotransferrina dos complexos [$^{67}\text{GaL1}$] e [$^{67}\text{GaL3}$] nos diferentes intervalos de tempo.

Pela análise da figura 2.17 conclui-se que o complexo $^{67}\text{GaL1}$ é estável na presença de apotransferrina até às 72 horas de incubação (37°C), pois 96,5% do complexo inicial encontra-se presente em solução, o mesmo acontecendo com o complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=12,12\text{min}$) que permanece na sua forma intacta até às 72 horas (97,53%). Assim, pode-se inferir que os complexos de ^{67}Ga em estudo apresentam baixa reatividade na presença de apotransferrina, sendo pouco suscetíveis a processos de transquelatação. Os cromatogramas de HPLC relativos à estabilidade do complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=12,12\text{min}$) às 0,5h, 24h e 72h estão representados na figura 2.18.

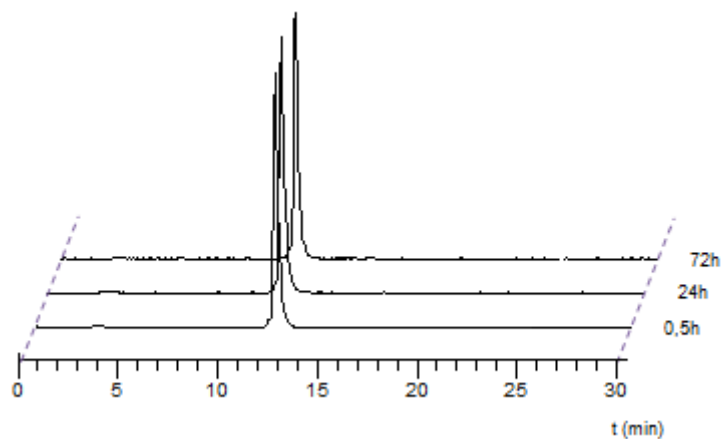


Figura 2.18 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ relativos à estabilidade em apotransferrina após incubação a 37°C às 0,5h, 24h e 72h.

2.3.4. Determinação da Ligação às Proteínas Plasmáticas

A determinação da percentagem de ligação às proteínas plasmáticas correlaciona-se com a biodistribuição dos complexos e a sua fixação nos órgãos alvo. Na figura 2.19 está representada a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas dos complexos de ^{67}Ga .

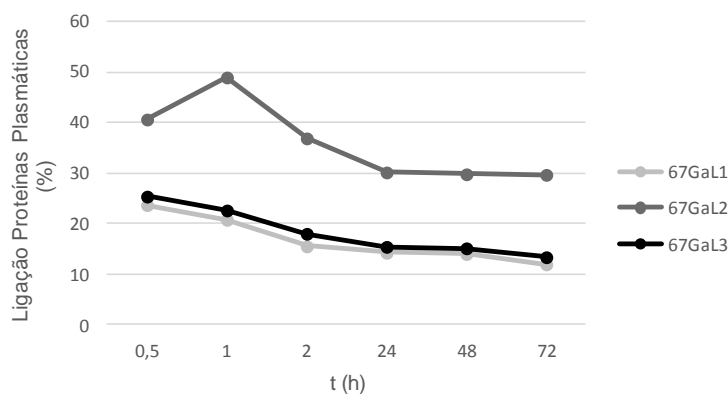


Figura 2.19 Percentagem de ligação às proteínas plasmáticas dos complexos de ^{67}Ga nos vários tempos de incubação (37°C).

O $^{67}\text{GaL1}$ e o $^{67}\text{GaL3}$ apresentam um comportamento similar, com uma ligação máxima às proteínas plasmáticas aos 30 minutos (23,7% e 25%, respetivamente), enquanto que o $^{67}\text{GaL2}$ apresenta uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas superior, tendo-se obtido uma percentagem de ligação máxima de 49% após 1 hora de incubação a 37°C.

Elevadas taxas de ligação às proteínas plasmáticas podem contribuir para um perfil farmacocinético desfavorável, dado que ocorre diminuição das taxas de eliminação sanguínea e de excreção do complexo, pelo que as taxas de ligação apresentadas para os complexos em estudo (< 50%) tornam a utilização destes complexos vantajosa. A diminuição da taxa de ligação às proteínas plasmáticas ao longo do tempo indica uma ligação reversível, fazendo antever um perfil farmacocinético favorável.

Na figura 2.20 está representada a estabilidade em soro humano dos complexos de ^{67}Ga ao longo do tempo nos intervalos de tempo em estudo (30min, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h).

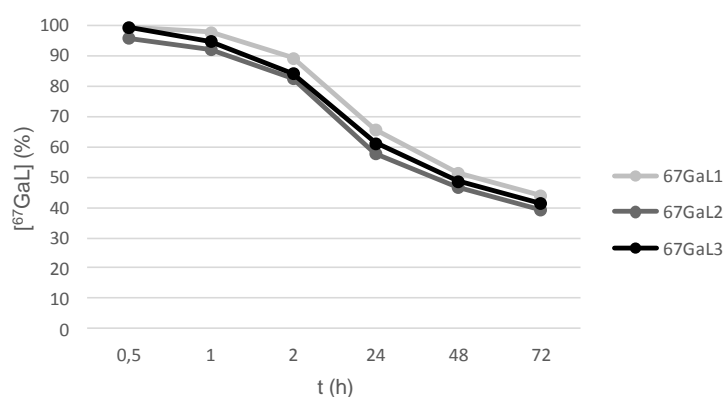


Figura 2.20 Estabilidade em soro humano dos complexos de ^{67}Ga nos diferentes tempos em estudo.

Pela análise dos cromatogramas referentes à estabilidade em soro humano pode concluir-se que os complexos não permanecem estáveis no soro humano após as 2 horas de incubação, sendo que o complexo $^{67}\text{GaL2}$ é aquele que apresenta menor estabilidade (39,4% às 72h).

2.3.5. Determinação da lipofília

O coeficiente de lipofília determina a via de excreção privilegiada dos radioconjugados, sendo que quanto maior for a lipofília, maior será a excreção pela via hepatobiliar e mais intensa será a captação abdominal, o que poderá mascarar eventuais lesões tumorais. Preferencialmente, os radiopéptidos devem ser hidrofílicos, de modo a assegurar uma rápida eliminação por via renal.

A lipofília dos complexos de ^{67}Ga purificados foi determinada pelo coeficiente de partição (P) no sistema bifásico n-octanol/PBS 0,1 M (pH=7,4). O coeficiente de partição ($D_{O/w}$) é a razão entre a atividade da fase orgânica e a da fase aquosa. Os resultados obtidos foram expressos sob forma de $\text{Log } D_{O/w}$ (pH=7,4).

Tabela 2.5 Valores de $\text{Log } D_{O/w}$ determinados para os complexos de ^{67}Ga .

Complexo	$A_{\text{média}}$ Octanol (cpm)	$A_{\text{média}}$ PBS (cpm)	$D_{O/w}$	$\text{Log } D_{O/w} \pm \text{DP}$ (pH=7,4)
$^{67}\text{GaL1}$	4963,6	359602,4	0,013803	-1,86 \pm 0,14
$^{67}\text{GaL2}$	1251,4	464307,6	0,002695	-2,57 \pm 0,01
$^{67}\text{GaL3}$	506	110804	0,004567	-2,34 \pm 0,01

Analisando os resultados apresentados na tabela 2.5, conclui-se que os complexos de ^{67}Ga apresentam um carácter hidrofílico acentuado. O comportamento descrito pode ser justificado pela elevada hidrofília do quelato DOTA e pela presença de um grupo carboxílico livre após complexação com o ^{67}Ga . Os complexos $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL3}$ são os mais hidrofílicos, pelo que se conclui que a introdução do espaçador de lisina e possível alteração da carga dos complexos influencia o comportamento hidrofílico dos complexos e, conseqüentemente o perfil farmacocinético dos mesmos. O $^{67}\text{GaL2}$ é o radioconjugado mais hidrofílico pelo que se verifica a proteção/desproteção do grupo amina influencia o carácter hidrofílico dos complexos [$^{67}\text{GaL2}$] (NH_2 desprotegido) e [$^{67}\text{GaL3}$] (NH_2 protegido).

Os estudos *in vitro* indicam que os complexos têm elevada estabilidade, pelo que foram considerados promissores para serem estudados em linhas celulares e em modelos animais saudáveis para determinação do perfil farmacocinético e da estabilidade *in vivo*.

2.4 Avaliação biológica dos complexos [^{67}GaL]

2.4.1 Internalização em linhas celulares MFC-7 e B16F1

Um dos grandes desafios do desenvolvimento de sondas radioativas consiste na marcação de péptidos (e.g. análogos do NPY) com ^{68}Ga para PET devido ao desenvolvimento do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. No entanto, o desenvolvimento de sondas peptídicas de análogos do NPY, marcadas com $^{67/68}\text{Ga}$, que mantenham elevada afinidade e selectividade para o recetor Y1, eficazes para imagem tumoral, é uma tarefa complexa. Para uma melhor qualidade de imagem é essencial garantir uma elevada eficiência de acumulação e alveamento tumoral. Os

análogos agonistas eram considerados mais adequados, sendo a capacidade de internalização do radiocomplexo considerada um pré-requisito para uma captação e retenção intracelular eficientes.

Os estudos de internalização celular de uma sonda radioativa pretendem avaliar a sua captação celular, mediada por um determinado recetor. Assim, quanto maior for a percentagem de internalização, maior será o seu potencial agonista que, em geral, está relacionado com a retenção celular e alveijamento tumoral. Neste contexto, realizaram-se estudos para determinar a taxa de internalização dos complexos de ^{67}Ga vetorizados com os análogos curtos do NPY de modo a prever o seu comportamento *in vivo*.⁹⁶

Os estudos de internalização dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ foram efetuados em linhas celulares MCF-7 de adenocarcinoma da mama humano que expressam o recetor Y1, e de melanoma melanótico murino, B16F1.⁹⁷

A avaliação da internalização do complexo $^{67}\text{GaL3}$ foi realizada para frações não purificadas e purificadas, mas dado o seu comportamento biológico semelhante, apenas serão apresentados os resultados para o composto purificado. Para o complexo $^{67}\text{GaL1}$ foram realizados estudos em paralelo com bloqueio do recetor com o agonista pNPY no sentido de avaliar a especificidade do mecanismo (se mediado pelos recetores do NPY).

Os estudos de captação e internalização celular dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ em células MCF-7 apresentam-se na figura 2.21.

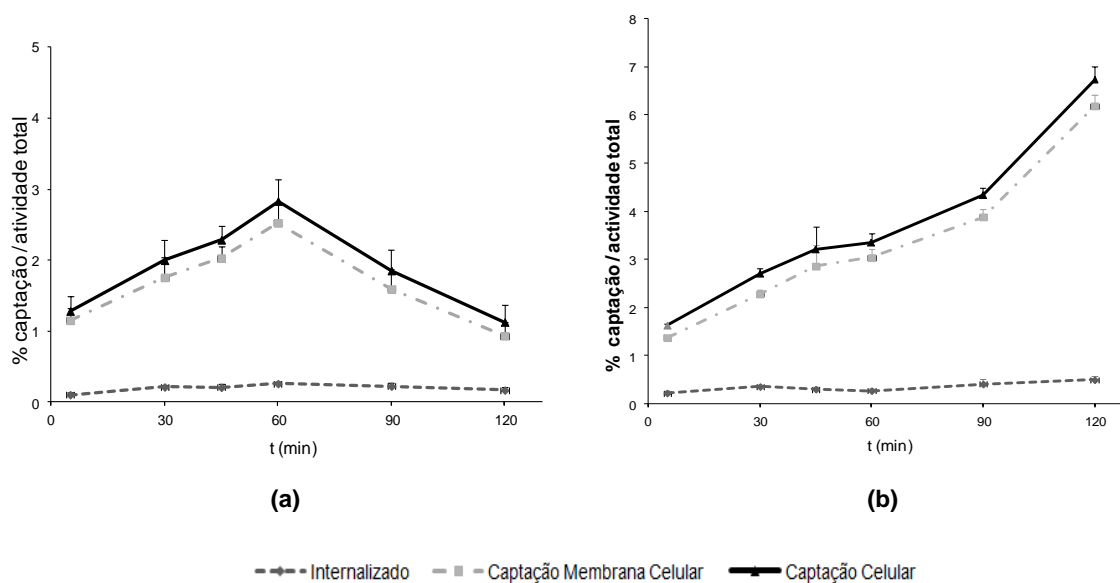


Figura 2.21 Captação celular (captação na membrana celular e internalização) dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ (a) e $^{67}\text{GaL3}$ (b) em células MCF-7 para diferentes períodos de tempo (37°C). A atividade associada à membrana celular e internalizada foram expressas em percentagem de atividade total (média \pm desvio padrão de quatro replicados).

A análise dos resultados permite-nos concluir que ambos os radiopéptidos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ apresentam uma fraca capacidade de internalização celular. No entanto, o complexo $^{67}\text{GaL3}$ apresenta valores de internalização celular superiores ao complexo $^{67}\text{GaL1}$ (0,49% \pm

0,08% vs. $0,26\% \pm 0,03\%$). Os valores de captação na membrana celular são substancialmente superiores para o complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($6,19\% \pm 0,23\%$) comparativamente ao complexo $^{67}\text{GaL1}$ ($2,52\% \pm 0,29\%$) (figura 2.22). No entanto, com os estudos efetuados não é possível saber se esta captação na membrana celular é ou não mediada pelo recetor Y1. Por outro lado, para o radiopéptido $^{67}\text{GaL1}$ a atividade associada à membrana celular aumenta progressivamente até atingir o valor máximo ($2,52 \pm 0,29\%$ aos 60 min), diminuindo significativamente a partir desse tempo. Pelo contrário, para o radiopéptido $^{67}\text{GaL3}$ a captação na membrana celular vai sempre aumentando durante o tempo de realização do ensaio (até às 2h), pelo que para este radiopéptido poderia ser pertinente a leitura de tempos mais tardios afim de esclarecer se ocorre saturação do recetor e estabilização da captação na membrana.

Na figura 2.22 estão representados os valores de internalização e captação na membrana celular obtidos para os complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ nas células MCF-7 a 37°C nos tempos 30, 60 e 120 minutos.

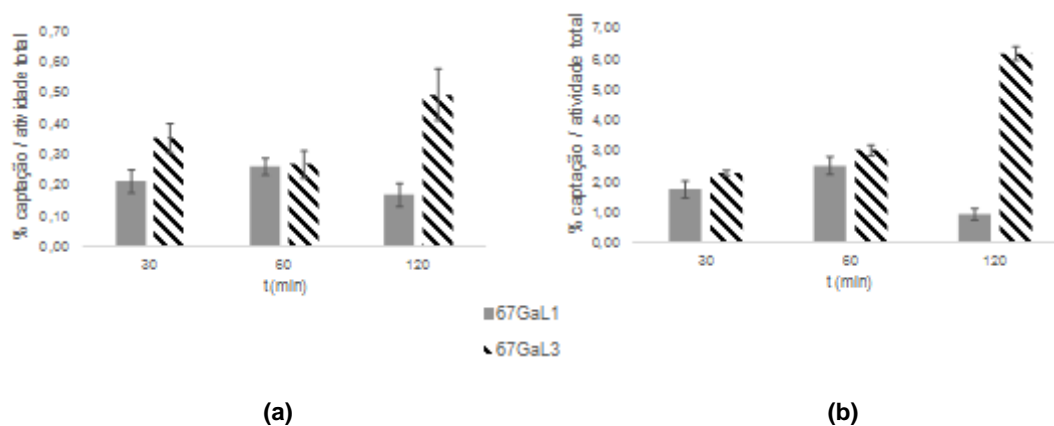


Figura 2.22 Internalização (a) e captação na membrana (b) dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ em linhas celulares MCF-7 para diferentes períodos de tempo (37°C).

De forma a avaliar se o radiopéptido $^{67}\text{GaL1}$ apresentava uma ligação específica ao recetor foram efetuados, em paralelo, estudos de captação celular na presença de uma elevada concentração de pNPY (1 mM) bloqueando os recetores Y1 (figura 2.23).

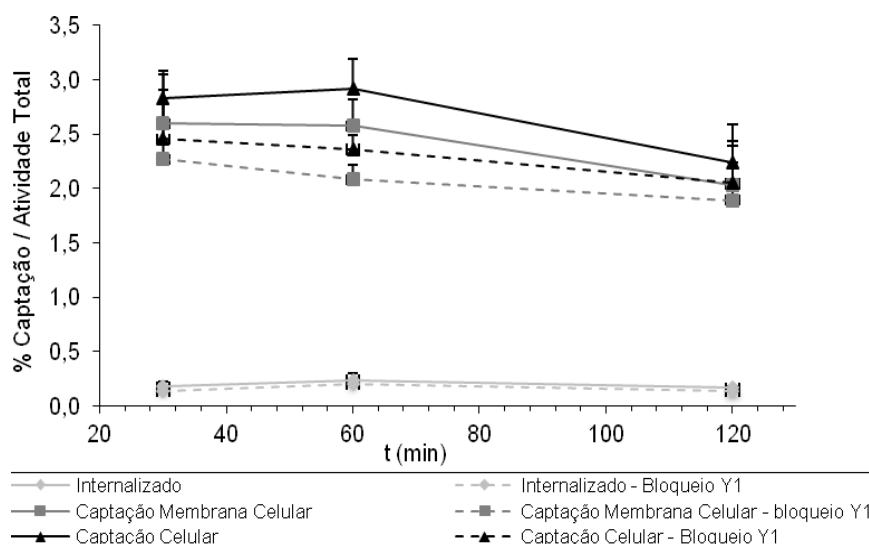


Figura 2.23 Captação celular e internalização do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado em células MCF-7 nos diferentes períodos de tempo (37°C) com e sem bloqueio do recetor Y1. A associação à membrana celular e a atividade de internalização está expressa em percentagem de atividade total (média \pm desvio padrão de quatro replicados).

Os resultados obtidos mostram que houve uma ligeira diminuição não significativa da percentagem de radiopéptido internalizado na presença do pNPY (0,20% \pm 0,02% relativamente a 0,24% \pm 0,07%, 1h). A reduzida diferença nas percentagens de atividade internalizada pode ser justificada pelos baixos valores de internalização mesmo sem o bloqueio do recetor Y1. A atividade ligada à membrana celular após 1h de incubação com bloqueio do recetor Y1 diminuiu, mas de forma pouco significativa, de 2,58% \pm 0,25% para 2,08% \pm 0,13%. Esta diminuição parcial (incompleta) parece indicar que nem toda a ligação à membrana é específica e mediada pelo recetor Y1.

A baixa internalização dos radiopéptidos poderá indicar que houve perda de afinidade para o recetor Y1. De facto, apesar da sequência peptídica inicial [Pro³⁰-Nle³¹-Bpa³²-Leu³⁴]NPY (28-36)] ter revelado uma boa afinidade para o Y1R (IC₅₀ = 29,7 \pm 6,8nM), o péptido pode ter perdido a afinidade para o recetor devido às modificações estruturais efetuadas (e.g. introdução do agente quelante DOTA e/ou por complexação com o metal). Como referido no capítulo introdutório, a inserção de um espaçador permite aumentar a distância do centro metálico à biomolécula, minimizando a possibilidade de modificação das propriedades biológicas, e modelar a farmacocinética mediante a introdução de grupos funcionais de natureza diversa.^{23,78,88} No complexo $^{67}\text{GaL3}$ o espaçador é mais longo, afastando o péptido do centro metálico com o intuito de minimizar impedimentos estereoquímicos na ligação ao recetor e manter a afinidade para o recetor Y1.

Para esclarecer esta questão, é imprescindível efetuar estudos de afinidade para o recetor Y1 dos diferentes conjugados peptídicos e dos complexos inativos de Gálio (GaL1-GaL3). Os resultados de afinidade obtidos permitiriam concluir se a baixa internalização observada é devida a uma eventual perda de afinidade para o recetor Y1. Por outro lado, pode-se colocar a hipótese do péptido inicial (previamente avaliado como agonista) ter adquirido

carácter antagonista devido às alterações estruturais introduzidas, o que justificaria as baixas internalizações observadas. Contudo, o comportamento antagonista associado aos radioconjugados pode não ser desvantajoso desde que os radioligandos mantenham elevada afinidade para o recetor Y1, podendo ser explorados como potenciais sondas de imagiologia molecular dos tumores que expressam estes recetores. De facto, comparativamente a agonistas, observa-se ligação a um maior número de recetores, captação e retenção tumoral *in vivo* significativamente superior, razões tumor/órgãos superiores e perfis farmacocinéticos mais favoráveis. A internalização celular poderá não constituir um requisito fundamental para imagem tumoral *in vivo*. Estudos pré-clínicos mostram elevada captação de radioconjugados antagonistas nos recetores da somatostatina comparativamente a agonistas. Os estudos desenvolvidos com o complexo ^{111}In -DOTA-BASS, o primeiro antagonista da somatostatina para imagem tumoral, mostraram um perfil farmacocinético com menor captação renal, hepática e esplénica e fixação tumoral superior comparativamente ao ^{111}In -DTPA-Octreótido, inferindo-se a viabilidade no uso de antagonistas sst para diagnóstico e terapia de tumores neuroendócrinos.⁹⁷

Ainda com o objetivo de avaliar a especificidade da ligação dos radiopéptidos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ foram também realizados estudos de captação celular para os mesmos tempos de incubação a 37°C nas células de melanoma melanótico murino, B16F1, que supostamente não expressam o recetor Y1. Nas figuras 2.24 e 2.25 estão representados os resultados da percentagem de captação celular por atividade total para os tempos 30, 60 e 120 minutos nas duas linhas celulares.

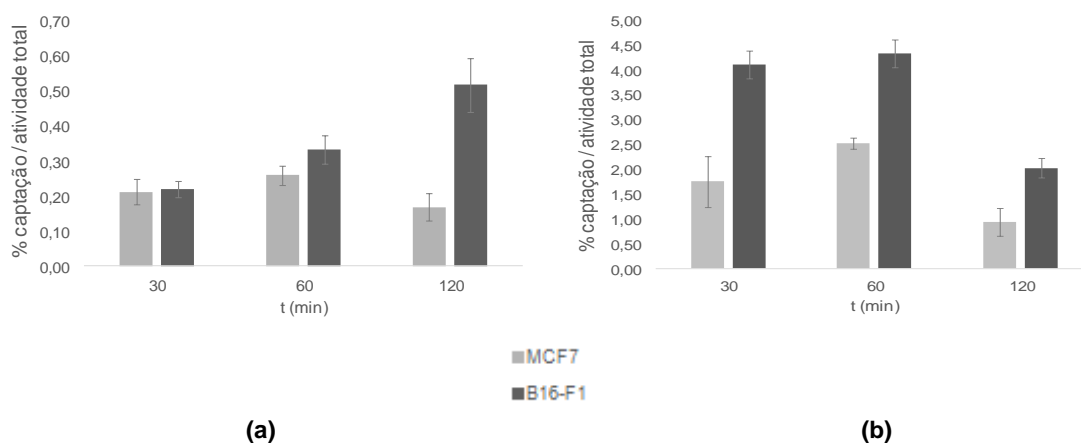


Figura 2.24 Internalização (a) e captação na membrana (b) do complexo $^{67}\text{GaL1}$ em linhas celulares MCF-7 e B16F1 para diferentes períodos de tempo (37°C).

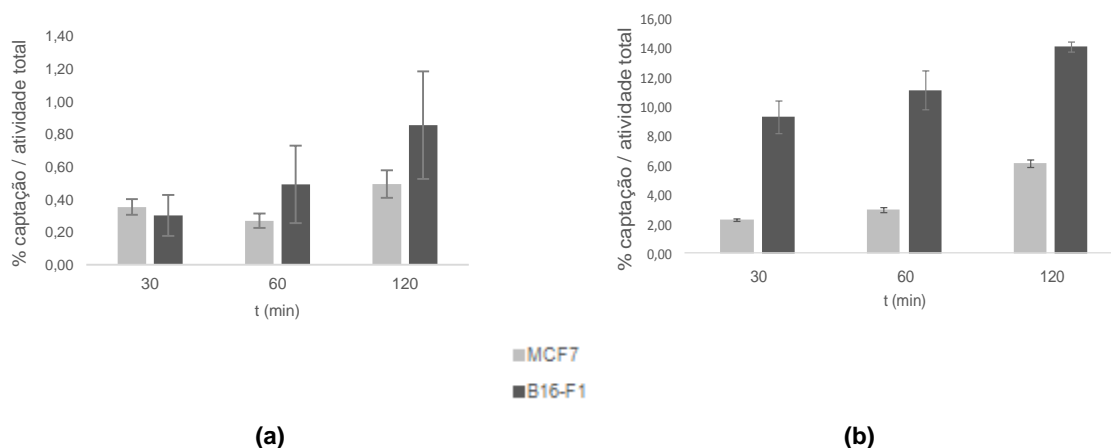


Figura 2.25 Internalização **(a)** e captação na membrana **(b)** do complexo $^{67}\text{GaL3}$ em linhas celulares MCF-7 e B16F1 para diferentes períodos de tempo (37°C).

Pela análise das figuras 2.24 e 2.25 verifica-se que, ao contrário do esperado, a captação e internalização dos dois radiopéptidos ($^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$) nas células B16F1 é superior ao observado para as células MCF-7. No entanto, nas células B16F1 que se pensava não expressarem o recetor Y1, não era esperado ver captação significativa na membrana. Contudo, estudos recentes demonstram uma expressão significativa do NPY no melanoma.⁹⁸ Neste contexto, deverá ser avaliada a expressão do recetor Y1 nas células B16F1 por ensaios *Western Blot*. Os valores de internalização e captação na membrana celular mais expressivos nas células B16F1 podem ser justificados por uma taxa de crescimento superior comparativamente às células MCF-7.

Nos estudos de internalização celular dos radiopéptidos análogos do NPY têm sido utilizadas essencialmente células MCF-7. No entanto, seria pertinente efetuar também os ensaios em células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S (linhas metastáticas), dado que se confirmou a elevada expressão do recetor Y1 nestas linhas celulares (superior relativamente às células MCF-7).⁹⁹

Em estudos recentes, verificou-se que um ligando análogo do NPY marcado com ^{18}F apresentava afinidade de ligação para o RY1 em células MCF-7 ($K_i = 31 \pm 18\text{nM}$). No entanto, a captação tumoral *in vivo* e a intensidade de captação nos estudos PET mostraram-se reduzidas.⁹⁴ Neste contexto, torna-se pertinente o desenvolvimento de estudos de biodistribuição em modelos animais com tumores induzidos que sobreexpressem o recetor Y1.

2.4.2 Estudos de biodistribuição e estabilidade *in vivo*/metabolização

A avaliação do comportamento biológico de complexos radioativos em modelos animais é importante, pois permite estudar a selectividade e especificidade dos complexos para determinados órgãos ou tecidos, possibilitando ainda a avaliação da velocidade de distribuição e eliminação. Através destes estudos é também possível avaliar a estabilidade dos complexos radioativos *in vivo*. Em particular, permitem determinar a taxa de depuração sanguínea e identificar as vias de excreção envolvidas na eliminação do composto, parâmetros que são

muito importantes na investigação e desenvolvimento de radiofármacos. A taxa de depuração sanguínea deve ser rápida o suficiente para evitar irradiação excessiva dos órgãos não-alvo, mas assegurando que o complexo esteja em circulação o tempo necessário para que atinja o alvo. Em relação às vias de excreção, a eliminação renal é vantajosa na medida em que geralmente é mais rápida e contribui para melhorar a razão alvo/fundo na região abdominal.

Assim, nos estudos biológicos realizados em animais foram analisados dois parâmetros gerais, a biodistribuição e a eliminação, de forma a avaliar a farmacocinética e estabilidade *in vivo*. Os objetivos consistiram em quantificar a depuração sanguínea e muscular dos complexos radioativos, a velocidade de excreção total, a(s) via(s) de eliminação e analisar a possível fixação seletiva em determinado órgão ou tecido.

As vias de excreção urinária e hepatobiliar foram estudadas, medindo a atividade existente nos órgãos excretores correspondentes e, relacionadas com a determinação dos valores de lipofilia.

Os estudos de biodistribuição envolveram a injeção intravenosa de 100µL (0,3 MBq) dos complexos radioativos ⁶⁷GaL1- ⁶⁷GaL3, através da veia da cauda, em murganhos fêmea CD-1 normais (35-40g). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a dois tempos diferentes – 60 e 120 minutos pós-injeção (p.i.) para o ⁶⁷GaL1 e 30 e 60 minutos para os complexos ⁶⁷GaL2 e ⁶⁷GaL3 p.i. – e os órgãos removidos, pesados e a sua atividade medida.

A excreção foi assumida como a diferença entre a atividade administrada e a atividade medida imediatamente após o sacrifício. A atividade total no sangue, osso e músculo foi calculada considerando que estes órgãos correspondem a 6, 10 e 40% do peso total do animal, respetivamente. Amostras de sangue e urina foram recolhidas nos tempos de sacrifício para avaliação da estabilidade *in vivo*.

Os resultados de biodistribuição foram expressos em percentagem de atividade injetada por órgão total (% A.I./órgão) e também por grama de órgão (% A.I./g órgão). A fixação dos complexos nos órgãos/tecidos mais relevantes foi ainda representada graficamente.

Biodistribuição e estabilidade *in vivo*/ metabolização do complexo ⁶⁷GaL1

Na tabela 2.6 estão registados os resultados de biodistribuição expressos em percentagem de dose injetada por grama de órgão (% A.I./ g órgão) para o complexo ⁶⁷GaL1 **purificado**, onde se verifica que a taxa de depuração sanguínea é elevada (% A.I./g órgão no sangue de 0,18%±0,006% aos 60 minutos e 0,09%±0,04% aos 120 minutos), o que indica que a distribuição para os tecidos é rápida e a ligação às proteínas plasmáticas deve ser baixa, o que se correlaciona bem com os resultados encontrados nos ensaios *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas. A *clearance* muscular aos 60 minutos é muito acentuada (% A.I./ g órgão no músculo de 0,04%±0,01% no primeiro tempo em estudo e 0,03%±0,01% no tempo mais tardio). Da análise dos órgãos adjacentes ao órgão-alvo, coração e pulmão, denota-se uma baixa fixação e ambos sofrem *clearance* até aos 120 minutos, o que contribui para melhorar a razão alvo/fundo na região mamária.

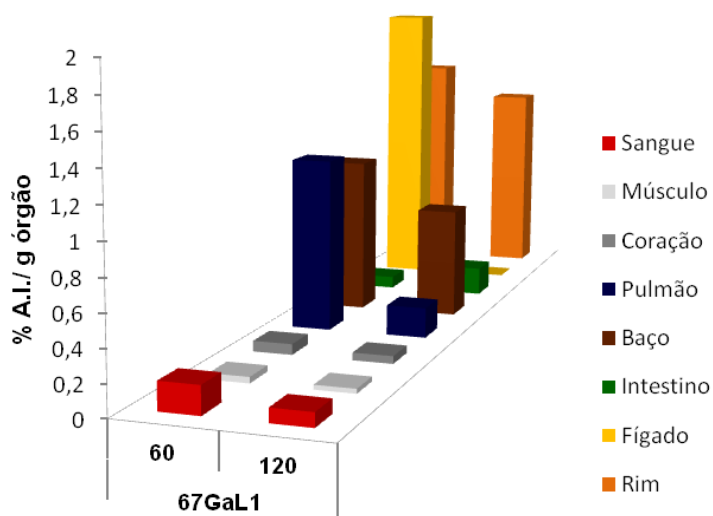
A excreção total do complexo aos 60 minutos é muito elevada ($88\% \pm 2,2\%$ A.I.) e aos 120 minutos praticamente todo o composto foi eliminado ($91,7\% \pm 0,5\%$ A.I.). A fixação do complexo no fígado e no intestino aos 60 e 120 minutos é reduzida, indicando que a excreção hepatobiliar é mínima. A baixa fixação a nível do baço, fígado e pulmão é baixa, corroborando os resultados obtidos por ITLC-SG que evidenciaram a ausência de colóides na preparação radioativa. A excreção corresponderá maioritariamente a eliminação via urinária. Os valores correlacionam-se com o coeficiente de lipofilia associado ao radiopéptido ($D_{0/w} = -1,86 \pm 0,14$, pH7,4). A excreção por via urinária permite aumentar a qualidade da imagem, nomeadamente na pesquisa de depósitos secundários em órgãos abdominais; minimizar a irradiação nos órgãos não-alvo e diminuir a atividade administrada sem comprometer a retenção a nível do recetor. Uma excreção rápida pela via urinária poderá ser vantajosa se, simultaneamente houver uma elevada captação e retenção do radioligando nas células tumorais (potenciada por elevada afinidade para os recetores Y1). No entanto, uma excreção demasiado rápida pode comprometer a fixação no órgão alvo e poderá dificultar a realização de imagens em tempos tardios. Neste contexto, pode ser pertinente desenvolver alterações estruturais no radiocomplexo de forma a modular o carácter lipofílico com variação do espaçador ou da carga sem comprometer a afinidade para o recetor Y1.

Tabela 2.6 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 60 e 120 minutos do complexo $^{67}\text{GaL1}$ após purificação.

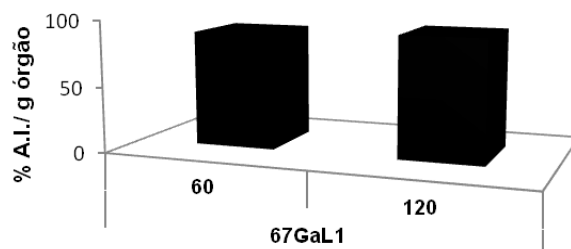
Órgão	$^{67}\text{GaL1}$	
	60 min	120 min
Sangue	0,18±0,006	0,09±0,04
Fígado	2,00±0,60	2,02±0,82
Intestino	0,08±0,004	0,19±0,10
Baço	1,04±0,52	0,73±0,39
Coração	0,07±0,01	0,05±0,01
Pulmão	1,15±0,44	0,20±0,02
Rim	1,55±0,03	1,33±0,13
Músculo	0,04±0,01	0,03±0,01
Excreção Total (% A.I.)	88,0±2,2	91,7±0,5

Para facilitar a visualização do perfil farmacocinético do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado é mostrado um histograma (figura 2.26A) com os resultados de biodistribuição nos órgãos/tecidos mais relevantes e respetivas vias de eliminação (figura 2.26B), em percentagem

da dose injetada por grama de órgão (%A.I./g órgão) e percentagem de dose injetada (%A.I.), respetivamente.



(a)



(b)

Figura 2.26 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 60 e 120 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo $^{67}\text{GaL1}$ purificado.

Como referido, foram ainda realizados estudos de estabilidade *in vivo* através da análise por HPLC (ver 4.2.6 - método 2) de amostras de sangue e urina, recolhidas dos animais no momento de sacrifício. Antes da análise por HPLC, a urina e o sangue foram convenientemente tratados (método 4.6.2.1.).

O cromatograma de HPLC relativo ao comportamento do radiopéptido em circulação sanguínea (1h p.i.) mostra que o complexo $^{67}\text{GaL1}$ se mantém intacto na circulação sanguínea ($t_r=12,01\text{min}$), indicando que poderá atingir o órgão/tecido alvo na forma química pretendida (figura 2.27). Contudo, o radiocromatograma da análise da urina mostra que o complexo $^{67}\text{GaL1}$ sofre elevada decomposição/metabolização *in vivo*, sendo excretado pela via urinária na forma de um metabolito mais hidrofílico ($t_r=9,12\text{min}$) (figura 2.28).

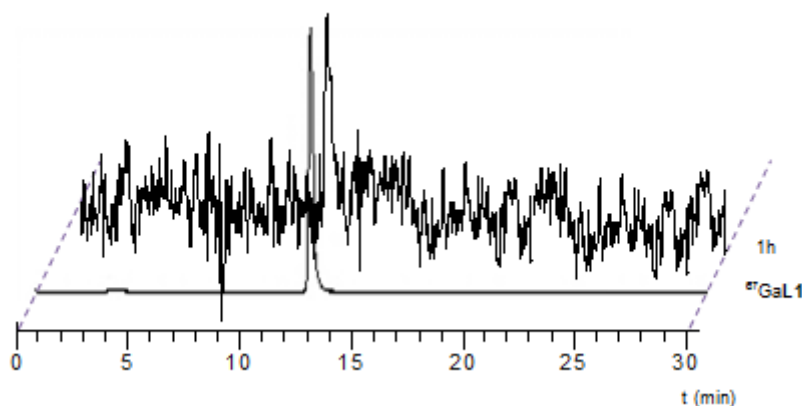


Figura 2.27 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL1}$ **purificado** e do **sangue** de murganhos recolhido aos 60 minutos p.i (deteção γ).

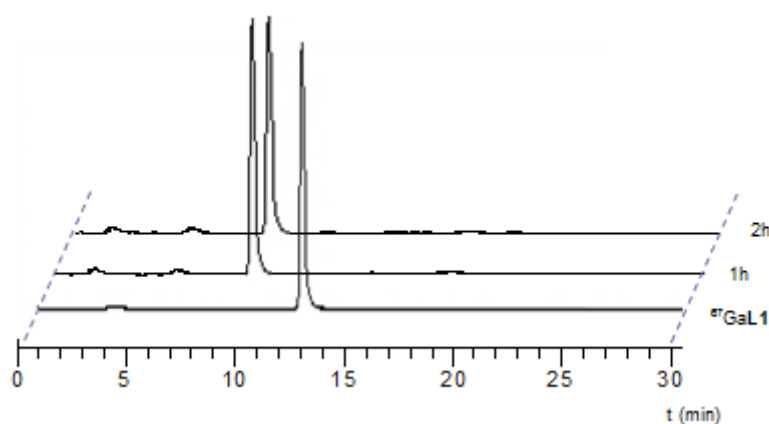


Figura 2.28 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL1}$ **purificado** e da **urina** de murganhos recolhida aos 60 e 120 minutos p.i (deteção γ).

Biodistribuição e estabilidade *in vivo*/ metabolização do complexo $^{67}\text{GaL2}$

O estudo de biodistribuição do radiocomplexo $^{67}\text{GaL2}$ foi efetuado aos 30 e 60 minutos p.i. devido à elevada excreção observada para o complexo $^{67}\text{GaL1}$.

Pela análise da tabela 2.7 relativa ao estudo de biodistribuição do complexo $^{67}\text{GaL2}$ **não purificado**, verifica-se que a taxa de depuração sanguínea é relativamente elevada, observando-se uma atividade em circulação relativamente baixa (% A.I./g órgão no sangue de 2,66% aos 30 minutos e 1,58% aos 60 minutos). Nos estudos de estabilidade *in vitro*, o complexo apresenta uma ligação às proteínas plasmáticas de 49% (1h de incubação a 37°C). A taxa de *clearance* muscular é bastante acentuada com valores de 0,54% A.I./g órgão no primeiro tempo em estudo e 0,20% A.I./g órgão no tempo mais tardio.

A fixação hepática, esplénica e pulmonar aos 30 minutos é elevada, o que pode ser justificado pela possível presença de colóides. A análise por ITLC-SG não revelou a presença de colóides na preparação radioativa, pelo que a formação de colóides poderá ter ocorrido *in vivo*. A *clearance* dos órgãos do sistema reticuloendotelial aos 60 minutos é reduzida. No fígado verifica-se fixação acentuada nos dois tempos em estudo (10,80% A.I./g órgão aos 30 minutos e 10,38% A.I./g órgão aos 60 minutos) com baixa fixação do radiocomplexo ao nível

intestinal (0,16% A.I./g órgão aos 30 minutos e 0,14% A.I./g órgão aos 60 minutos), dando indicação da presença de colóides. Comparativamente ao $^{67}\text{GaL1}$, o complexo $^{67}\text{GaL2}$ apresenta um carácter hidrofílico mais acentuado nos estudos *in vitro*, mas menor taxa de excreção total aos 60 minutos que poderá ser justificada pela fixação do radioconjugado a nível hepático, indicando mais uma vez que poderíamos estar na presença de colóides.

Para avaliar a possível presença de colóides na preparação, procedeu-se ao estudo de biodistribuição do complexo $^{67}\text{GaL2}$ após purificação. Os resultados de biodistribuição para o complexo $^{67}\text{GaL2}$ **purificado** obtidos 60 minutos *p.i.* não são similares aos resultados do composto não purificado como se comprova na tabela 2.7.

No complexo $^{67}\text{GaL2}$ **purificado**, a depuração sanguínea e muscular é superior à registada no radiocomplexo homólogo não purificado (3,62% A.I./g órgão no sangue e 0,66 A.I./g órgão no músculo), mantendo-se uma clearance elevada. Ao nível hepático os valores descritos são consideravelmente inferiores aos registados no complexo não purificado (complexo não purificado de 10,38% A.I./g órgão vs. complexo purificado de 2,66% A.I./g órgão). No baço, fígado e pulmão os valores de fixação do radiocomposto decrescem significativamente, confirmando a formação de espécies coloidais no composto não purificado (figura 2.30).

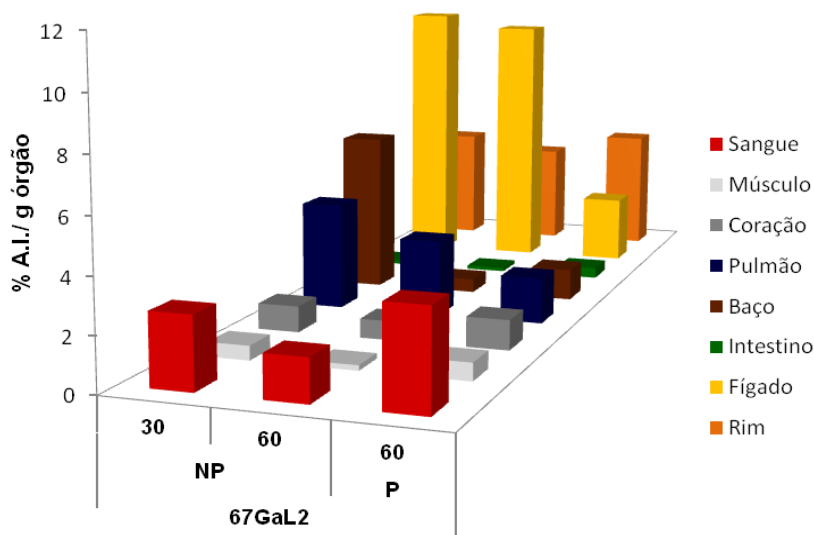
Tabela 2.7 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 30 e 60 minutos do complexo $^{67}\text{GaL2}$ antes e após purificação.

Órgão	$^{67}\text{GaL2}$		
	NP**		P*
	30 min	60 min	60 min
Sangue	2,66±0,84	1,58±0,37	3,62±0,09
Fígado	10,80±3,58	10,38±2,53	2,66±0,00
Intestino	0,16±0,04	0,14±0,05	0,42±0,13
Baço	6,19±0,85	0,53±1,15	1,21±0,36
Coração	0,99±0,42	0,72±0,28	1,13±0,17
Pulmão	4,11±0,89	2,93±1,26	1,76±0,11
Rim	4,66±1,20	4,11±1,02	4,93±0,38
Músculo	0,54±0,44	0,20±0,01	0,66±0,14
Excreção Total (% A.I.)	39,3±12,9	54,8±3,3	43,6±1,6

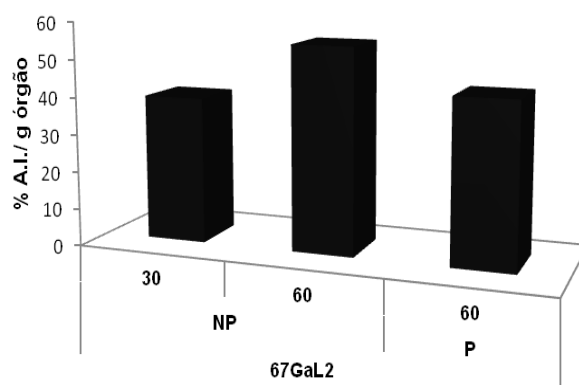
**NP: complexo não purificado

*P: complexo purificado

Para facilitar a visualização das diferenças de perfil farmacocinético do complexo $^{67}\text{GaL2}$ não purificado e purificado é mostrado um histograma (figura 2.29A) com os resultados de biodistribuição nos órgãos/tecidos mais relevantes e respectivas vias de eliminação (figura 2.29B), em percentagem da dose injetada por grama de órgão (%A.I./g órgão) e percentagem de dose injetada (%A.I.), respetivamente.



(a)



(b)

NP: complexo não purificado
P: complexo purificado

Figura 2.29. Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 30 e 60 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo $^{67}\text{GaL2}$ não purificado e purificado.

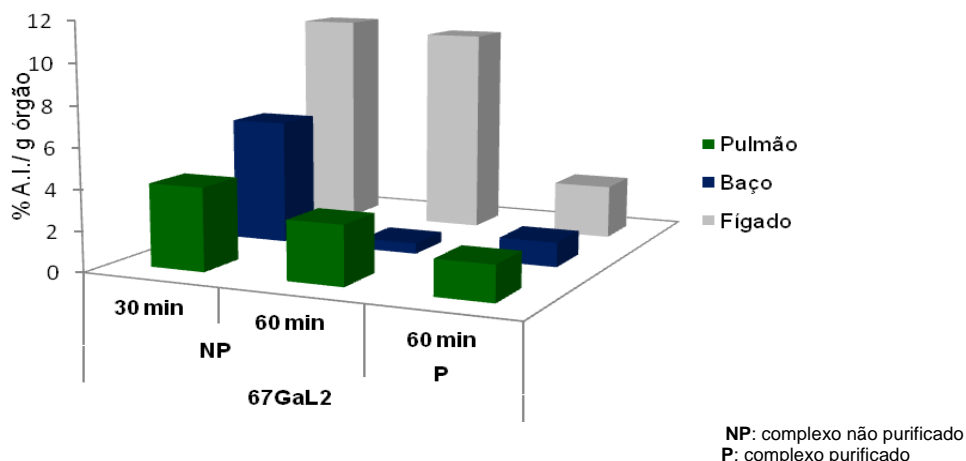


Figura 2.30. Resultados da biodistribuição (% A.I./g órgão) esplênica, hepática e pulmonar aos 30 e 60 minutos para o complexo $^{67}\text{GaL2}$ antes e após purificação.

A acumulação renal do complexo não purificado e purificado aos 60 minutos é similar (complexo não purificado 4,11% média A.I./ g órgão vs. complexo purificado de 4,93% A.I./g órgão), sendo a excreção via urinária a mais significativa, corroborando o valor obtido no coeficiente de lipofília ($D_{O/W} = -2,57 \pm 0,01$, pH7,4) para o complexo.

A excreção total do composto purificado foi de 43,6% A.I., discretamente inferior à observada no composto não purificado para o mesmo tempo de avaliação.

Por análise dos resultados de HPLC (ver 4.2.6 - método 2) para o sangue (figura 2.31), observa-se que aos 30 minutos p.i., o complexo $^{67}\text{GaL2}$ é a espécie maioritária na circulação sanguínea ($t_r = 11,55\text{min}$; 54,42%), coexistindo com uma espécie radioquímica com tempo de retenção similar ao cloreto de gálio ($t_r = 3,33\text{min}$; 40,64%). Aos 60 minutos p.i. verifica-se a diminuição em circulação do complexo intacto (47,06%).

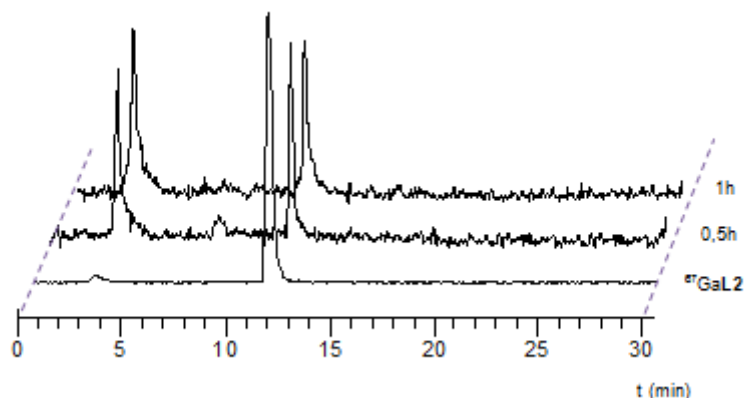


Figura 2.31 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL2}$ purificado e do sangue de murganhos recolhido aos 30 e 60 minutos p.i (detecção γ).

Pela análise dos cromatogramas de HPLC (ver 4.2.6 - método 2) relativos à estabilidade na urina (figura 2.32) para o complexo $^{67}\text{GaL2}$, verifica-se que aos 30 minutos a presença de um radiocomposto com tempo de retenção semelhante ao Cloreto de Gálio ($t_r =$

3,33min; 76,96%), complexo $^{67}\text{GaL2}$ ($t_r=11,46\text{min}$; 1,92%) e outro metabolito mais hidrofílico ($t_r=8,12\text{min}$; 17,67%). Aos 60 minutos, visualiza-se a presença das mesmas espécies radioquímicas. Os resultados indicam que o complexo em estudo sofre metabolização *in vivo* (figura 2.32).

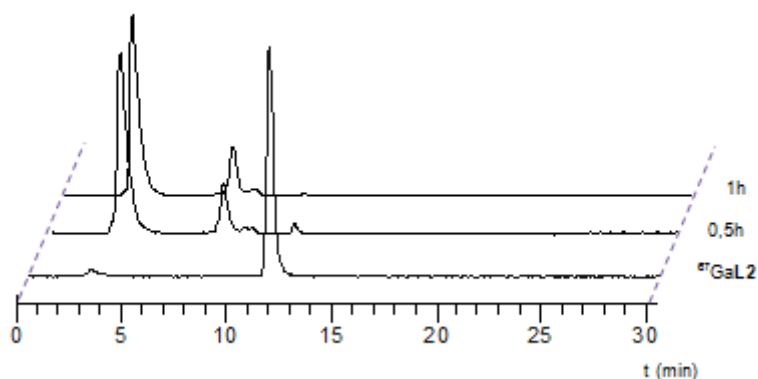


Figura 2.32 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL2}$ purificado e da urina de murganhos recolhida aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).

Biodistribuição e estabilidade *in vivo* metabolização do complexo $^{67}\text{GaL3}$

Como se pode observar pela tabela 2.8, relativa ao estudo de biodistribuição do complexo $^{67}\text{GaL3}$ não purificado, a depuração sanguínea é elevada (1,23% aos 30 minutos e 0,38% aos 60 minutos), tal como a depuração muscular (0,33% aos 30 minutos e 0,10% aos 60 minutos). A fixação do radiocomposto no fígado e no intestino apresenta baixos valores, indicando a baixa excreção pela via hepatobiliar. A captação pulmonar e esplénica é baixa. Destes resultados infere-se a ausência de colóides no composto, confirmando os resultados obtidos por ITLC-SG, ao contrário do que acontecia com o complexo $^{67}\text{GaL2}$.

Da análise dos órgãos adjacentes ao órgão alvo, denota-se uma baixa fixação e ambos sofrem elevada *clearance* até aos 60 minutos, o que contribui para melhorar a razão alvo/fundo na região mamária.

Ao contrário do observado para o complexo $^{67}\text{GaL2}$, os resultados de biodistribuição para o complexo $^{67}\text{GaL3}$ purificado obtidos 60 minutos p.i. são similares aos resultados do composto não purificado como se demonstra na tabela 2.8. A taxa de excreção do complexo purificado aos 60 minutos não é significativamente superior ao composto não purificado para o mesmo tempo de estudo ($^{67}\text{GaL3}$ não purificado=82,2% vs. $^{67}\text{GaL3}$ purificado= 77,9%).

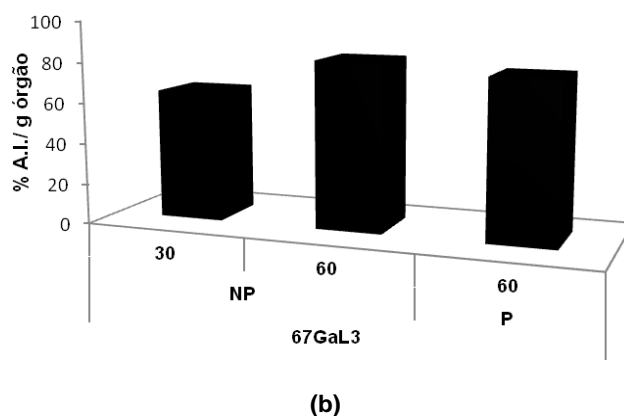
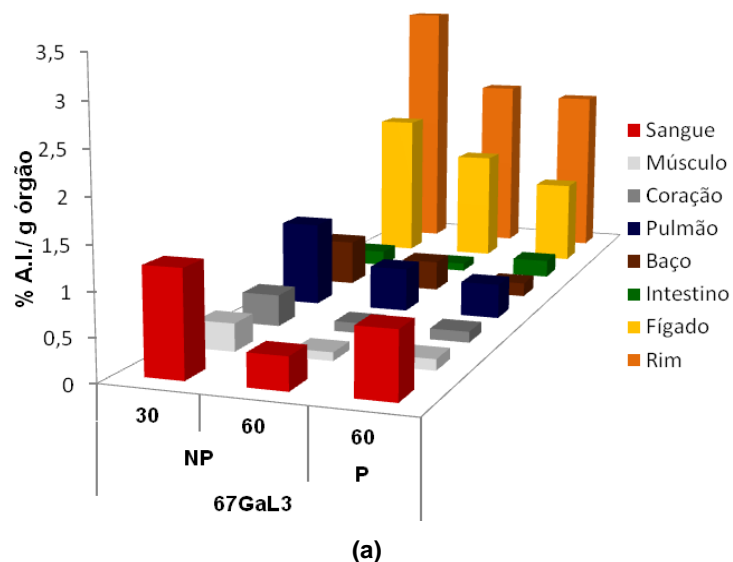
Tabela 2.8 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) e excreção total (% A.I.) aos 30 e 60 minutos do complexo $^{67}\text{GaL3}$ antes e após purificação.

Órgão	$^{67}\text{GaL3}$		
	NP**		P*
	30 min	60 min	60 min
Sangue	1,23±0,04	0,38±0,05	0,77±0,06
Fígado	1,91±0,08	1,43±0,43	1,08±0,03
Intestino	0,19±0,08	0,10±0,03	0,22±0,11
Baço	0,56±0,08	0,37±0,00	0,17±0,05
Coração	0,38±0,02	0,12±0,00	0,13±0,07
Pulmão	1,02±0,13	0,53±0,02	0,42±0,01
Rim	3,44±0,17	2,34±0,28	2,22±0,24
Músculo	0,33±0,00	0,10±0,01	0,13±0,01
Excreção Total (% A.I.)	64,2±5,3	82,2±2,1	77,9±2,3

**NP: complexo não purificado

*P: complexo purificado

Para facilitar a visualização das diferenças de perfil farmacocinético do complexo $^{67}\text{GaL3}$ não purificado e purificado é mostrado um histograma (figura 2.33) com os resultados de biodistribuição nos órgãos/tecidos mais relevantes e respetivas vias de eliminação, em percentagem da atividade injetada por grama de órgão (%A.I./g órgão) e percentagem de atividade injetada (%A.I.), respetivamente.



NP: complexo não purificado
P: complexo purificado

Figura 2.33 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 30 e 60 minutos para os principais órgãos/tecidos do complexo $^{67}\text{GaL3}$ não purificado e purificado.

Pela análise dos cromatogramas de HPLC relativos à estabilidade *in vivo* no sangue, observa-se aos 30 minutos majoritariamente a presença de composto radiomarcado ($t_r=11,73\text{min}$; 89,51%). No entanto, aos 60 minutos visualiza-se a presença de uma espécie radioquímica com tempo de retenção idêntico ao $^{67}\text{GaCl}_3$ ($t_r= 3,14\text{min}$; 19,96%), complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=11,69\text{min}$; 75,21%) e outro metabolito mais hidrofílico ($t_r=9,05\text{ min}$; 15,74%) (figura 2.34).

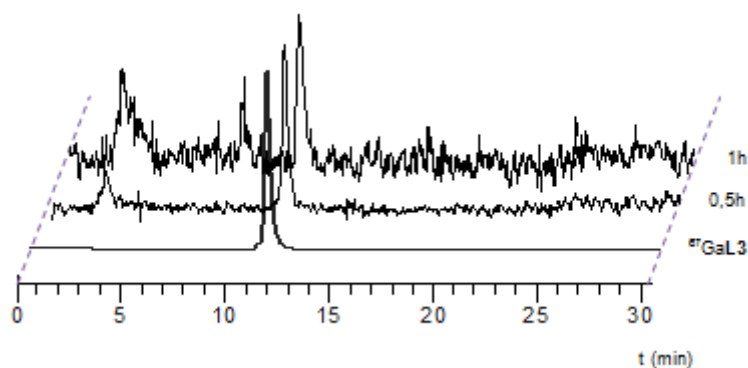


Figura 2.34 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ **purificado** e do **sangue** de murganhos recolhido aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).

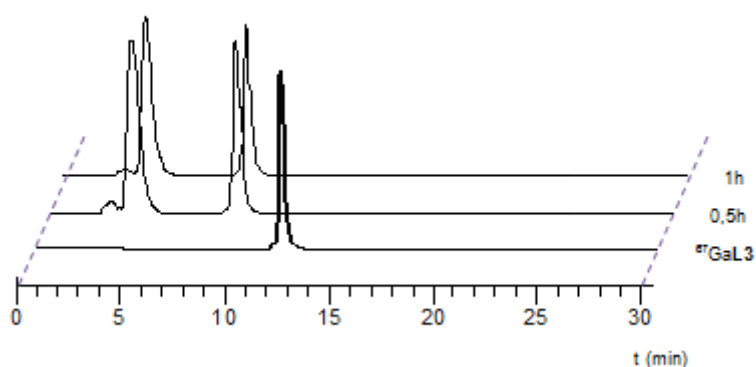


Figura 2.35 Cromatogramas de HPLC do complexo $^{67}\text{GaL3}$ **purificado** e da **urina** de murganhos recolhida aos 30 e 60 minutos p.i. (deteção γ).

Pela análise dos cromatogramas de HPLC relativos à estabilidade na urina (figura 2.35), verifica-se aos 30 minutos a presença na urina de uma espécie radioquímica com tempo de retenção de 3,19 minutos (3,3%), semelhante ao $^{67}\text{GaCl}_3$, e duas espécies radioquímicas não identificadas, mais hidrofílicas que o complexo $^{67}\text{GaL3}$ ($t_r=4,16$ e $9,04$ minutos, respetivamente).

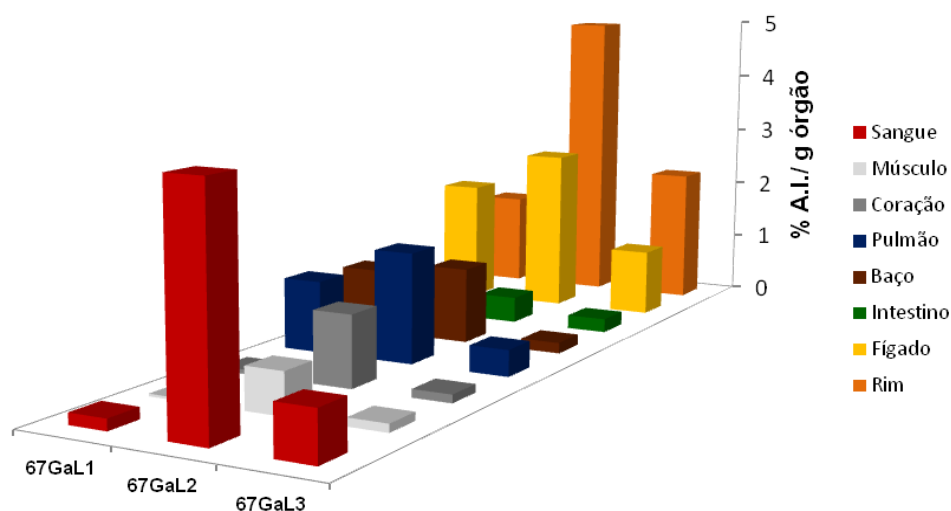
Conclusões

Nos radioconjugados em estudo não foi encontrada nenhuma fixação preferencial em nenhum órgão ou tecido, exceto nos órgãos relacionados com as vias de excreção. Na comparação da percentagem de excreção total entre os complexos de ^{67}Ga em estudo, confirma-se que a eliminação dos complexos ocorre maioritariamente pela via urinária. Contudo, os complexos mais hidrofílicos são os que apresentam uma excreção mais baixa, parecendo não se correlacionar com o coeficiente de lipofília obtido para os compostos (tabela 2.9). O $^{67}\text{GaL1}$ é o complexo que apresenta maior taxa de excreção aos 60 minutos p.i. (88,0%) e o $^{67}\text{GaL2}$, o complexo mais hidrofílico, é o que apresenta uma excreção inferior (43,6%). A diferença nos estudos de biodistribuição entre os complexos pode dever-se à diferença entre os espaçadores utilizados que permitem a modulação da farmacocinética e eventual alteração da respetiva carga dos complexos.

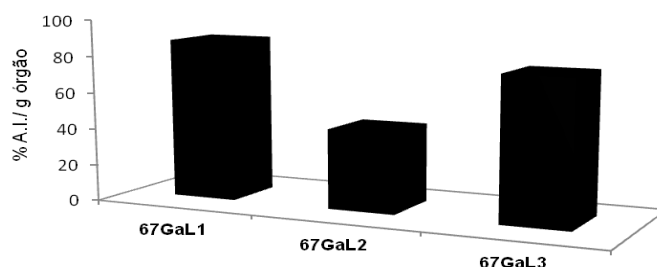
Tabela 2.9 Valores de $D_{o/w}$ (pH7,4) e excreção total (%A.I.) aos 60 minutos determinados para os complexos de ^{67}Ga purificados.

Complexo	Log $D_{o/w} \pm DP$ (pH=7,4)	Excreção Total (%A.I.)
$^{67}\text{GaL1}$	$-1,86 \pm 0,14$	$88,0 \pm 2,2$
$^{67}\text{GaL2}$	$-2,57 \pm 0,01$	$43,6 \pm 1,6$
$^{67}\text{GaL3}$	$-2,34 \pm 0,01$	$77,9 \pm 2,3$

Para facilitar a visualização das diferenças do perfil farmacocinético entre os complexos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) aos 60 minutos após purificação é mostrado um histograma (figura 2.36) com os resultados de biodistribuição nos órgãos/tecidos mais relevantes e respectivas vias de eliminação, em percentagem da atividade injetada por grama de órgão (%A.I./g órgão) e percentagem de atividade injetada (%A.I.), respetivamente.



(a)



(b)

Figura 2.36 Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) (a) e excreção total (% A.I.) (b) aos 60 minutos para os principais órgãos/tecidos dos complexos $^{67}\text{GaL1}$, $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL3}$ após purificação.

Pela análise dos cromatogramas de HPLC relativos à estabilidade dos complexos no sangue, conclui-se que os radioconjugados permanecem em circulação sanguínea, o que indica que o complexo pode atingir o alvo. Contudo, a presença de metabolitos na urina indica que todos os complexos sofrem metabolização *in vivo*. O $^{67}\text{GaL3}$ apresenta menor grau de metabolização ou degradação comparativamente ao $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL2}$. Os resultados indicam que o complexo $^{67}\text{GaL3}$ apresenta uma maior estabilidade *in vivo*.

Capítulo 3

Conclusões e Perspetivas

3. Conclusão e Perspetivas

O cancro de mama continua a ser a principal causa de morte prematura na mulher nos países desenvolvidos, apesar de nos últimos anos se observar um decréscimo na taxa de mortalidade. O diagnóstico precoce eficaz é fundamental para melhorar a taxa de sobrevivência, sendo necessário melhorar as técnicas de imagem existentes.

Recentemente, demonstrou-se que os recetores do Neuropeptido Y se apresentam sobreexpressos numa grande variedade de tumores, mediando processos de proliferação tumoral, angiogénese e metastização, tornando-os alvos promissores tanto para imagem como terapia. Os recetores Y2 expressam-se no tecido mamário normal e os recetores Y1 no tecido mamário neoplásico. O conhecimento da elevada incidência e densidade na expressão do recetor Y1 no cancro de mama conduziu ao desenvolvimento de análogos do NPY dirigidos a estes recetores quer para uso diagnóstico quer terapêutico. Em estudos recentes foi descrita a primeira sequência agonista do análogo do NPY [Pro30-Nle31-Bpa32-Leu34]NPY(28-36) com elevada especificidade e uma afinidade na ordem dos nanomolar para os recetores Y1. A marcação destes análogos com radionuclídeos adequados, sem perda da sua atividade biológica, permitiria desenvolver potenciais sondas radioativas para a deteção precoce do cancro de mama através da visualização dos recetores Y1 *in vivo*.

Com o objetivo de desenvolver potenciais agentes de imagem dirigidos ao Y1 foi sintetizado um análogo do NPY, que se sabia possuir elevada afinidade e seletividade para o Y1 e, foi conjugado através de diferentes espaçadores, ao ligando bifuncional DOTA para posterior marcação com $^{67/68}\text{Ga}$. Estes conjugados peptídicos foram utilizados para sintetizar os complexos de Gálio inativos (GaL1 - GaL3) que foram caracterizados por ESI-MS e HPLC.

Os complexos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) foram obtidos fazendo reagir os conjugados peptídicos (L1 - L3) com $^{67}\text{GaCl}_3$ em solução aquosa de tampão acetato de sódio. Após otimização das condições reacionais (concentração de ligando, pH, temperatura e tempo de reação) todos os complexos de ^{67}Ga foram obtidos com elevado rendimento e elevada pureza radioquímica, após purificação por extração em fase sólida em *Sep-Pak C18*. Estes complexos de ^{67}Ga foram identificados por HPLC de fase reversa, comparando os seus tempos de retenção com os respetivos tempos de retenção dos complexos de Gálio inativos. Os radiocomplexos de ^{67}Ga foram detetados através da emissão de radiação γ , enquanto a deteção dos complexos inativos de Gálio foi efetuada por ultravioleta-visível a 256 nm.

A avaliação *in vitro* dos complexos de ^{67}Ga ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) mostrou que os radiopéptidos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ são estáveis à temperatura ambiente e em condições fisiológicas (PBS pH = 7,4; temperatura de 37°C). No entanto, o complexo $^{67}\text{GaL2}$ apesar de ser estável à temperatura ambiente e em soro fisiológico a 37°C é instável em PBS (pH = 7,4 a

37°C). Todos os radiopéptidos, $^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$, apresentaram elevada estabilidade na presença de apotransferrina e de DTPA.

A capacidade de internalização celular dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ foi avaliada em linhas celulares de adenocarcinoma da mama humano que expressam o recetor Y1 (MCF-7). Entre os complexos estudados, o $^{67}\text{GaL3}$ apresentou uma boa captação na membrana celular.

Os complexos de ^{67}Ga apresentam um carácter hidrofílico muito acentuado, sendo $^{67}\text{GaL2}$ o mais hidrofílico ($-2,57 \pm 0,01$) e $^{67}\text{GaL1}$ o que apresenta o carácter hidrofílico menos acentuado ($-1,86 \pm 0,14$).

Estudos de biodistribuição em ratinhos fêmea CD-1 saudáveis, revelaram que os radioconjugados em estudo ($^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$) não apresentam fixação preferencial em nenhum órgão ou tecido, exceto nos órgãos relacionados com as vias de excreção. Todos eles são rapidamente excretados, em especial o $^{67}\text{GaL1}$ que aos 120 minutos p.i. já foi praticamente eliminado ($91,7\% \pm 0,5\%$ A.I.). A excreção total ocorre maioritariamente pela via urinária. Contudo, ao contrário do esperado, os complexos mais hidrofílicos são os que apresentam uma excreção mais baixa. De facto, o radiopéptido $^{67}\text{GaL2}$ é o complexo mais hidrofílico e é o que apresenta uma excreção inferior ($43,6\%$ A.I. aos 60 minutos p.i.).

Em estudos futuros é fundamental determinar a afinidade e seletividade dos diferentes conjugados peptídicos (**L1** - **L3**) e dos respetivos complexos inativos de Gálio (**GaL1** - **GaL3**) para o recetor Y1. Dependendo dos resultados obtidos poderá ser necessário realizar estudos de investigação que permitam avaliar eventuais propriedades antagonistas dos compostos em estudo.

Os estudos de biodistribuição foram realizados em animais saudáveis não permitindo avaliar se os radiopéptidos marcados com ^{67}Ga se fixam nas células tumorais *in vivo*. Assim, no futuro, seria importante avaliar estes radioligandos em modelos animais com tumores induzidos que expressem os recetores Y1 para avaliar a capacidade de captação tumoral *in vivo*. Dependendo dos resultados obtidos poderá ser importante introduzir modificações estruturais nos conjugados peptídicos e respetivos complexos metálicos de modo a obter sondas radioativas que permitam a visualização de tumores que expressam recetores Y1.

Em conclusão, radioligandos com afinidade para o recetor Y1 são compostos promissores para imagiologia molecular do cancro de mama, constituindo uma área de investigação clínica importante.

Capítulo 4

Procedimiento Experimental

4. Procedimento Experimental

4.1. Solventes e reagentes

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, exceto quando expressamente indicado o contrário.

Os compostos sensíveis ao ar ou à humidade foram manuseados em atmosfera de N₂, recorrendo a técnicas de linha de vácuo/azoto e de técnicas de *Schlenk* e utilizando solventes secos e destilados.

Para além dos solventes e reagentes que foram utilizados nas reações após purificação, foram também utilizados nas reações de radiosíntese reagentes que foram adquiridos comercialmente e não foram submetidos a nenhuma purificação prévia.

O análogo NPY1 [Pro³⁰-Nle³¹-Bpa³²-Leu³⁴]NPY(28-36), o ligando bifuncional DOTA e os espaçadores introduzidos foram sintetizados no GCR - IST/CTN de acordo com os métodos descritos na literatura.

Todos os procedimentos de radiosíntese foram desenvolvidos em material plástico com o objetivo de diminuir a adsorção do péptido.

4.2. Técnicas de caracterização e purificação dos complexos [⁶⁷GaL]

4.2.1. Condições de manipulação de compostos radioativos

As manipulações de compostos radioativos foram efetuadas de acordo com as regras de proteção e segurança radiológica, na presença de monitores de radiação e em laboratórios com sistemas de ventilação apropriada e com pressão negativa relativamente ao exterior. Todos os frascos contendo soluções radioativas foram mantidos dentro de contentores de chumbo de espessura adequada, tendo em consideração a sua atividade. Os restantes princípios fundamentais descritos no princípio ALARP (*As Low As Reasonably Practicable*) foram cumpridos.

A dose de radiação absorvida no decorrer da experimentação foi medida periodicamente por leitura de dosímetros individuais de corpo inteiro e extremidades.

4.2.2. Medição da atividade das soluções radioativas

A atividade das soluções de ⁶⁷Ga foi medida numa câmara de ionização (*Aloka, Curiemeter IGC-3*, Tóquio, Japão). As amostras com menor atividade foram medidas num contador gama (Berthold, LB2111, Alemanha).

4.2.3. Medição de pH

O pH das soluções tampão foi medido recorrendo a um micro-eléctrodo 200mm U402-M3-S7/200. O eléctrodo foi calibrado na escala de pH utilizando soluções tampão padrão.

4.2.4. Espectrofotometria UV-Vis

Para determinação da concentração de ligando (M) usada na radiosíntese dos complexos de ⁶⁷Ga recorreu-se a Espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 280\text{nm}$).

Para cálculo da massa (mg) de péptido/ ml considerou-se que:

$$\text{Mg péptido/ml} = \frac{\text{FD} \times \text{Abs} \times \text{MM}}{8026,67} \quad (\text{Equação 1})$$

em que,

FD – Fator de Diluição 50 [490 μL de H₂O (pH7) + 10 μL de péptido];

Abs – Absortividade Molar;

MM – Massa Molar (g/mol): MM_{L1}=1680,95; MM_{L2}=1809, 12 e MM_{L3}=1851,16.

4.2.5. Cromatografia instantânea de camada fina - sílica gel (ITLC-SG)

A ITLC-SG foi utilizada para seguir a cinética e a eficiência das reações de síntese dos complexos radioativos. No procedimento recorreu-se a tiras de sílica-gel (100x10mm) (*Polygram, Macherey-Nagel*). Os sistemas cromatográficos utilizados foram NaCl 0,9%/ HCL 0,1M (25:0,5ml) para avaliação da eficiência de marcação e MeOH/HCl 6M para analisar a presença de colóides.

A distribuição da radioatividade nas tiras foi analisada utilizando um detetor *Berthold LB 505* acoplado a um radiocromatógrafo. Os parâmetros de análise selecionados foram a velocidade de 1200mm/h às escalas de 100k e 300k.

4.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A HPLC foi usada para efeitos de purificação e controlo analítico dos análogos do NPY1, complexos inativos e respetivos complexos de ⁶⁷Ga e, ainda na análise das estabilidades *in vitro* e ensaios de estabilidade *in vivo* através da análise da urina e sangue dos murganhos CD-1.

A análise dos compostos descritos foi efetuada num sistema de HPLC constituído por uma bomba *Perkin-Elmer LC 200*, um detetor UV-Vis *Shimadzu SPD-10 AV* e um detetor de radiação *Berthold LB-507A* ligados em série. Os solventes utilizados eram de qualidade HPLC. A água utilizada para preparação dos solventes aquosos foi bidestilada em aparelho de quartzo *Fistreen Cyclon*. Os solventes e a água foram filtrados por filtros *Milipore* de 0,22 μm e desaerificados com Hélio. As condições experimentais foram selecionadas de acordo com as características dos compostos a analisar e/ou purificar e serão referidas particularmente para cada elemento. Os perfis cromatográficos UV-Vis e radioativo foram obtidos por deteção da sua absorvância a 256nm ou por deteção da radiação gama, respetivamente.

As condições cromatográficas usadas na análise dos complexos de Ga e ⁶⁷Ga descritos no capítulo 2 são:

Coluna: EC-Nucleosil 100 C18 (10 μm , 250mm x 4mm) (*Macherey-Nagel*, Alemanha)

Fluxo: 1mL/min

Eluentes: (A) Solução aquosa de TFA 0,1%; (B) CH₃CN/TFA 0,1%

Para comparação entre os complexos de Ga e ⁶⁷Ga utilizou-se a sequência de eluição do **método 1**. Os gradientes utilizados foram os descritos abaixo:

Tabela 4.1 Sequência de eluição e respetivos gradientes no método 1.

Passo	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B	Curva
0	5	90	10	0,0
1	2	90	10	0,0
2	30	40	60	1,0
3	0,1	0	100	1,0
4	10	0	100	0,0

Os cromatogramas dos compostos não radioativos foram obtidos monitorizando a absorção de UV a $\lambda = 256\text{nm}$.

Na análise dos complexos de ⁶⁷Ga e estudos de estabilidade *in vitro* e *in vivo* utilizou-se a sequência de eluição do **método 2**. Os gradientes utilizados foram os descritos abaixo:

Tabela 4.2 Sequência de eluição e respetivos gradientes no método 2.

Passo	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B	Curva
0	5	90	10	0,0
1	2	90	10	1,0
2	em 15	90/10	0/100	1,0
3	3	0	100	1,0
4	em 1	0/100	90/10	2,0
5	4	90	10	2,0

4.2.7. Purificação em coluna *Sep-Pak C18*

A purificação dos complexos de ⁶⁷Ga foi realizada em coluna *Sep-Pak* de fase reversa C18 (*Sep-Pak*, *Waters*, Irlanda). De acordo com o protocolo do fabricante, o pré-condicionamento da coluna foi efetuado com 10 mL de MeOH e 10 mL de H₂O. A eluição foi feita utilizando um gradiente H₂O:TFA 0,1%/CH₃CN, iniciado com H₂O para remoção do excesso de [⁶⁷GaCl₃] e seguido de TFA 0,1%/CH₃CN para recolha dos complexos de ⁶⁷Ga.

A medição de radioatividade correspondente à fase aquosa, ao complexo de ⁶⁷Ga e à presença de colóides na preparação radioativa foi realizada em câmara de ionização (*Aloka*, *Curiometer IGC-3*, Tóquio, Japão).

4.3. Radiosíntese de [$^{67}\text{GaCl}_3$]

O [$^{67}\text{GaCl}_3$] foi obtido por conversão de Citrato- ^{67}Ga], comercialmente disponível (*Mallinckrodt Medical B.V*, Holanda), utilizando um procedimento descrito na literatura, no qual foram introduzidas ligeiras modificações.⁹⁵ Esta metodologia envolve extração em fase sólida utilizando *cartridges* de sílica gel (*Sep-Pak SI, Waters*, Irlanda) segundo o seguinte procedimento:

(1) A solução aquosa de Citrato de Gálio- ^{67}Ga] foi diluída com água destilada ($V=3-5\text{ mL}$) e foi aplicada na *cartridge* de sílica gel com uma seringa de 5mL. Em seguida, a *cartridge* foi eluída, gota a gota, com 10mL de água destilada para remover os iões citrato ficando os iões $^{67}\text{Ga}^{3+}$ retidos na coluna. Foi medida a atividade recolhida na água.

(2) Os iões $^{67}\text{Ga}^{3+}$ retidos na coluna foram eluídos com 3mL de uma solução aquosa de HCl (0,1M) e recolhidos em frações de 0,5mL. A radioatividade de cada uma das frações e a atividade retida na *cartridge* foram medidas e foi calculada a percentagem de radioatividade recuperada. As frações com maior atividade foram analisadas e avaliada a pureza radioquímica do [$^{67}\text{GaCl}_3$] obtido através de cromatografia planar (ITLC-SG) e HPLC. O [$^{67}\text{GaCl}_3$] foi sempre obtido com uma pureza radioquímica superior a 95 %.

4.4. Radiosíntese e caracterização dos complexos [^{67}GaL]

No GCR – IST/CTN foram previamente sintetizados conjugados do análogo do NPY com a sequência [Pro30-Nle31-Bpa32-Leu34]NPY(28-36) ao agente quelante DOTA através de diferentes espaçadores. A reconstituição dos ligandos foi realizada com ACN 0,4M para diminuir processos de adsorção.

As condições de marcação foram otimizadas com variação da concentração de ligando, pH, temperatura e tempo de reação.

4.4.1. Radiosíntese do complexo [GaDOTA]-NPY1 ($^{67}\text{GaL1}$)

O complexo $^{67}\text{GaL1}$ foi preparado dissolvendo o DOTA-NPY1 (concentração final de $8 \times 10^{-5}\text{ M}$) em tampão de acetato de sódio 0,4 M (pH=5). Após adição de [$^{67}\text{GaCl}_3$] em 0,1M de HCl (250 μL), a solução foi incubada a 95°C durante 30 minutos até se obter o complexo final [$^{67}\text{GaL1}$] ($t_r=12,01\text{min}$). O pH final de marcação foi de 5.

O controlo de qualidade do complexo (determinação do rendimento e pureza radioquímica) foi realizado por ITLC-SG (ver 4.2.5.) e HPLC (ver 4.2.6. – método 2).

4.4.2. Radiosíntese do complexo [Lys(DOTA)]-NPY1 ($^{67}\text{GaL2}$)

O complexo $^{67}\text{GaL2}$ foi sintetizado por reação direta do [Lys(DOTA)]-NPY1 (concentração final de $1 \times 10^{-4}\text{ M}$) com o [$^{67}\text{GaCl}_3$] em 0,1M de HCl (250 μL) numa solução tampão de acetato de sódio 0,4M a pH=5,5. A solução foi incubada a 95°C durante 20 minutos até se obter o complexo final [$^{67}\text{GaL2}$] ($t_r=11,46\text{min}$). O pH final da marcação foi de 5.

O controlo de qualidade do complexo (determinação do rendimento e pureza radioquímica) foi realizado em condições semelhantes ao complexo [$^{67}\text{GaL1}$].

4.4.3. Radiosíntese do complexo Ac-[Lys(DOTA)]-NPY1 ($^{67}\text{GaL3}$)

O complexo $^{67}\text{GaL3}$ foi preparado por dissolução do Ac-[Lys(DOTA)]-NPY1 (concentração final de 8×10^{-5} M) em tampão de acetato de sódio 0,4M (pH=4,9). Após adição de [$^{67}\text{GaCl}_3$] em 0,1M de HCl (250 μL), a solução foi incubada a 95°C durante 20 minutos até se obter o complexo final [$^{67}\text{GaL3}$] (tr=12,12min). O pH final de marcação foi de 4,5.

O controlo de qualidade do complexo (determinação do rendimento e pureza radioquímica) foi realizado em condições semelhantes ao complexo [$^{67}\text{GaL1}$].

Na Tabela 4.3 indicam-se as condições experimentais otimizadas na radiosíntese dos complexos de ^{67}Ga : concentração de ligando (M), tempo de reação (min), temperatura (°C), pH final e tempos de retenção (t_r , min).

Tabela 4.3 Condições experimentais usadas na preparação dos complexos de ^{67}Ga .

Complexo	Concentração de ligando (M)	Tempo de reação (min)	Temperatura (°C)	pH _{final}	t_r (min)
$^{67}\text{GaL1}$	8×10^{-5}	30	95	5	12,01
$^{67}\text{GaL2}$	1×10^{-4}	20	95	5	11,46
$^{67}\text{GaL3}$	8×10^{-5}	20	95	4,5	12,12

Após otimização das condições de marcação todos os radiopéptidos foram submetidos a processos de purificação por *Sep-Pak C18* usando TFA 0,1%/CH₃CN como eluente (ver 4.2.7), neutralização com NaOH (0,1M) e evaporação do solvente, não sofrendo qualquer degradação. O controlo de qualidade foi realizado por ITLC-SG (ver 4.2.5.) e HPLC (ver 4.2.6. – método 2). Os radioconjugados foram obtidos com purezas radioquímicas acima dos 95%.

4.5. Estudos de estabilidade *in vitro*

Os estudos de estabilidade *in vitro* dos complexos de ^{67}Ga incluíram ensaios de estabilidade à temperatura ambiente e em condições fisiológicas (tampão fosfato salino PBS 0,1M, pH 7,4 a 37°C ou NaCl0,9% a 37°C). Além disso, foram desenvolvidos estudos de competição com o DTPA e com a apotransferrina e determinação da ligação às proteínas plasmáticas.

4.5.1. Estabilidade à temperatura ambiente

Alíquotas das soluções contendo os complexos de ^{67}Ga , mantidas à temperatura ambiente, foram analisadas por ITLS-SG (ver 2.4.5) e HPLC (ver 4.2.6 - método 2) em diferentes tempos (t=12h, 24h e 48h).

4.5.2. Estabilidade em tampão fosfato salino PBS 0,1M (pH 7,4) a 37°C e/ou NaCl0,9% a 37°C

A determinação da estabilidade em condições fisiológicas dos complexos ^{67}Ga foi obtida com a adição de uma alíquota de 30 μl (0,4MBq) em 50 μl PBS 0,1M (pH 7,4) com incubação em banho de água termostaticado a 37°C nos tempos 12h, 24h e 48h. A estabilidade do complexo $^{67}\text{GaL2}$ foi ainda analisada em NaCl0,9% a 37°C para os mesmos tempos de estudo. A análise das amostras foi efetuada por ITLC-SG (ver 4.2.5) e HPLC (ver 4.2.6 - método 2).

4.5.3 Estabilidade na presença de DTPA e apotransferrina

De modo a prever a influência de eventuais competidores biológicos na estabilidade *in vivo* dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$ face a processos de transquelatação foram desenvolvidos estudos de competição com o DTPA e a apotransferrina, de acordo com protocolos experimentais descritos na literatura.

4.5.3.1 Estudo de competição com DTPA

O estudo de transquelatação com DTPA foi realizado com 500 μL de uma solução de tampão acetato de sódio 0,4 M (pH=5), contendo em excesso 10^3M de DTPA (MM=497,36 g/mol) e com posterior adição de 50 μL de complexo radioativo.¹⁰⁰ As amostras foram incubadas a 37°C e analisadas por HPLC (método 4.2.6. – método 2) a diferentes tempos (30minutos, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h).

4.5.3.2 Estudos de competição com a apotransferrina

A 50 μL das soluções contendo os complexos $^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$ foi adicionado uma solução com excesso de apotransferrina (3mg/ml) em 500 μL de bicarbonato de sódio 10 mM (pH = 6,9) e posterior incubação a 37°C. As amostras foram analisadas por HPLC (ver 4.2.6. – método 2) em diferentes intervalos de tempos (30minutos, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h).

4.5.4. Determinação da ligação às proteínas plasmáticas

A determinação da percentagem de ligação às proteínas plasmáticas foi realizada por adição de 500 μL de soro humano fresco a 50 μL dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ - $^{67}\text{GaL3}$, sendo a mistura posteriormente incubada a 37°C. Em períodos de tempo apropriados (30 min,1h, 2h, 24h, 48h e 72h) foram retiradas amostras de 50 μL da solução, tratadas com 100 μl de etanol absoluto a 4°C e mediu-se a atividade total. Posteriormente, centrifugou-se durante 10 minutos a 3000 rpm para precipitar as proteínas do soro (fração proteica). De seguida foi retirado o sobrenadante resultante para medição da atividade em contador gama (*Berthold, LB2111*, Alemanha) e para análise em HPLC (método 4.2.6. – método 2) nos diferentes intervalos de tempo atrás descritos. O sedimento foi lavado, duas vezes, com 500 μL de etanol, centrifugado e a atividade novamente medida após retirado o excesso de etanol. A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada pela razão entre a radioatividade presente no precipitado (fração proteica), após precipitação das proteínas com etanol e separação do sobrenadante, e a radioatividade total da amostra.

4.5.5. Determinação da lipofilia dos complexos de ^{67}Ga pelo método de *Shake-Flask*

A lipofilia dos complexos de ^{67}Ga foi avaliada por determinação do coeficiente de partição ($D_{o/w}$) em condições fisiológicas pelo sistema bifásico n-octanol (o)/ PBS 0,1M (w), a pH = 7,4, utilizando a técnica de extrações sucessivas.¹⁰¹ A tubos de centrifuga contendo 1mL de PBS 0,1M adicionou-se 1mL de n-octanol, agitando-se de seguida em vórtex durante 2 minutos. Seguidamente adicionou-se 20 μL da solução do complexo radioativo em estudo, agitou-se novamente em vórtex durante 2 minutos e centrifugou-se a 3000 rpm (*CR4 11, Jouan*) durante 10 minutos para obter uma separação eficiente entre a fase orgânica e a fase aquosa. Após centrifugação separaram-se as duas fases e retiraram-se alíquotas de 100 μL (4 replicados) de cada uma das fases, medindo-se a sua atividade num contador de radiação gama (*Berthold, LB2111, Alemanha*). Para efetuar a segunda extração retiraram-se 400 μL da fase com maior radioatividade (complexos hidrofílicos - fase aquosa; complexos lipofílicos – fase orgânica), e adicionaram-se 400 μL da fase oposta (PBS ou n-octanol). De seguida procedeu-se como descrito para a primeira extração. O coeficiente de partição ($\log D_{o/w}$) foi calculado por aplicação da seguinte expressão:

$$\log(D_{o/w}) = \log\left(\frac{C_1}{C_2}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

em que:

C1 – atividade na fase orgânica (cpm);

C2 – atividade na fase aquosa (cpm).

Tabela 4.4 Valores de Log $D_{o/w}$ determinados para os complexos de ^{67}Ga .

Complexo	Actividade média no Octanol (cpm)	Actividade média em PBS (cpm)	$D_{o/w}$	Log $D_{o/w} \pm$ desvio padrão (pH=7,4)
$^{67}\text{GaL1}$	4963,6	359602,4	0,013803	-1,86 \pm 0,14
$^{67}\text{GaL2}$	1251,4	464307,6	0,002695	-2,57 \pm 0,01
$^{67}\text{GaL3}$	506	110804	0,004567	-2,34 \pm 0,01

4.6 Avaliação biológica dos complexos [^{67}GaL]

A avaliação biológica dos complexos de ^{67}Ga incluiu estudos de internalização em linhas celulares MFC-7 e B16F1 e estudos de biodistribuição em murganhos *Charles River*.

4.6.1. Internalização em linhas celulares MFC-7 e B16F1

4.6.1.1. Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas neste trabalho para os ensaios de internalização celular dos complexos $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL3}$ foram:

- Linhas celulares humanas de adenocarcinoma da mama, MCF-7;
- Linha celular de melanoma melanótico murino, B16F1.

4.6.1.2. Cultura e manutenção de linhas celulares

As linhas celulares MCF-7 e B16F1 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo GlutaMax I (Gibco, Invitrogen). Os meios de cultura foram suplementados com 10% de Soro Bovino Fetálico (FBS) (Gibco, Invitrogen) previamente inativado pelo calor e com 1% de solução de antibióticos Penicilina (100U/mL)/Estreptomicina (10 $\mu\text{g/mL}$) (Invitrogen). As linhas celulares foram mantidas em cultura numa incubadora a 37°C em atmosfera húmida de 5% de CO₂ (Heraeus, Alemanha). Sob condições de assepsia, o meio das células em cultura foi mudado de 2 em 2 dias. Nas linhas celulares aderentes procede-se à diluição da cultura celular quando se atinge cerca de 80% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS pH 7,2 e incubadas com tripsina-EDTA (Gibco, Invitrogen) para desagregação do frasco. De seguida, realizou-se a inativação da acção da tripsina adicionando-se meio de cultura [3tripsina:1meio de cultura (ml)]. As células foram diluídas com meio de cultura fresco e transferidas para novo frasco de cultura ou utilizadas para os ensaios de captação celular.

Nos ensaios de captação celular, determinou-se a concentração e viabilidade celular por contagem de células com azul tripano 0,4% (Sigma-Aldrich). As células não viáveis com membrana danificada coram de azul, ao invés das células viáveis que permanecem não coradas. A viabilidade é dada em percentagem do número de células viáveis em relação ao número total de células.

As células foram colocadas em placas de 24 poços (aproximadamente 0,2x10⁶ células/poço) durante a noite para promover a sua aderência (37°C; 5% de CO₂).

As células tumorais foram incubadas a 37°C com 200000 cpm do complexo $^{67}\text{GaL1-}^{67}\text{GaL3}$ não purificado ou purificado em 0,5ml do meio de ensaio (MEM com 25nM HEPES e 0,2% BSA) durante diferentes períodos de tempo (5, 30, 45, 60, 90 e 120minutos). Para remover o radiopéptido não ligado às células e interromper a internalização efetua-se a lavagem das células com meio de ensaio frio.

Para remover a fração de radiopéptidos ligado ao recetor na membrana celular (fração A) efetuaram-se duas incubações/lavagens com tampão ácido (50 nM Glicina HCL/100 nM de NaCl, pH2,8) durante 4 minutos à temperatura ambiente. A atividade associada à superfície da célula pode corresponder a ligação específica aos recetores ou a ligação inespecífica à superfície das células.

Para neutralizar o pH ácido das células recorreu-se a lavagem com PBS pH7,2 frio. Seguidamente, a lise celular ocorreu com adição de NaOH 1M durante 10 minutos a 37°C para determinar a fração de radiopéptido internalizado (fração B).

A percentagem de radioatividade associada à membrana celular e a percentagem de radioatividade internalizada foram medidas em contador gama.

A percentagem de captação celular total corresponde à soma da atividade na superfície celular com a atividade internalizada.

A % de captação na membrana celular e a % de internalização foram calculadas segundo as expressões:

$$\% \text{ captação membrana celular} = \frac{\text{Atividade da fração A (cpm)}}{\text{Atividade total (cpm)}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

$$\% \text{ internalização celular} = \frac{\text{Atividade da fração B (cpm)}}{\text{Atividade total (cpm)}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Com os dados experimentais traçaram-se curvas de % captação total (células vs tempo de incubação).

Para avaliar a captação e internalização celulares específica do composto (mediada pelo recetor Y1) realizou-se um estudo utilizando um agonista potente pNPY (1 μ M) para bloquear os referidos recetores.

Os estudos de internalização celular foram efetuados em colaboração com a Doutora Paula Raposinho (IST/CTN).

4.6.2. Estudos de biodistribuição em murganhos *Charles River*

Os estudos de estabilidade *in vivo* foram realizados de acordo com as normas portuguesas de manipulação de animais. Os animais foram mantidos em salas de temperatura e humidade controlada num horário 12 horas luz/ 12 horas escuridão e em dieta normal ad libitum, alojamento, cuidados e proteção dos animais para fins científicos (Decreto-lei 129/92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro da Portaria 1131/97, que transpõem para a ordem jurídica interna a Diretiva Comunitária nº 86/609/CEE).

Os estudos de biodistribuição envolveram a injeção intravenosa de 100 μ L (0,3 MBq) dos complexos radioativos ⁶⁷GaL1-⁶⁷GaL3 através da veia da cauda em murganhos fêmea Charles River da estirpe CD-1 (35-40g) previamente anestesiados com isoflurano. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical a dois tempos diferentes – 60 e 120 minutos p.i. para o complexo ⁶⁷GaL1 e 30 e 60 minutos p.i. para os complexos ⁶⁷GaL2 e ⁶⁷GaL3 – e os órgãos principais removidos, pesados e a sua atividade medida em câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3, Tóquio, Japão).

A excreção foi assumida como a diferença entre a atividade administrada e a atividade medida imediatamente após sacrifício. A atividade total no sangue, osso e músculo foi calculada considerando que estes órgãos correspondem a 6, 10 e 40% do peso total do animal, respetivamente.

Os resultados de biodistribuição foram expressos em percentagem de atividade injetada por órgão total (% A.I./órgão) e por grama de órgão (% A.I./g órgão) [capítulo 2, tabelas 2.6 (⁶⁷GaL1), tabela 2.7 (⁶⁷GaL2) e tabela 2.8 (⁶⁷GaL3)]. A fixação dos complexos nos

órgãos/tecidos mais relevantes foi ainda representada graficamente [capítulo 2, figura 2.26 ($^{67}\text{GaL1}$), figura 2.29 ($^{67}\text{GaL2}$) e figura 2.33 ($^{67}\text{GaL3}$)].

Amostras de sangue e urina foram recolhidas para avaliar a estabilidade *in vivo*.

Os estudos biodistribuição foram efetuados em colaboração com a Doutora Paula Raposinho (IST/CTN).

4.6.2.1. Análise da estabilidade *in vivo*/metabolização por HPLC

A estabilidade *in vivo* dos complexos ^{67}GaL foi avaliada pela análise da urina e do sangue por HPLC (ver 4.2.6 - método 2) em condições idênticas às utilizadas para análise dos complexos (ver 4.2.6. – método 2). As amostras foram recolhidas nos dois tempos de sacrifício (30 e 60 minutos p.i.), de acordo com os procedimentos atrás descritos (4.6.2). A urina colectada concomitantemente com o tempo de sacrifício foi centrifugada (*CR4 11, Jouan*) durante 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi analisado por HPLC. As amostras de sangue recolhidas foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C e o soro separado em alíquotas de 75µl. O soro foi tratado com etanol frio numa razão de 2:1 (vol/vol de etanol/soro) para precipitar as proteínas. As amostras foram novamente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC (ver 4.2.6. – método 2).

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

1. GLOBOCAN 2012: Breast Cancer estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013 [updated 2013 Nov; cited 2013 Nov 30]. Available from :http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Bower M, Waxman J. *Compêndio de Oncologia: cancro de mama*. 1.^a ed. Lisboa: Instituto Piaget, 2008.
3. Tempany CM, McNeil BJ. Advances in biomedical imaging. *JAMA*. 2001;285:562-567.
4. Pichler BJ, Kolb A, Nägele T, Schlemmer HP. PET/MRI: paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. *J Nucl Med*. 2010;51(3):333–6.
5. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med*. 2008;49(11):1735–8.
6. Reubi, J. C. Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging. *J Nucl Med*. 1995;36:1825–1835.
7. Reubi JC, Gugger M, Waser B, Schaer J-C. Y1-Mediated Effect of Neuropeptide Y in Cancer: Breast Carcinomas as Targets. *Cancer Res*. 2001;61(11):4636–41.
8. Fuhendorff J, Gether U, Aakerlund L, Langeland-Johansen N, Thøgersen H, Melberg SG, et al. [Leu³¹, Pro³⁴]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87(1):182-6.
9. Söll RM, Dinger MC, Lundell I, Larhammer D, Beck-Sickinger AG. Novel analogues of neuropeptide Y with a preference for the Y1-receptor. *Eur J Biochem*. 2001;268(10):2828–37.
10. Fani M, André JP, Maecke HR. ⁶⁸Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*. 2008;3(2):67–77.
11. Bastos J, Barros H, Lunet N. Evolução da mortalidade por Cancro de mama em Portugal. *Acta Med Port*. 2007; 20: 139-144.
12. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson a, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(6):7–23.
13. Jaffer FA, Weissleder R. Molecular imaging in the clinical arena. *JAMA*. 2005; 293(7):855-62.
14. Specht JM, Mankoff DA. Advances in molecular imaging for breast cancer detection and characterization. *Breast Cancer Res*. 2012;14(2):206.
15. Kataja V, Castiglione M. Primary breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 4:10–4.

16. Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. 2nd ed. USA: American Pharmacist Association; 2004.
17. Ramogida CF, Orvig C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. Chem Commun (Camb) The Royal Society of Chemistry. 2013;49(42):4720–39.
18. Zeglis BM, Lewis JS. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. Dalton Trans. 2011;40(23):6168–95.
19. Saha GB. Fundamentals of Nuclear Pharmacy 5th ed. USA: Springer-Verlag; 2003
20. Bhattacharyya S, Dixit M. Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. Dalton Trans. 2011;40(23):6112–28.
21. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic Radiopharmaceuticals. Chemical Reviews. 1999;99(9):2269-2292.
22. Ercan MT, Caglar M. Therapeutic radiopharmaceuticals. Current Pharmaceutical Design. 2000;6(11):1085-1121.
23. Liu S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. Chemical Society Reviews. 2004;33(7):445-461.
24. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60(12):1347–70.
25. Ferro-Flores G, Murphy CA, Melendez-Alafort, L. Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. Current Pharmaceutical Analysis. 2006;2(4):339-352.
26. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. Chem Rev. 2010;110(5):2858–902.
27. Pimlott SL, Sutherland A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. Chem Soc Rev. 2011;40(1):149–62.
28. Miller PW, Long NJ, Vilar R, Gee AD. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N radiolabels for positron emission tomography. Angew Chem Int Ed Engl. 2008;47(47):8998–9033.
29. Maecke HR, André JP. ⁶⁸Ga-PET radiopharmacy: A generator-based alternative to ¹⁸F-radiopharmacy. Ernst Schering Res Found. 2007;(62):215–42.
30. Pichler BJ, Kolb A, Nägele T, Schlemmer HP. PET/MRI: paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. J Nucl Med. 2010;51(3):333–6.
31. Meng Q, Li Z. Molecular imaging probes for diagnosis and therapy evaluation of breast cancer. Int J Biomed Imaging. 2013;2013:1-14.
32. Padmanabhan P, Goggi J, Bejot R, Bhakoo KK. Molecular targeting of breast cancer: imaging and therapy. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(4):528–38.
33. Oude Munnink TH, Nagengast WB, Brouwers AH, Schröder CP, Hospers GA, Lub-de Hooge MN, et al. Molecular imaging of breast cancer. Breast. 2009;18(3):S66–73.

34. Contractor KB, Kenny LM, Stebbing J, Rosso L, Ahmad R, Jacob J, et al. [¹⁸F]-3'-Deoxy-3'-fluorothymidine positron emission tomography and breast cancer response to docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7664–72.
35. Seimbille Y, Rousseau J, Bénard F, Morin C, Ali H, Avvakumov G, et al. ¹⁸F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids.* 2002;67(9):765–75.
36. Verhagen A, Luurtsema G, Pesser JW, de Groot TJ, Wouda S, Oosterhuis JW, et al. Preclinical evaluation of a positron emitting progestin ([¹⁸F]fluoro-16 alpha-methyl-19-norprogesterone) for imaging progesterone receptor positive tumours with positron emission tomography. *Cancer Lett.* 1991;59(2):125–32.
37. Dijkers ECF, Kosterink JGW, Rademaker AP, Perk LR, van Dongen GAMS, Bart J, et al. Development and characterization of clinical-grade ⁸⁹Zr-trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *J Nucl Med.* 2009;50(6):974–81.
38. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, et al. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(5):586–92.
39. Heskamp S, Boerman OC, Oyen WJG, Molkenboer-Kuenen JDM, van der Graaf WTA, van Laarhoven HWM. In vivo imaging of modulation of IGF-1R expression in breast cancer models. *Eur J Cancer.* 2011;47:S19.
40. Soria JC, Fayette J, Armand JP. Molecular targeting: targeting angiogenesis in solid tumors. *Annals Oncology.* 2004;15(4):223-227.
41. Chen X, Liu S, Hou Y, Tohme M, Park R, Bading JR, et al. MicroPET imaging of breast cancer alphav-integrin expression with ⁶⁴Cu-labeled dimeric RGD peptides. *Mol Imaging Biol.* 2004;6(5):350–9.
42. Zwanziger D, Beck-Sickinger AG. Radiometal targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones. *Curr Pharm Des.* 2008;14(24):2385-400.
43. Storr T, Thompson KH, Orvig C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews.* 2006;35(6):534-544.
44. Green MA, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part B Nucl Med Biol.* 1989;16(5):435–48.
45. Moerlein SM, Welch MJ. The chemistry of gallium and indium as related to radiopharmaceutical production. *Int J Nucl Med Biol.* 1981;8(4):277–87.
46. Harris WR, Pecoraro VL. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry.* American Chemical Society. 1983;22(2):292–9.
47. Bombardieri E, Aktolun C, Baum RP, Bishof-Delaloye A, Buscombe J, Chatal JF, et al. ⁶⁷Ga scintigraphy: procedure guidelines for tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;30(12):BP125–31.

48. Holland JP, Williamson MJ, Lewis JS. Unconventional nuclides for radiopharmaceuticals. *Mol Imaging*. 2010;9(1):1–20.
49. Rösch F. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators and ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry on their way into a new century. *J Postgrad Med Educ Res*. 2013;47:18-25.
50. Greene MW, Tucker WD. An improved gallium-68 cow. *Int J Appl Radiat Isot*. 1961;12(1-2):62–3.
51. Arino H, Skraba WJ, Kramer HH. A new $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radioisotope generator system. *Int J Appl Radiat Isot*. 1978;29(2):117–20.
52. Rösch F. Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. *Appl Radiat Isot*. 2013;76:24–30.
53. Rösch F, Riss PJ. The renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator initiates new developments in ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry. *Curr Top Med Chem*. 2010;10(16):1633-68.
54. Eckert & Ziegler. Modular-Lab PharmTracer ^{68}Ga . Bolonha; 2012. Available from: http://www.radiustech.it/prodotti_scheda.asp?l=2&c=1&p=18.
55. Baum R, Schmucking M, Wortmann R, Muller M, Zhernosekov K, Rosch F. Receptor PET/CT using the Ga-68 labelled somatostatin analog DOTA-1-Nal3-octreotide (DOTA-NOC): clinical experience in 140 patients. *Nuklearmedizin*. 2005;44:A57.
56. Win Z, Rahman L, Murrell J, Todd J, Al-Nahhas A. The possible role of ^{68}Ga -DOTATATE PET in malignant abdominal paraganglioma. *Eur J Nucl Med Mol Imag*. 2006;33:506.
57. Hofmann M, Oei M, Boerner AR, Maecke H, Geworski L, Knapp WH, Krause T. Comparison of Ga-68-DOTATOC and Ga-68-DOTANOC for radiopeptide PET. *Nuklearmedizin*. 2005;44:A58.
58. Breeman WAP, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. ^{68}Ga -labeled DOTA-peptides and ^{68}Ga -labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin Nucl Med*. 2011;41(4):314–21.
59. Dimitrakopoulou-Strauss A, Hohenberger P, Haberkorn U, Macke HR, Eisenhut M, Strauss LG. ^{68}Ga -labeled bombesin studies in patients with gastrointestinal stromal tumors: comparison with ^{18}F -FDG. *J Nucl Med*. 2007;48:1245–1250.
60. Baum RP, Prasad V, Frischknecht M, Maecke H, Reubi JC. Bombesin receptor imaging in various tumors: first results of Ga-68 AMBA PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imag*. 2007; 34(2):S193.
61. Anderson CJ, Welch MJ. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging. *Chem Rev American Chemical Society*. 1999;99(9):2219–34.

62. Bartholomal MD, Louie AS, Valliant JF, Zubieta, J. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chemical Reviews*. 2010;110(5):2903-2920.
63. Yokoyama A, Ohmomo Y, Horiuchi K, Saji H, Tanaka H, Yamamoto K et. al. Deferoxamine, a promising bifunctional chelating agent for labeling proteins with gallium-⁶⁷Ga-DF-HSA: concise communication. *J Nucl Med*. 1982; 23: 909–914.
64. Caraco C, Aloj L, Eckelman WC. The gallium-deferoxamine complex: stability with different deferoxamine concentrations and incubation conditions. *Appl Radiat Isot*. 1998; 49:1477-1479.
65. Correia JDG, Paulo A, Raposinho PD, Santos I. Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy. *Dalt Trans. The Royal Society of Chemistry*. 2011;40(23):6144–67.
66. Shokeen M, Wadas TJ. The development of copper radiopharmaceuticals for imaging and therapy. *Med Chem*. 2011;7(5):413–29.
67. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Kim YJ, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Preparation of ⁶⁸Ga-NOTA-RGDyK and feasibility test for angiogenesis imaging. *J Lab Comp Radiopharm*. 2007; 50(1):S47.
68. Heppeler A, Froidevaux S, Macke HR, Jermann E, Behe M, Powell P et al. Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with superb tumour-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy. *Chem A Eur J*. 1999; 5: 1016–1023.
69. Clarke ET, Martell AE. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13-, and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorg Chim Acta*. 1992; 190:37–46.
70. Clarke E, Martell AE. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of N,N0,N00-triazacyclononanetriacetic acid. *Inorg Chim Acta*. 1991;181:273–280.
71. Notni J, Hermann P, Havlíčková J, Kotek J, Kubíček V, Plutnar J, et al. A triazacyclononane-based bifunctional phosphinate ligand for the preparation of multimeric ⁶⁸Ga tracers for positron emission tomography. *Chemistry*. 2010;16(24):7174–85.
72. Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol*. 2007;34(7):757–78.
73. Ciavarella S, Milano A, Dammacco F, Silvestris F. Targeted therapies in cancer. *BioDrugs*. 2010;24(2):77–88.
74. Ting G, Chang C-H, Wang H-E. Cancer nanotargeted radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy. *Anticancer Res*. 2009;29(10):4107–18.
75. Hamoudeh M, Kamleh MA, Diab R, Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(12):1329–46.

76. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev.* 2003;24(4):389–427.
77. Schottelius M, Wester H-J. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods.* 2009; 48(2):161–77.
78. Zwanziger D, Böhme I, Lindner D, Beck-Sickinger AG. First selective agonist of the neuropeptide Y1-receptor with reduced size. *J Pept Sci.* 2009;15(12):856–66.
79. Prata MIM. Gallium-68: a new trend in PET radiopharmacy. *Curr Radiopharm.* 2012;5(2):142–9.
80. Ruzza P, Calderan A. Radiolabeled peptide-receptor ligands in tumor imaging. *Expert Opin Med Diagn.* 2011;5(5):411–24.
81. Graaf AJ, Kooijman M, Hennink WE, Mastrobattista E. Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation. *Bioconjug Chem.* 2009;20(7):1281–95.
82. List of FDA-approved radiopharmaceuticals v. 9 – Cardinal Health; 2014 [updated 2014 Mar; cited 2014 Mar 30]. Available from: <http://www.cardinalhealth.com/us/en/nuclearmedicinecompliance/fdaapproved>.
83. Lee S, Xie J, Chen X. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis. *Chem Rev.* 2010;110(5):3087-111.
84. Ambrosini V, Fani M, Fanti S, Forrer F, Maecke HR. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J Nucl Med.* 2011; 52(2):42S–55S.
85. Norman K, Beck-Sickinger AG. Novel modified and radiolabelled neuropeptide Y analogues to study Y-receptor subtypes. *Neuropeptides.* 2004;38:153-161.
86. Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, et al. The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur J Pharmacol.* 1994;271(2-3):R11-3.
87. Körner M, Reubi JC. NPY receptors in human cancer: a review of current knowledge. *Peptides.* 2007;28(2):419-25.
88. Zwanziger D, Khan IU, Neundorf I, Sieger S, Lehmann L, Friebe M, et al. Novel chemically modified analogues of neuropeptide Y for tumor targeting. *Bioconjug Chem.* 2008;19(7):1430-8.
89. Langer M, La Bella R, Garcia-Garayoa E, Beck-Sickinger AG. ^{99m}Tc-labeled neuropeptide Y analogues as potential tumor imaging agents. *Bioconjug Chem.* 2001;12(6):1028-34.
90. Gandomkar M, Najafi R, Mazidi M, Goudarzi M, Ebrahimi SES. Synthesis, Labeling and Quality Control of a New Neuropeptide Y Analogue for Diagnosis of Breast Tumors. *Iran J Nucl Med.* 2008;16(1):20-24.
91. Khan IU, Zwanziger D, Böhme I, Javed M, Naseer H, Hyder SW, Beck-Sickinger AG. Breast cancer diagnosis by neuropeptide Y analogues: from synthesis to clinical application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(6):1155-8.

92. Walther C, Mörl K, Beck-Sickinger AG. Neuropeptide Y receptors: ligand binding and trafficking suggest novel approaches in drug development. *J Pept Sci.* 2011;17(4):233-46.
93. Guérin B, Dumulon-Perreault V, Tremblay M-C, Ait-Mohand S, Fournier P, Dubuc C, et al. [Lys(DOTA)4]BVD15, a novel and potent neuropeptide Y analog designed for Y1 receptor-targeted breast tumor imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(3):950–3.
94. Pourghiasian M, Inkster J, Hundal N, Mesak F, Guerin B, Ait-Mohand S, et al. ¹⁸F-BVD-15 for NPY Y1 receptor imaging in breast cancer and neuroblastoma models by PET. *J Nucl Med.* 2011;52(1):1682.
95. Li M-H, Lin J-J, Dai I-L, Chiou M-C. The use of silica-gel cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. *Soc Nucl Med Annu Meet Abstr.* 2010;51(2):1542.
96. Bigott-Hennkens HM, Dannoon S, Lewis MR, Jurisson SS. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2008; 52(3):245-53.
97. Wild D, Fani M, Behe M, Brink I, Rivier JE, Reubi JC, et al. First clinical evidence that imaging with somatostatin receptor antagonists is feasible. *J Nucl Med.* 2011;52(9):1412-7.
98. Gilaberte Y, Roca MJ, Garcia-Prats MD, Coscojuela C, Arbues MD, Vera-Alvarez JJ. Neuropeptide Y expression in cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 66(6):201-8.
99. Antunes MS, Raposinho PD. Análogos do neuropeptídeo Y marcados com ^{99m}Tc para detecção de receptores Y1 expressos no cancro de mama. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; 2012.
100. Ferreira CL, Lamsa E, Woods M, Duan Y, Fernando P, Bensimon C, et al. Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem. American Chemical Society.* 2010;21(3):531–6.
101. Troutner DE, Volkert WA, Hoffman TJ, Holmes RA. A neutral lipophilic complex of ^{99m}Tc with a multidentate amine oxime. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes.* 1984;35(6):467-470.