



Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH): potencial agente de oncología molecular

Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): potential agent of molecular oncology

Lucía Alfaya ^a, Ximena Camacho ^a, Mirel Cabrera ^a, María Fernanda García ^a, Marcelo Fernández ^a, Juan Pablo Gambini ^b, Pablo Cabral ^a.

(a) Departamento de Radiofarmacia. Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

(b) Centro de Medicina Nuclear. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

RESUMEN

La hormona liberadora de la hormona luteinizante es un decapeptido producido por el hipotálamo y posee un rol fundamental en la regulación del eje pituitario/gonadal y en el ciclo ovárico. Es capaz de unirse a receptores específicos sobre las células gonadales para regular la síntesis y secreción de las hormonas gonadotróficas, las hormonas luteinizante y folículo estimulante. A su vez, se ha comprobado que receptores específicos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante se encuentran sobreexpresados en cáncer mama, próstata, ovárico, entre otros; lo cual ha permitido su utilización, tanto de análogos como agonistas, en terapia para estas neoplasias, principalmente en cáncer de próstata y mama. Por lo anterior, nos planteamos desarrollar y optimizar la marcación con el radionucléido emisor gamma, el 99m-Tecnecio, del péptido LHRH, a modo de evaluar su potencial empleo como agente de imagen molecular en oncología. Para esto, el HYNIC-GSG-LHRH fue adquirido comercialmente. La marcación con ^{99m}Tc fue realizada a 50 °C en presencia de diferentes co-ligandos incluyendo Tricina, Ácido etilendiaminodiacético, Tricina/Ácido etilendiaminodiacético y Tricina/Ácido Nicotínico. Las condiciones de marcación (pH, concentración de coligandos, concentración de agente reductor (cloruro de estaño), temperatura y tiempo de reacción)

fueron optimizadas en orden, para estandarizar el procedimiento. Se evaluaron las purzas radioquímicas por HPLC. Tanto los coeficientes de partición (Log P) y la estabilidad *in vitro* fueron determinadas a modo de obtener un agente de imagen estable y de alta pureza radioquímica. Se realizaron estudios biológicos *in vitro* de afinidad en distintas líneas celulares humanas de mama y próstata (MDA-MB-231, MCF-7 y MDA-MB-435) y próstata (PC3, LnCap y Du-145), así como su perfil de biodistribución en modelos murinos; a modo de obtener una aproximación al comportamiento biológico del nuevo radiotrazador.

Logramos marcar el conjugado HYNIC-GSG-LHRH con 99m-Tecnecio, empleando altas actividades específicas usando como co-ligandos tanto Tricina como la mezcla Tricina/Ácido Nicotínico, obteniendo altas purzas radioquímicas (> 95%), alta estabilidad *in vitro* y baja lipofilicidad (Log P de $-2,5 \pm 0,05$ y $-2,82 \pm 0,04$, empleando Tricina y Tricina/Ácido Nicotínico, respectivamente). El conjugado [^{99m}Tc]-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina-Ácido Nicotínico reveló elevada afinidad de unión específica por los receptores de la hormona liberadora de la hormona luteinizante expresados en las líneas celulares de mama y próstata. Se observó que el complejo radiomarcado presenta un perfil de biodistribución óptimo para ser empleado como potencial agente de imagen.

Recibido para evaluación: Febrero 2018

Aceptado para publicación: Setiembre 2018

Correspondencia: Laboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Mataojo 2055, P.O. 11400, Montevideo, Uruguay. Tel.: (+5982) 5250901/108. Fax: (+5982) 5250895.

E-mail de contacto: lalfaya.27@gmail.com

PALABRAS CLAVE: Hormona Luteinizante; Imagen Molecular; Neoplasias de la Mama; Neoplasias de la Próstata; Receptores de HL.

ABSTRACT

Luteinizing hormone-releasing hormone is a decapeptide produced by the hypothalamus and has a fundamental role in the regulation of the pituitary/gonadal axis and in the ovarian cycle. It is able to bind to specific receptors on gonadal cells to regulate the synthesis and secretion of gonadotrophic hormones, luteinizing hormones and follicle stimulating hormones. In turn, it has been shown that specific receptors of the hormone releasing luteinizing hormone are overexpressed in breast, prostate, ovarian cancer, among others; which has allowed its use, both analogues and agonists, in therapy for these neoplasms, mainly in prostate and breast cancer. Therefore, we propose to develop and optimize the gamma emitting radionuclide labeling, ^{99m}Tc , of the LHRH peptide, in order to assess its potential use as a molecular imaging agent in oncology. For this purpose, the HYNIC-GSG-LHRH was purchased commercially. The ^{99m}Tc labeling was performed at 50°C in the presence of different co-ligands including Tricine, Ethylenediamine diacetic acid, Tricine/Ethylenediamine diacetic acid and Tricine/Nicotinic acid. The marking conditions (pH, concentration of co-ligands, concentration of the reducing agent (tin chloride), temperature and reaction time) were optimized in order to standardize the procedure. The radiochemical purities were evaluated by HPLC. Both the partition coefficients (Log P) and in vitro stability were determined in order to obtain a stable imaging agent of high radiochemical purity. In vitro biological affinity studies were performed in different human breast and prostate cell lines (MDA-MB-231, MCF-7 and MDA-MB-435) and prostate (PC3, LnCap and Du-145), as well as their profile of biodistribution in murine models; in order to obtain an approximation to the biological behavior of the new radiotracer.

We managed to label the conjugate HYNIC-GSG-

LHRH with ^{99m}Tc , using high specific activities using as co-ligands both Tricine and the Tricine/Nicotinic Acid mixture, obtaining high radiochemical purities ($> 95\%$), high stability in vitro and low lipophilicity (Log P of $-2,5 \pm 0,05$ and $-2,82 \pm 0,04$, using Tricine and Tricine/Nicotinic Acid, respectively). The [^{99m}Tc]-HYNIC-GSG-LHRH/Tricine-Nicotinic Acid conjugate revealed a high specific binding affinity for the luteinizing hormone-releasing hormone receptors expressed in the breast and prostate cell lines. It was observed that the radiolabeled complex presents an optimal biodistribution profile to be used as a potential imaging agent.

KEY WORDS: Luteinizing Hormone; Molecular Imaging; Breast Neoplasms; Prostatic Neoplasms; Receptors, LH.

INTRODUCCIÓN

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada.

Se estima que más de la tercera parte de los humanos desarrollan cáncer en algún momento de su vida; siendo este responsable del 10-25% de las muertes en el mundo (1,2). Más de 200 variaciones de esta patología han sido descritas hasta la fecha, cada una con características y tratamientos distintos. Según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en nuestro país. Entre éstos, el cáncer de mama es el más frecuente en la mujer (figura 1); se estima que una de cada diez mujeres podrá desarrollar cáncer de mama, causando la muerte de aproximadamente dos mujeres por día (3). En cuanto a los hombres, vemos que a nivel local, es el cáncer de próstata que se posiciona en primer lugar (figura 1) en cuanto a su incidencia y segundo en cuanto a mortalidad (a nivel mundial es el segundo luego del cáncer de pulmón). Se estima que 1,1 millones de hombres fueron diagnosticados con cáncer de próstata en el 2012, siendo un 15% de los cánceres diagnosticados en hombres, de los cuales el 70% se encuentran en países desarrollados (4,5).



Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer

CANCER EN URUGUAY 2010-2014
PRINCIPALES SITIOS (ordenados por Incidencia)



COMISION HONORARIA DE LUCHA CONTRA EL CANCER
REGISTRO NACIONAL DE CANCER

Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000.

Figura 1. Porcentaje de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres (izquierda) y hombres (derecha) en Uruguay. Datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (5).

La detección temprana, el diagnóstico y el tratamiento precoz son la clave para reducir la tasa de mortalidad. En este sentido, el campo de la imagenología molecular se abre como una herramienta capaz de generar imágenes funcionales, detectando y determinando a nivel celular y molecular las características de esta enfermedad (6,7).

Para esto, es necesario descubrir y explotar aquellos marcadores celulares que se expresan únicamente -o se sobreexpresan- en las células neoplásicas, de forma tal de emplearlos como blanco para generar nuestro agente de imagen.

Desde este punto, la utilización de anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, péptidos e incluso fragmentos de ADN han demostrado ser buenos vehículos para estas construcciones, pudiendo ser fácilmente acopladas a un radionucleido específico y siendo entonces capaces de dirigir esta molécula indicadora al sitio deseado por una reacción específica de unión a un receptor. Centrándonos en péptidos; estos poseen propiedades farmacocinéticas únicas al compararse con anticuerpos o fragmentos de estos, presentando una mejor penetración y menor captación inespecífica, a la vez que no provocan una respuesta inmune; simultáneamente mantienen alta especificidad y afinidad por su blanco (8,9).

Dentro de estas moléculas encontramos a la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH); una hormona decapeptídica, secretada por las neuronas del núcleo Arcuato del hipotálamo. Es secretada a la circulación portal pituitaria y juega un rol importante en la biología de la reproducción, induciendo la biosíntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Su secreción es crucial para el control de la función gonadal y el ciclo ovárico normal. La continua estimulación pituitaria, tanto por la LHRH natural como por agonistas, causa la desensibilización de los gonadotrofos pituitarios, resultando en la cesación de la secreción de gonadotrofinas (10,11).

Receptores específicos de la LHRH fueron originalmente detectados en órganos regulados por el eje pituitario-gonadal (glándula pituitaria, a la vez que en tejido reproductor masculino y femenino) (12). Existen dos formas de receptores de LHRH, LHRHR-1 y LHRHR-2, los cuales a su vez se encuentran sobreexpresados en diferentes tipos de cánceres, especialmente aquellos hormono dependientes, como mama, endometrial, próstata y ovárico (13-16). Esto demuestra que la LHRH podría estar involucrada en el crecimiento de estos tumores, proporcionando así las bases para las aplicaciones clínicas de análogos

de la LHRH en ginecología y oncología.

Últimamente, también se ha observado que existen sitios de unión para el péptido LHRH distintos tumores humanos y en líneas celulares de cáncer de hígado, laringe, páncreas, colon, riñón, piel y cerebro (12-23), pudiendo entonces ampliar su uso a otras patologías.

Por lo anterior, el péptido LHRH, de fácil síntesis química, ya ha sido utilizado como posible terapia en cáncer de próstata y mama, tanto como agonista o antagonista (24,25).

Teniendo en cuenta esta base, nos planteamos como línea lógica a seguir, la generación de un nuevo agente de imagen preclínico para cáncer de mama y próstata utilizando como base el péptido LHRH marcado ^{99m}Tc vía el agente quelante bifuncional HYNIC (26,27).

Hay que tomar en cuenta que el radionucléido ^{99m}Tc se encuentra ampliamente disponible en centros de Medicina Nuclear, posee una química bien establecida y adecuadas propiedades nucleares ($t_{1/2} = 6,04$ h, $E_{\gamma} = 140$ KeV (89%)); lo que junto a su bajo costo lo hacen un radionucléido indicado para la síntesis de este tipo de agentes de imagen. La química del marcado, con ^{99m}Tc de forma directa o a través de agentes quelantes bifuncionales está bien establecida (28,29) y ha sido de amplio uso en nuestro departamento, donde disponemos de una plataforma ya establecida para la generación de este tipo de agentes de imagen (30-34).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Síntesis de péptido HYNIC-LHRH-GSG

El decapeptido HYNIC-GSG-LHRH ($\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{N}_{17}\text{O}_{13}$) fue adquirido en su forma ya derivatizada con el agente quelante bifuncional Succidinimyl-hidrazinonicotinamida (HYNIC) (agente quelante sintetizado en nuestro laboratorio por la Dra. María Fernanda García (34) y entregado a la empresa para su derivatización), con una pureza > 95% (determinada por HPLC-UV), un peso molecular (PM) de 1589,71 g/mol (determinado por espectrometría masas donde el PM del LHRH

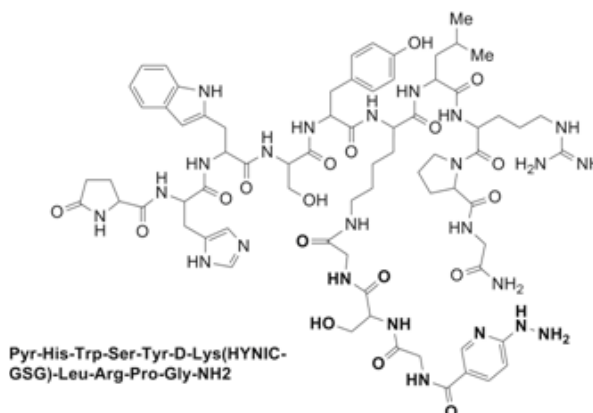


Figura 2. Esquema del decapeptido HYNIC-GSG-LHRH sintetizado por la empresa Siquimia S.A. (Uruguay); $\text{C}_{72}\text{H}_{100}\text{N}_{24}\text{O}_{18}$; 1589,71 g/mol.

sin HYNIC fue de 1454,6 g/mol) y en forma liofilizada (4 mg); de la empresa SIQUIMIA S.A. (Uruguay). Se sabe que los motivos pGlu1-His2-Trp3 y Arg8-Pro9-Gly10-NH₂ del decapeptido son esenciales para la unión a su receptor. A su vez, está documentado que el reemplazo de la Gly6 con un D-aminoácido (síntesis análogos u agonistas) es capaz de aumentar la afinidad de unión, disminuir el clearance e incrementar la eficacia terapéutica. Por lo cual, la unión del agente quelante HYNIC empleando una D-Lys y un linker flexible (secuencia GSG) en la posición 6, no alteraran la unión específica con el receptor ($\text{C}_{72}\text{H}_{100}\text{N}_{24}\text{O}_{18}$) (figura 2).

2. Marcación del péptido con ^{99m}Tc

Se estudiaron distintas condiciones de marcación del HYNIC-GSG-LHRH con ^{99m}Tc empleando como co-ligandos los compuestos Tricina, ácido etilendiamina-N-N'-diacético (EDDA), Tricina-EDDA y Tricina-Ácido Nicotínico (AN), y cloruro de estaño (SnCl_2) como agente reductor. Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con corriente de gas N_2 .

Las purezas radioquímica (PRQ) de todos los complejos fueron analizados mediante el empleo de un equipo *Agilent Serie Infinity 1200*, equipado con un detector *GABI Star* y utilizando una columna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 x 10 μm , Restek Ultra), el



detector UV se estableció en 280 nm. El método utilizado para la determinación de la PRQ fue el siguiente: gradiente de 20 min utilizando como fase móvil Agua/TFA 0,1% (A) y ACN/TFA 0,1% (B), 0-5 min 0-45% B, 5-10 min 45-65% B, 10-20 min 100% B.

Para llevar a cabo las respectivas marcaciones se utilizó 20 µg de HYNIC-GSG-LHRH (1 µg/µL) almacenado a -20 °C; al cual se le adicionaron:

- 150 µL de una solución de Tricina (100 mg/mL en H₂O destilada); 15 µL de una solución recién preparada de SnCl₂ (1 mg/mL en 0,1 M HCl) y 185-555 MBq de ^{99m}TcO₄⁻ (hasta 500 µL). Se controla el pH (4,5) y se incuba durante 30 min a 50 °C en un baño de agua.

- 150 µL de una solución de Tricina (100 mg/mL en H₂O) y 100 µL Ácido Nicotínico (AN; 20 mg/mL en H₂O destilada); 5 µL de una solución de SnCl₂ recién preparada (1 mg/mL en 0,1 M HCl) y 185-555 MBq de ^{99m}TcO₄⁻ (hasta 500 µL). Se controla el pH (5) y se incuba durante 30 min a 50 °C en un baño de agua.

- 150 µL de una solución de Tricina (100 mg/mL en H₂O destilada) y 80 µL de EDDA (20 mg/mL en H₂O destilada); 15 µL de una solución de SnCl₂ recién preparada (1 mg/mL en 0,1 M HCl) y 185-555 MBq de ^{99m}TcO₄⁻ (hasta 500 µL). Se controla el pH (5) y se incuba durante 30 min a 50 °C en un baño de agua.

Paralelamente, probamos realizando la incubación durante 1 min a 70 °C en el mismo baño a modo de comparar resultados.

- 100 µL de EDDA (40 mg/mL en H₂O destilada); 15 µL de una solución de SnCl₂ recién preparada (1 mg/mL en 0,1 M HCl) y 185-555 MBq de ^{99m}TcO₄⁻ (hasta 500 µL). Se controla el pH final (5) y se incuba durante 30 min a 50 °C en un baño de agua.

3. Purificación de ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH

El control y purificación de los complejos peptídicos marcados se realizaron mediante HPLC utilizando el método que fue mencionado anteriormente. Posteriormente se diluyó la fracción purificada con aproximadamente 500 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 y el ACN

se redujo aplicando una corriente de N₂. Finalmente, se controla pH y si es necesario se añade PBS 0,1 M pH 7,4.

4. Coeficiente de reparto o Log P

Para evaluar los valores de Log P, se purificaron por HPLC los conjugados de HYNIC-GSG-LHRH/coligando marcados con ^{99m}Tc. El disolvente fue eliminado y el conjugado marcado (0,74 MBq) fue reconstituido en PBS (pH 7,4, 0,1 M, 20 mL).

Tubos conteniendo 500 µL de Octanol y 500 µL del conjugado marcado disuelto en PBS, fueron vigorosamente agitados durante 1 min y centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min. Seis fracciones de 100 µL fueron colectadas de ambas fases, para la medición de sus respectivas cuentas en un contador de pozo de NaI. El coeficiente de reparto se obtuvo como el log (cuentas por min en octanol / cuentas en fase acuosa).

5. Estabilidad *in vitro*

Estabilidad en PBS

Se estudió la estabilidad *in vitro* de los conjugados ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina, ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN, ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina-EDDA y ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/EDDA. Para evaluar la estabilidad, se purificaron por HPLC todos los conjugados ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/coligandos por el método previamente descrito. Se incubó una alícuota de 1,85 MBq de cada complejo en 500 µL de PBS a 37 °C hasta 4 hs. Cada experimento fue realizado por triplicado y controlado por HPLC.

Estabilidad en Suero Fetal Bovino (SFB)

Se estudió la estabilidad *in-vitro* de los conjugados marcados empleando los distintos co-ligandos incubando una alícuota de cada complejo peptídico en SFB a 37° C, hasta 4 hs. Las proteínas fueron precipitadas con Acetonitrilo (ACN) y centrifugadas (1750 g, 5 min, 4 °C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en un contador de pozo de NaI. Finalmente, el sobrenadante fue analizado por RP-HPLC para evaluar la estabilidad de los complejos de ^{99m}Tc.

Estabilidad en L-Cisteína

Se estudió la estabilidad *in vitro* del conjugado ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN en L-Cisteína mediante el método previamente descrito por *Hnatowich et al.* (35). Para ello fue incubada una alícuota del complejo marcado disuelto en 500 μL de PBS en distintas concentraciones de L-Cisteína (0,1, 1,0 y 10 mM) a 37 °C, hasta 24 hs. Todos los estudios fueron realizados por triplicado y analizadas sus respectivas PRQ por RP-HPLC, para evaluar la estabilidad de los complejos de ^{99m}Tc .

6. Modelos celulares

Las líneas celulares humanas de cáncer de próstata (PC3, LnCap, Du-145) y de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MCF-7), fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC). El medio base utilizado en todas estas líneas celulares fue RPMI-1640 (Capricorn), suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración final de 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomina.

La línea celular de fibroblastos normales (NIH3T3) también fue adquirida de ATCC, utilizando como medio base DMEM alta glucosa (Capricorn), suplementada con Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración final de 10%, 100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de HEPES.

Los cultivos fueron incubados a 37 °C con 5% de CO_2 y una atmósfera del 95% de humedad.

7. Estudios biológicos *in vitro* de unión celular

Se realizó un ensayo de afinidad de unión específica en todas las líneas celulares mencionadas. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo durante dos semanas. Se determinó el número de células y se incubaron 10^6 células en 1,0 ml de medio de cultivo con ~ 100 nM de ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN por 15, 30, 45 y 60 min a 37 °C.

La respectiva unión a la membrana fue determinada mediante un lavado (300 μL) con acetato de sodio (40 mM, pH 4,5) y la internalización fue determinada mediante un segundo lavado (300 μL) de NaOH

1N por 10 min. La cuantificación de las respectivas cuentas por min (cpm) del péptido radiomarcado en cada lavado fue determinado mediante el empleo de un contador gamma automático (Capintec CRC-7, Montvale, N.J., EE.UU.). Cada punto se realiza por cuadruplicado.

Con el fin de confirmar el grado de unión no específica, se llevaron a cabo estudios blancos incubando el mismo número de células y ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN con la adición de 20 μg de HYNIC-GSG-LHRH sin marcar durante 2 hs. en las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

8. Estudios de estabilidad biológicos *in vivo*

La evaluación biológica *in vivo* del complejo de ^{99m}Tc -HYNIC-LHRH/Tricina/AN se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Los ensayos fueron realizados en ratones normales BALB/c, entre 6-10 semanas de edad y 18-24 g.

Animales (n=5 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 1-3 MBq del complejo de ^{99m}Tc -HYNIC-LHRH/Tricina/AN purificado y sacrificados por dislocación cervical luego de 0,5, 1, 2 y 24 hs. Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y sus respectivas radioactividades medidas en un detector NaI (TI). La sangre y orina fueron también colectados y medidos. La radioactividad en el tumor y en los tejidos normales es expresada como porcentaje de dosis inyectada (% DI) y como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g).

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no apareada t. Fue considerado significativo un valor de $p \leq 0,05$.



4700 Reflector Spec #1 MC->BC[BP = 1454.6, 19308]

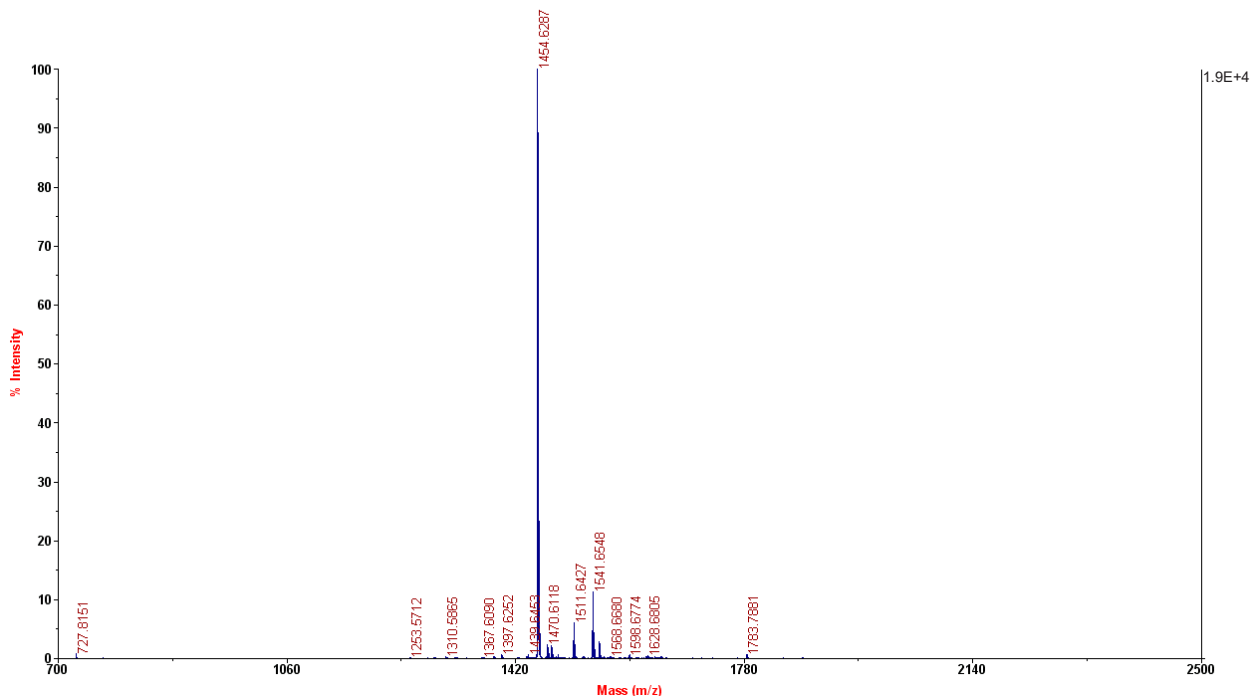


Figura 3. Espectrometría de Masas (MS) de LHRH sin HYNIC (PM: 1454,6 g/mol), proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

RESULTADOS

1. Síntesis de HYNIC-GSG-LHRH

El peso molecular del decapeptido LHRH fue confirmado por espectrometría masas (MS) y por UV-HPLC, proporcionados por la empresa SIQUIMIA S.A., dónde la relación m/z del LHRH para (MH)⁺ fue de 1454,6 Da y se muestra en las figuras 3 y 4.

Al realizar el proceso de conjugación al AQB (HYNIC) y al linker (GSG), el peso molecular del decapeptido conjugado HYNIC-GSG-LHRH fue confirmado por espectrometría masas (MS Spectrum) y por UV-HPLC, dónde la relación m/z del LHRH para (MH)⁺ fue de 1589,71 Da y se muestra en las figuras 5 y 6.

2. Marcación con ^{99m}Tc de HYNIC-GSG-LHRH

Primariamente se evaluó por HPLC el perfil del péptido sin marcar mediante el empleo del detector UV en las condiciones mencionadas anteriormente, revelando un Tiempo de Retención (Tr = 7,00 min) (figura 7). Posteriormente se evaluó por HPLC el perfil del

^{99m}TcO₄⁻ en las condiciones ensayadas, revelando un Tr de 3,63 min; de forma tal de establecer su posible presencia en los distintos conjugados como impureza radioquímica (figura 8).

El conjugado HYNIC-GSG-LHRH se logró marcar con rendimientos superiores a 99,52 ± 0,26% utilizando Tricina como co-ligando a 50 °C durante 20 min. El complejo ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina se logró purificar exitosamente a través de HPLC, con un Tr de aproximadamente 7 min. (figura 9).

El conjugado HYNIC-GSG-LHRH se logró marcar con rendimientos superiores a 99,83 ± 0,29% utilizando Tricina/AN como co-ligando a 50 °C durante 20 min. El complejo ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN se logró purificar por HPLC, presentando un Tr de 6,99 min. (figura 10).

El conjugado HYNIC-GSG-LHRH se logró marcar con rendimientos superiores a 74,98 ± 1,87% utilizando Tricina/EDDA como co-ligando a 50 °C durante 20 min. El complejo ^{99m}Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/EDDA se purificó por HPLC, con un Tr de 7,07 min. (figura 11).

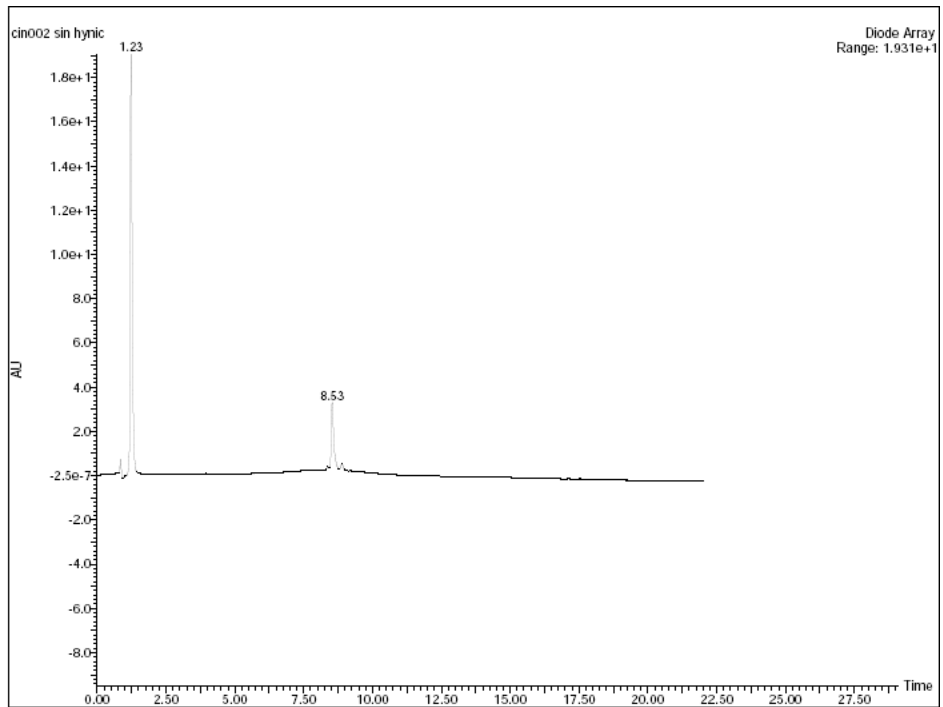


Figura 4. Cromatograma HPLC-UV de LHRH sin HYNIC proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

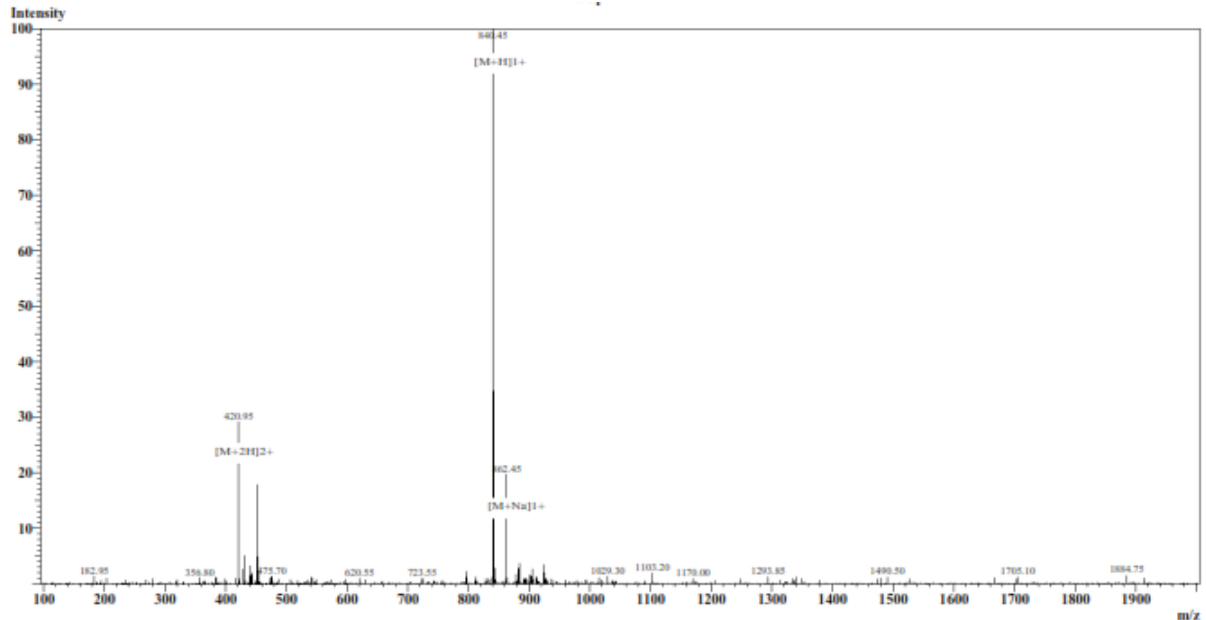


Figura 5. Espectrometría de Masas (MS) de HYNIC-GSG-LHRH (PM:1589, 71 g/mol), proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

Por último, el conjugado HYNIC-GSG-LHRH se marcó con rendimientos superiores a $70,94 \pm 1,27\%$ utilizando EDDA como co-ligando a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. El complejo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-GSG-LHRH/}$

EDDA se purificó por HPLC, con un Tr de 7,03 min. (figura 12).

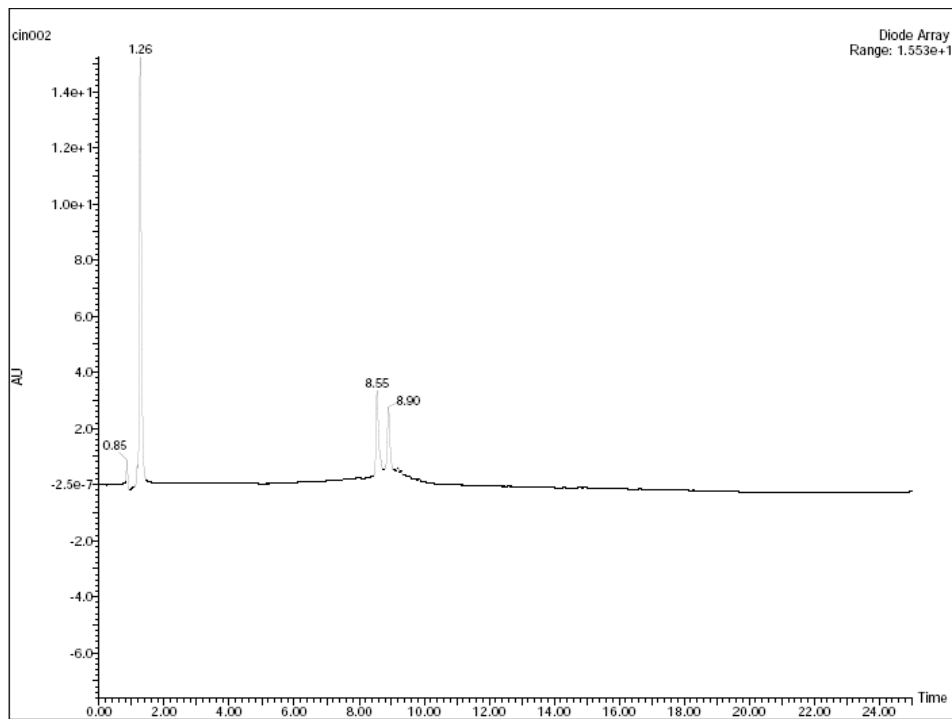


Figura 6. Cromatograma HPLC-UV de HYNIC-GSG-LHRH proporcionado por la empresa Siquimia S.A.

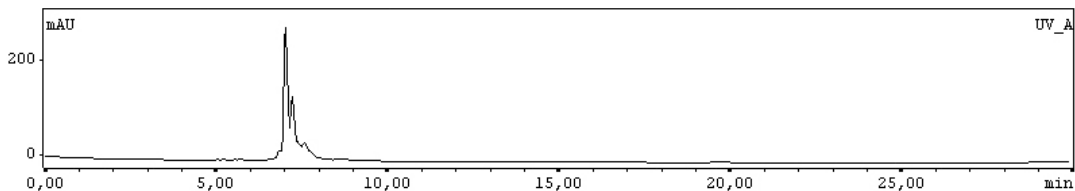


Figura 7. Perfil RT-HPLC del péptido HYNIC-GSG-LHRH empleando detector UV a 280 nm. Tiempo retención (Tr): 7,00 min.

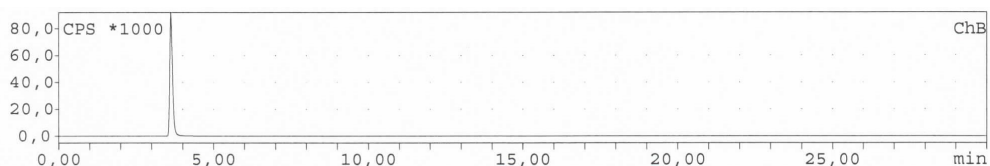


Figura 8. Perfil de RT-HPLC de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Tr: 3,63 min.

3. Coeficiente de Reparto o log P

Se evaluó el carácter hidrofílico de los complejos peptídicos marcados con ^{99m}Tc utilizando los distintos co-ligandos, mediante el cálculo del coeficiente de reparto octanol-agua. Los valores obtenidos se muestran en la figura 13. En todos los casos el complejo estudiado mostró ser hidrofílico.

4. Estabilidad *in vitro*

Se estudió la estabilidad *in vitro* en PBS de los radioconjugados hasta 4 hs. (figura 14).

Todos los radiocomplejos resultaron estables, pero sólo los complejos marcados con los co-ligandos Tricina y Tricina/AN presentaron purzas radioquímicas mayores al 90% hasta las 4 hs. del estudio.

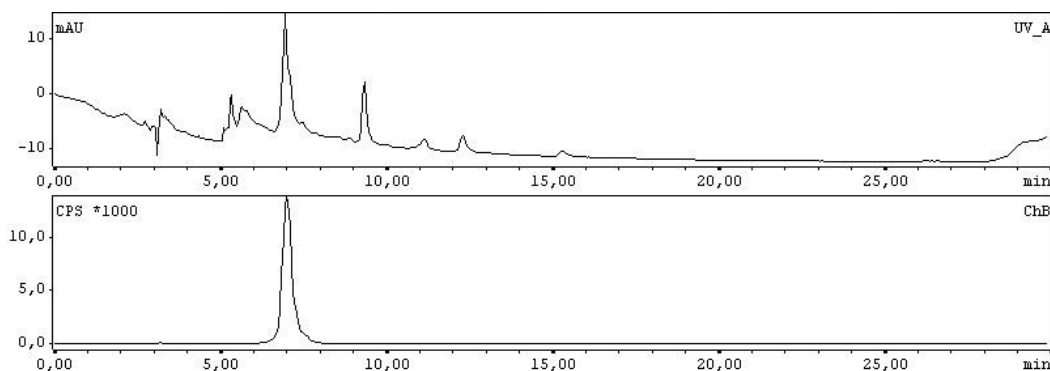


Figura 9. Perfil de RT-HPLC del ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina en columna C18. Arriba detector UV, Tr= 6,92 min y abajo detector gamma, Tr: 7,00 min.

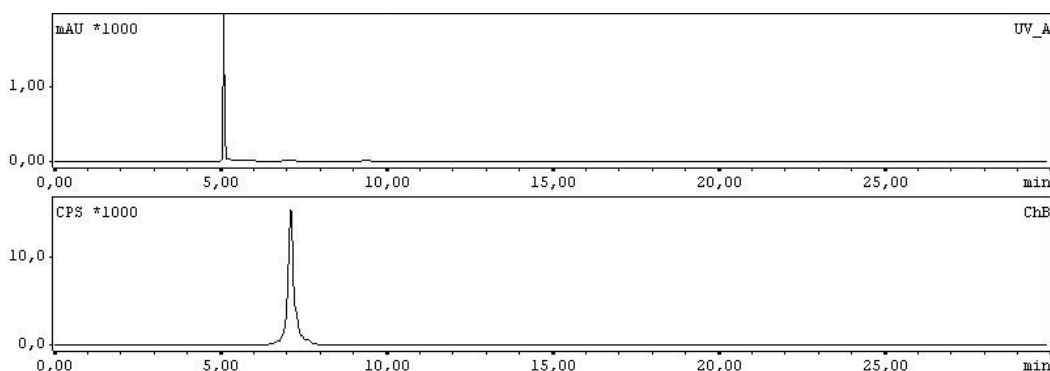


Figura 10. Perfil de RT-HPLC del ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN en columna C18. Arriba detector UV, Tr = 6,99 min y abajo detector gamma, Tr= 7,00 min.

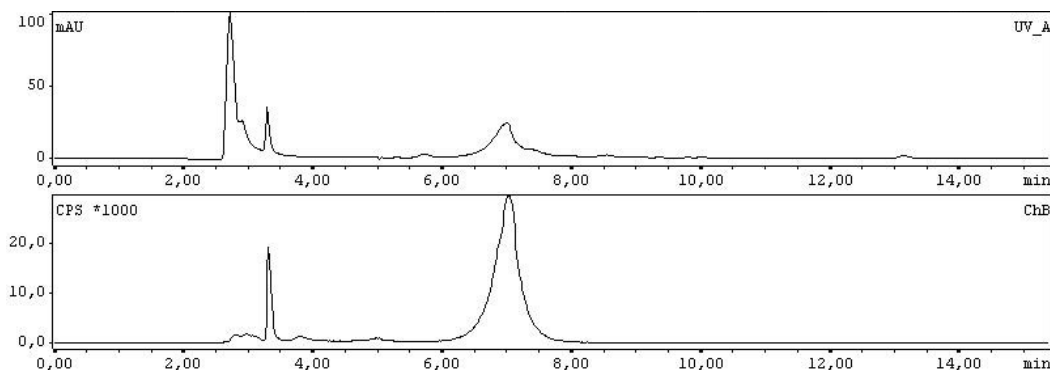


Figura 11. Perfil de RT-HPLC del ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/EDDA en columna C18. Arriba detector UV, Tr = 7,00 min y abajo detector gamma, Tr= 7,07 min.

5. Estabilidad en SFB

También la estabilidad de los radiocomplejos se analizó en SFB hasta 4 hs. (figura 15). Se observó que tanto el complejo marcado empleando el coligando Tricina y la mezcla Tricina/AN son los complejos que presentan una menor unión a proteínas plasmáticas (siendo más estables a la transquelación), aún a 4 hs. del estudio; en especial el complejo marcado utilizando la mezcla de co-ligandos Tricina/AN.

ción), aún a 4 hs. del estudio; en especial el complejo marcado utilizando la mezcla de co-ligandos Tricina/AN.

6. Estabilidad en L-Cisteína

Por último, la estabilidad de los radiocomplejos se analizó mediante un estudio de transquelación en

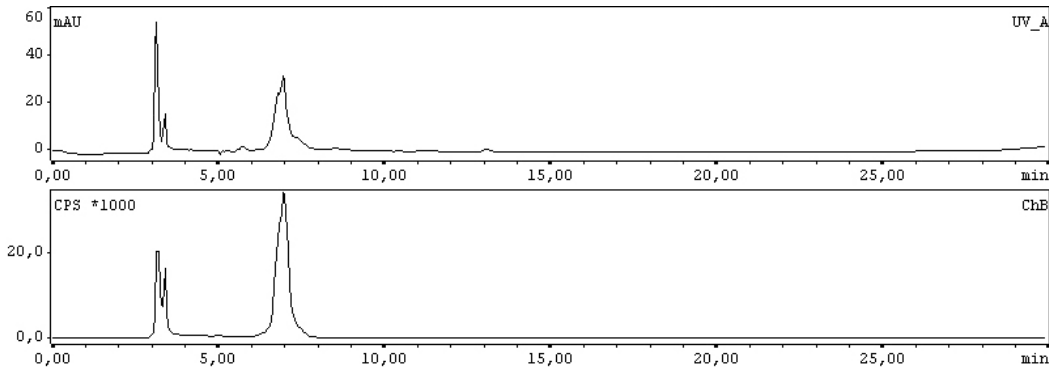
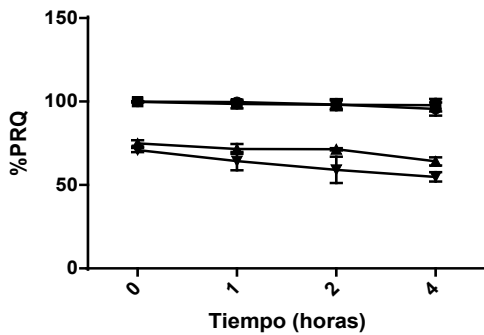


Figura 12. Perfil del detector gamma de RT-HPLC del ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/EDDA en columna C18. Arriba detector UV y abajo detector gamma, $T_r = 7,03$ min.

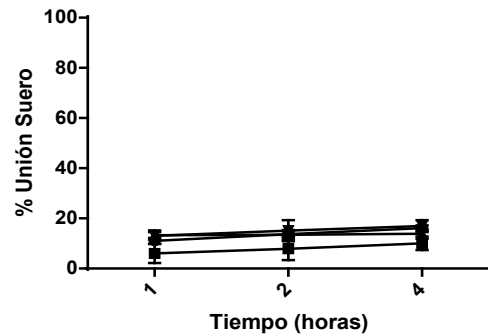
Log P	Tricina	Tricina/AN	Tricina/EDDA	EDDA
	-2.58	-2.82	-1.95	-1,16

Figura 13. Estudio del coeficiente de reparto (Log P) de ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/co-ligandos.



- ▼ ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/EDDA-LHRH
- ▲ ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina/EDDA-LHRH
- ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina/NA-LHRH
- ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina-LHRH

Figura 14. Estudios de estabilidad *in vitro* en PBS para los radioconjugados obtenidos. (% PRQ: % pureza radioquímica).



- ▼ ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/EDDA-LHRH
- ▲ ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina/EDDA-LHRH
- ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina/NA-LHRH
- ^{99m}Tc -HYNIC-GSG/Tricina-LHRH

Figura 15. Estudios de estabilidad *in vitro* en SFB para los radioconjugados obtenidos.

concentraciones diferentes de L-Cisteína (figura 16). Se realizó únicamente con el complejo marcado con Tricina/AN debido a que fue el que presentó mayor estabilidad tanto en PBS como en SFB.

A una hora de incubación a 37 °C con las distintas concentraciones de L Cisteína, se observó que el complejo marcado empleando la mezcla de co-ligandos Tricina/AN presentó la mayor estabilidad, PRQ de $100,00 \pm 0,50\%$, $100,00 \pm 0,84\%$ y $100,00 \pm 1,24\%$ en 0,1 mM, 1,0 mM y 10,0 mM de L Cisteína, respectivamente. A las 3 hs. de incubación, en

las mismas condiciones, se observó que el complejo marcado permanece estable, observando PRQ de $100,00 \pm 2,85\%$, $100,00 \pm 2,30\%$ y $100,00 \pm 1,68\%$ en 0,1 mM, 1,0 mM y 10,0 mM de L Cisteína, respectivamente. A 24 hs. de incubación se observó una significativa inestabilidad del complejo peptídico radiomarcado, disminuyendo a $93,00 \pm 2,30\%$, $85,00 \pm 1,65\%$ y $76,00 \pm 0,65\%$ en 0,1 mM, 1,0 mM y 10,0 mM de L Cisteína, respectivamente.

Los datos de los estudios de estabilidad demostraron que el complejo marcado empleando mezcla de co-ligandos Tricina/AN presenta la mayor PRQ

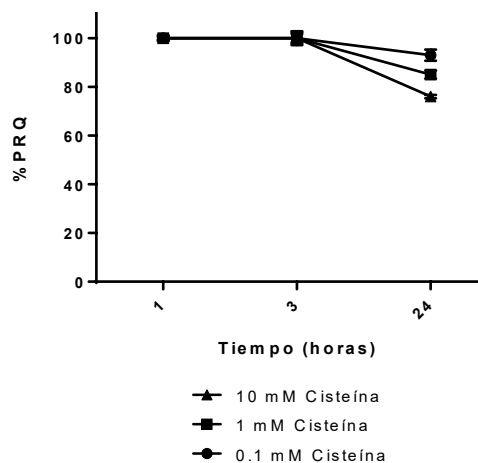


Figura 16. Estudios de estabilidad *in vitro* en L-Cisteína empleando la mezcla de coligandos Tricina/AN.

y estabilidad. Es por lo anterior, que tanto los ensayos biológicos *in vitro* como *in vivo*, para evaluar el péptido radiomarcado fueron analizados empleando dicha mezcla de co-ligandos.

7. Estudios biológicos *in vitro* de unión celular

Los estudios *in vitro* de unión y de bloqueo mediante la incubación de $^{99m}\text{TcHYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN}$ en las líneas PC3, Du-145, LnCap (cáncer de próstata humano) y MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-435 (cáncer de mama humana) se realizaron para evaluar la afinidad de la unión específica del conjugado $^{99m}\text{Tc-HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN}$ al LHRH-R.

En la línea empleada como control, la NIH-3T3, se observó tanto una unión como internalización despreciable del complejo radiomarcado. Presentando una unión de $0,46 \pm 0,23\%$, $0,14 \pm 0,02\%$, $0,15 \pm 0,04\%$, $0,10 \pm 0,016\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min. respectivamente (figuras 17 y 18, abajo); mientras que una internalización de $0,16 \pm 0,03\%$, $0,10 \pm 0,01\%$, $0,11 \pm 0,01\%$, $0,11 \pm 0,02\%$ a los mismos tiempos ensayados (figuras 17 y 18, arriba).

Los estudios de unión *in vitro* llevados a cabo en las líneas celulares PC3, Du-145 y LnCap revelaron la efectiva unión e internalización del complejo radiomarcado. En la línea PC3, se observó una unión específica de $10,65 \pm 2,13\%$, $7,28 \pm 2,3\%$, $5,56 \pm 1,21\%$ y $3,77 \pm 0,43\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectiv-

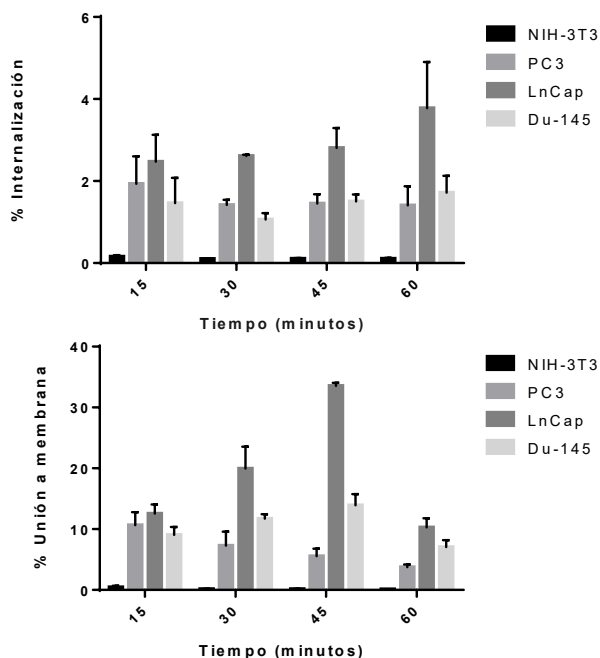


Figura 17: Porcentaje de Internalización (arriba) y unión a membrana (abajo) del complejo $^{99m}\text{TcHYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN}$ en las líneas NIH-3T3, PC3, Du-145 y LnCap (próstata).

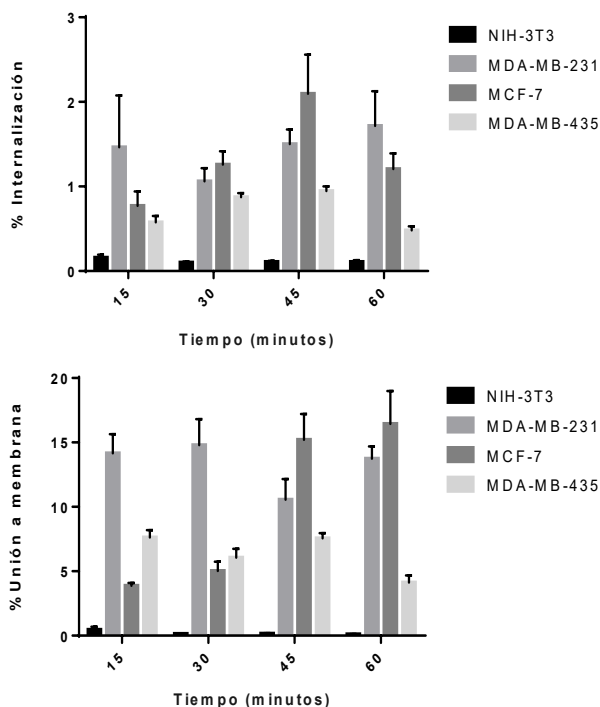


Figura 18: Porcentaje de Internalización (arriba) y unión a membrana (abajo) del complejo $^{99m}\text{TcHYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN}$ en las líneas NIH-3T3, MDA-MB-231, MCF-7 y MDA-MB-435 (mama).

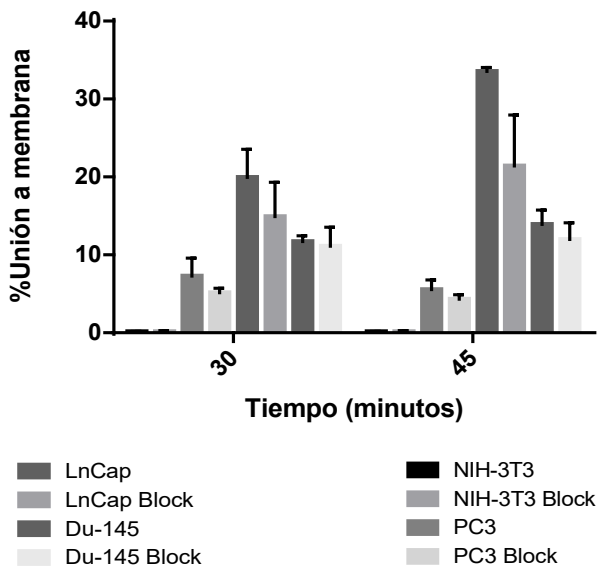


Figura 19: Porcentaje de unión a membrana y bloqueo de célula NIH-3T3, PC3, LnCap y Du-145 (próstata).

amente; mientras que la internalización fue de $1,93 \pm 0,66\%$, $1,47 \pm 0,12\%$, $1,45 \pm 0,23\%$ y $1,46 \pm 0,46\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

En la línea celular LnCap, la unión fue de $12,54 \pm 1,51\%$, $19,95 \pm 3,60\%$, $33,54 \pm 0,51\%$ y $10,27 \pm 1,53\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min. respectivamente; mientras que presentó una internalización de $2,47 \pm 0,65\%$, $2,61 \pm 0,03\%$, $2,80 \pm 0,45\%$ y $3,78 \pm 1,12\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

Por último, en la línea celular Du-145, la unión fue de $9,04 \pm 1,29\%$, $11,73 \pm 0,72\%$, $13,93 \pm 1,84\%$ y $7,06 \pm 1,10\%$; mientras que presentó una internalización de $1,46 \pm 0,61\%$, $1,06 \pm 0,15\%$, $1,50 \pm 0,17\%$ y $1,72 \pm 0,41\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

Los estudios de unión *in vitro* llevados a cabo en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-435 revelaron la efectiva unión e internalización del complejo radiomarcado.

En la línea MCF-7, se observó una unión específica de $3,88 \pm 0,21\%$, $5,03 \pm 0,72\%$, $15,21 \pm 1,99\%$ y $16,44 \pm 2,55\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente; mientras que la internalización fue de $0,77 \pm 0,17\%$, $1,26 \pm 0,16\%$, $2,09 \pm 0,46\%$ y $1,20 \pm 0,18\%$ y $1,46 \pm$

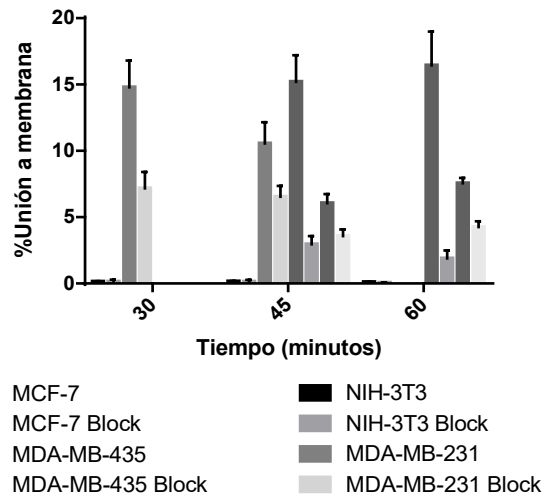


Figura 20: Porcentaje de unión a membrana y bloqueo de célula NIH-3T3, MDA-MB-231 y MCF-7 y MDA-MB-435 (mama).

$0,46\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

En la línea celular MDA-MB-231, la unión fue de $14,16 \pm 1,48\%$, $14,79 \pm 2,02\%$, $10,56 \pm 1,59\%$ y $13,74 \pm 0,96\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente; mientras que presentó una internalización de $1,46 \pm 0,61\%$, $1,06 \pm 0,15\%$, $1,50 \pm 0,17\%$, $1,72 \pm 0,4\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

Por último, en la línea celular MDA-MB-435, la unión fue de $7,63 \pm 0,56\%$, $6,06 \pm 0,69\%$, $7,55 \pm 0,40\%$ y $4,12 \pm 0,55\%$; mientras que presentó una internalización de $0,55 \pm 0,07\%$, $0,87 \pm 0,05\%$, $0,95 \pm 0,06\%$ y $0,48 \pm 0,05\%$ a los 15, 30, 45 y 60 min., respectivamente.

Se observó que al emplear $20 \mu\text{g}$ de HYNIC-GSG-LHRH sin marcar previamente a la adhesión del complejo del péptido radiomarcado, presentó una inhibición del $27,46\%$ y $17,92\%$ en la línea PC3, a los 30 y 45 minutos respectivamente. La línea LnCap presentó bloques de $25,23\%$ y $36,16\%$ en los dos tiempos evaluados (30 y 45 minutos respectivamente), mientras que en la línea DU-145 presentó una inhibición de la unión de $5,26\%$ y $13,9\%$ en los dos tiempos evaluados (30 y 45 minutos respectivamente) (figura 19).

Por su parte, en la línea MDA-MB-231 se observó una inhibición del $51,45\%$ y $38,00\%$ en los dos tiempos

evaluados (30 y 45 minutos respectivamente); la línea celular MCF-7 presentó una inhibición del 80,61% y 88,46% en los dos tiempos evaluados (45 y 60 minutos respectivamente). Por último, la línea MDA-MB-435 presentó una inhibición del 33,91% y 43,73% a los 45 y 60 minutos respectivamente (figura 20).

Esto demuestra la especificidad de la unión del radioconjugado al LHRH-R en todas líneas celulares de cáncer de próstata y mama humano ensayadas.

8. Estabilidad biológica *in vivo*: estudios de biodistribución

La evaluación biológica *in vivo* del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución en ratones Balb/C normales. Las biodistribuciones fueron realizadas luego de 0,5, 1 y 2 hs. (n=4) (figuras 21 y 22). La eliminación de ^{99m}Tc -HYNIC-LHRH/Tricina/AN fue muy rápida, observándose un $64,89 \pm 3,54\%$ Act, $73,38 \pm 7,84\%$ Act, $88,20 \pm 2,01\%$ Act y $73,02 \pm 7,52\%$ Act en vejiga a 0,5, 1, 2 y 24 hs., respectivamente. A su vez se observó una retención inespecífica en riñones e hígado. La captación en el resto de órganos normales fue < de 2% Act/g.

DISCUSIÓN

Pudimos realizar un estudio preliminar del decapepéptido LHRH como futuro agente diagnóstico en cáncer de mama y próstata, por medio de la modificación empleando un linker GSG y la conjugación con el agente bifuncional HYNIC, pudiendo marcar de forma óptima con el radionucleido ^{99m}Tc .

Según el uso del coligando se lograron variadas actividades específicas, todas superiores al 70%. Como evaluación pre-clínica, realizamos estudios *in vitro* de estabilidad, unión a proteínas y lipofilidad a modo de predecir la posible distribución en el organismo. El estudio de pureza radioquímica de los cuatro conjugados y su subsiguiente purificación por HPLC permitió detectar la presencia de los conjugados marcados con ^{99m}Tc de forma eficiente. En algunos casos se observó la presencia de más de un pico, pudiendo

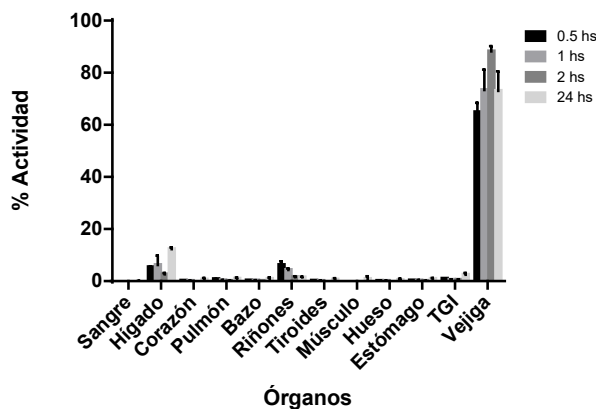


Figura 21: Estudio de biodistribución en ratones Balb/C normales a 0,5, 1, 2 y 4 h p.i. de ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN. % Actividad (% Act) (n=4, % Act \pm DS).

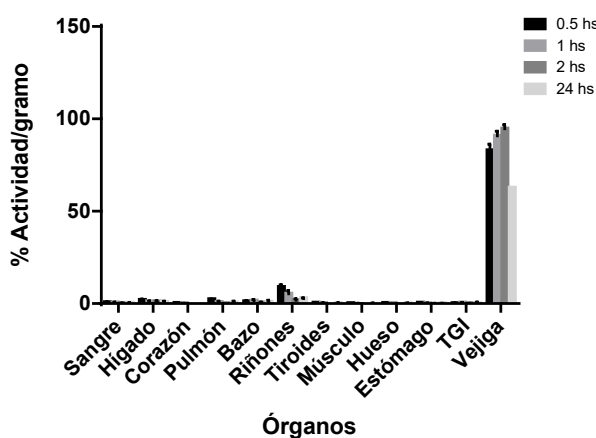


Figura 22: Estudio de biodistribución en ratones Balb/C normales a 0,5, 1, 2 y 4 h p.i. de ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN. % Actividad/gramo (% Act/g) (n=4, % Act/g \pm DS). TGI: Tracto gastrointestinal.

esto ser debido a la generación de diferentes isómeros formados o formas de conjugación del HYNIC. Las mayores puridades radioquímicas se lograron al utilizar Tricina y Tricina/AN como co-ligandos; estos también mostraron ser los más hidrofílicos (coeficiente de reparto) y los que presentan mayor estabilidad, tanto en PBS como en SFB 37 °C hasta 4 horas. El que mayor estabilidad presenta de estos dos es el complejo que utiliza Tricina/AN, por lo cual evaluamos la estabilidad de este hasta 24 hs. con distintas cantidades de L-Cisteína, logrando buenos resultados aún a concentraciones de 10 mM de cisteína.

Debido a lo anterior el conjugado ^{99m}Tc HYNIC-GSG-



LHRH/Tricina/AN fue el seleccionado para llevar a cabo los estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Los estudios biológicos *in vitro* en las líneas celulares de próstata y mama, así como en la línea NIH-3T3 de fibroblastos normales (control negativo) se realizaron para evaluar la afinidad de unión del conjugado ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN al LHRH-R. Se observó que el complejo radiomarcado presentó una moderada a elevada unión en todas las líneas evaluadas (5-20%) en comparación con la línea control (< 0.5%). Se observó a su vez una inhibición > 50% en la mayoría de las líneas al emplear el péptido sin marcar, lo que indica la especificidad de la unión del radioconjugado al LHRH-R expresado por las líneas celulares. Por último se verificó la efectiva estabilidad observada del conjugado ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN mediante estudios de biodistribución en ratones Balb/C normales, revelando un perfil de biodistribución muy adecuado para el desarrollo de un agente de imagen diagnóstico, con elevada eliminación renal y baja retención inespecífica a nivel renal (más del 60% las 0,5 hs. p.i.), la cual nos alentaría a realizar futuras imágenes moleculares en modelos murinos portadores de tumores de mama u próstata inducidos.

CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio logramos llevar a cabo la optimización de la marcación con ^{99m}Tc del conjugado HYNIC-GSG-LHRH de forma fácil, rápida y sencilla. Se encontró que el complejo ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN presenta la > PRQ y estabilidad de todos los ensayos realizados, no requiriendo una posterior purificación. ^{99m}Tc -HYNIC-GSG-LHRH/Tricina/AN radiomarcado por este método reveló una adecuada afinidad de unión por su receptor en modelos *in vitro* de cáncer de mama y próstata, como también presentó un perfil de eliminación ideal, representando de esta forma un prometedor agente de imagen molecular para el diagnóstico de la expresión del receptor de LHRH oncológico. A futuro pretendemos realizar estudios imagenológicos en modelos tumorales de cáncer de mama y próstata.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay), a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y al programa PE-DECIBA-Química. No existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- (1) World Health Organization [base de datos en internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory; 2018 [fecha de acceso 19 ene 2018]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>.
- (2) Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer. Montevideo; 2018 [actualizada enero 2018; fecha de acceso 5 ene 2018]. Disponible en: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html.
- (3) Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Cáncer de mama en Uruguay. Montevideo, 2018 [actualizada ene 2018; fecha de acceso 5 ene 2018]. Disponible en: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_517_1.html.
- (4) World Health Organization [base de datos en internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory; 2018 [fecha de acceso 19 ene 2018]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
- (5) Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Cáncer en Uruguay 2010-2014, principales sitios (ordenados por incidencia). Montevideo, 2018 [actualizada ene 2018; fecha de acceso 5 feb 2018]. Disponible en: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_209_1.html.
- (6) Weissleder R, Mahmood U. Mol Imag Radiol 2001; 219(2):316-33.
- (7) Nichol C, Kim EE. Molecular imaging and gene therapy. J Nuc Med 2001; 42(9):1368-1374.
- (8) Reilly RM, Sandhu J, Alvarez-Diez TM, Gallinger S, Kirsh J, Stern H. Problems of Delivery of Monoclonal Antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. Clinical Pharmacokinetics 1995; 28(2):126-142.

- (9) Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004; 9(12):525-529.
- (10) Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 1994; 15(4):462-499.
- (11) Schally AV. Hypothalamic hormones: from neuroendocrinology to cancer therapy. *Anticancer Drugs* 1994; 5(2):115-130.
- (12) Gründker C, Völker P, Griesinger F, Ramsawamy A, Nagay A, Schally AV, et al. Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(3):528-537.
- (13) Chen A, Kaganovsky E, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Okon E, Koch Y. Two Forms of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Are Expressed in Human Breast Tissue and Overexpressed in Breast Cancer: A Putative Mechanism for the Antiproliferative Effect of GnRH by Down-Regulation of Acidic Ribosomal Phosphoproteins P1 and P2. *Cancer Res* 2002; 62(4):1036-1044.
- (14) Schally A, Comaru-Schally AM. Hypothalamic and other peptide hormones. En: Frei BR, Kufe E, Morton DE, Weischelbaum DL, et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Chapter 61. 6a. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.
- (15) Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22(4):248-91.
- (16) Fekete M, Wittliff JL, Schally AV. Characteristics and Distribution of Receptors for [D-TRP6]-Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, Somatostatin, Epidermal Growth Factor, and Sex Steroids in 500 Biopsy Samples of Human Breast Cancer. *J Clin Lab Anal* 1989; 3(3):137-147.
- (17) Ben-Yehudah A, Lorberboum-Galski H. Targeted cancer therapy with gonadotropin-releasing hormone chimeric proteins. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4(1):151-161.
- (18) Pati D, Habibi HR. Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinol* 1995; 136(1):75-84.
- (19) Krebs LJ, Wang X, Nagy A, Schally AV, Prasad PN, Liebow C. A conjugate of doxorubicin and an analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone shows increased efficacy against oral and laryngeal cancers. *Oral Oncology* 2002; 38(7):657-663.
- (20) Van Groeninghen JC, Kiesel L, Winkler D, Zwirner M. Effects of luteinising-hormone-releasing hormone on nervous-system tumours. *Lancet* 1998; 352(9125):372-373.
- (21) Moretti RM, Montagnani Marelli M, Van Groeninghen JC, Limota P. Locally Expressed LHRH Receptors Mediate the Oncostatic and Antimetastatic Activity of LHRH Agonists on Melanoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3791-3797.
- (22) Friess H, Büchler M, Kiesel L, Krüger M, Beger HG. LH-RH receptors in the human pancreas. *Int J Pancreatol* 1991; 10(2):151-159.
- (23) Sion-Vardi N, Kaneti J, Segal-Abramson T, Giat J, Levy J, Sharoni Y. Gonadotropin-releasing hormone specific binding sites in normal and malignant renal tissue. *J Urol* 1992; 148(5):1568-1570.
- (24) Liu SV, Tasao-Wei DD, Xiong S, Groshen S, Dorff TB, Quinn DI, et al. Phase I, dose-escalation study of the targeted cytotoxic LHRH analog AEZS-108 in patients with castration- and taxane-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24):6277-83.
- (25) Engel JB, Schally AV, Dietl J, Rieger L, Hönig A. Targeted therapy of breast and gynecological cancers with cytotoxic analogues of peptide hormones. *Mol Pharm* 2007; 4(5):625-658.



- (26) Meszaros LK, Dose A, Biagini SCG, Blower PJ. Synthesis and evaluation of analogues of HYNIC as bifunctional chelators for technetium. *Dalton Transactions* 2011; 40(23):6260-6267.
- (27) Abrams MJ, Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. *Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats*. *J Nucl Medicine* 1990; 31(12):2022-2028.
- (28) Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev* 1993; 93(3):1137-56.
- (29) Dilworth JR, Parrott JS. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem Soc Rev* 1998; 27(1):43-55.
- (30) Camacho X, Machado CL, García MF, Fernández M, Oddone N, Benech J. Tocilizumab labeling with ^{99m}Tc via HYNIC as a molecular diagnostic agent for Multiple Myeloma. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(9):1267-1277.
- (31) Camacho X, Machado CL, García MF, Gambini JP, Bancho A, Fernández M, et al. Technetium-99m- or Cy7-Labeled Rituximab as an Imaging Agent for Non-Hodgkin Lymphoma. *Oncology* 2017; 15(92):229-42.
- (32) Calzada V, García MF, Alonso-Martínez LM, Camacho X, Goicochea E, Fernández M, et al. Fab(nimotuzumab)-HYNIC-^{99m}Tc: Antibody fragmentation for molecular imaging agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2016; 16(9):1184-9.
- (33) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Alonso O, Gambini JP, et al. ^{99m}Tc-labeled Bevacizumab via HYNIC for Imaging of Melanoma. *J Anal Oncology* 2014; 3:53-64.
- (34) García MF, Calzada V, Camacho X, Goicochea E, Gambini JP, Quinn TP, et al. Microwave-assisted Synthesis of HYNIC Protected Analogue for ^{99m}Tc Labeled Antibody. *Curr Radiopharm* 2014; 7(2):84-90.
- (35) Hnatowich J, Virzi F, Fogarasi M, Rusckowski M, Winnard P Jr. Can a cysteine challenge assay predict the in vivo behavior of ^{99m}Tc-labeled antibodies? *Nucl Med Biol* 1994; 21(8):1035-44.