



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Ciencias de la Conducta

**“Radiofármacos oncoteranósticos inhibidores de  
PSMA dirigidos a la medicina nuclear traslacional”**

**TESIS**

Para Obtener el Grado de  
Doctor(a) en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. ALONDRA ESCUDERO CASTELLANOS

No. de cuenta 0724823

Comité Tutorial

DRA. KEILA ISAAC OLIVÉ

Tutor Académico

DR. ENRIQUE MORALES ÁVILA

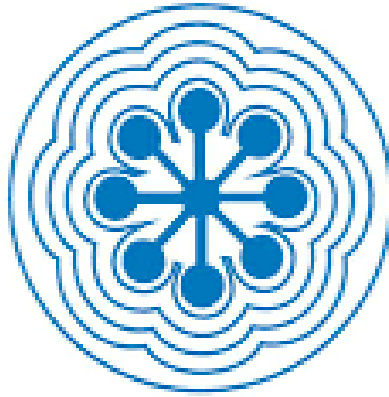
Tutor Interno

DRA. BLANCA ELÍ OCAMPO GARCÍA

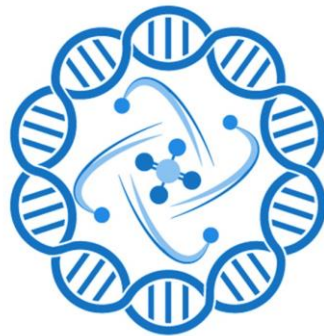
Tutor Externo



Toluca, Estado de México, febrero de 2020



**ININ**



**LANIDER**  
Laboratorio Nacional de Investigación y  
Desarrollo de Radiofármacos

El presente trabajo de tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) adscrito a la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Departamento de Materiales Radiactivos en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), México. Se realizó con financiamiento del proyecto CONACyT-A1-S-38087.

## ~AGRADECIMIENTOS~

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*) por el apoyo brindado como becaria en el programa de Becas Nacionales y el financiamiento para la realización de este trabajo, a través del proyecto CONACyT-A1-S-38087

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (*COMECYT*) por el apoyo para divulgación científica en un congreso, una estancia y apoyo a titulación.

A mi universidad, la *UAEMex* (Universidad Autónoma del Estado de México), por el soporte institucional otorgado para la realización de este proyecto y el soporte en el programa del Doctorado en Ciencias de la Salud. A mis profesores de esta institución, por sus valiosas correcciones y consejos.

Al *LANIDER* (Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos) por el soporte en la disponibilidad de equipos para la realización de este proyecto.

Al *ININ* por el soporte institucional otorgado para la realización de este trabajo.

Al *INCAN* (Instituto Nacional de Cancerología) por permitirme la obtención de imágenes moleculares preclínicas micro-SPECT/CT en la Unidad de Investigación Biomédica en cáncer INCAN/UNAM a cargo del Dr. Luis Medina.

Al *Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán* por la colaboración para la caracterización de receptores celulares en el Departamento de Biología de la Reproducción a cargo de la Dra. Lorenza Díaz.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Planteamiento del Problema</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
<b>5. Objetivos: General y Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>6. Diseño metodológico</b> .....	<b>28</b>
6.1 Diseño de estudio.....	28
6.2 Procedimientos.....	28
6.3 Análisis de datos.....	28
6.4 Aspecto ético.....	34
<b>7. Resultados</b> .....	<b>35</b>
7.1 Artículo aceptado .....	35
7.1.1 Título del artículo aceptado.....	35
Artículo Original. “Preparation and <i>in vitro</i> evaluation of <sup>177</sup> Lu-iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical”	
7.1.2 Página frontal del manuscrito.....	36
7.1.3 Artículo publicado.....	37
7.1.4 Resumen .....	38
7.1.5 Apartados del artículo .....	39
7.2 Artículo enviado.....	<b>53</b>
7.2.1 Título del artículo enviado .....	<b>53</b>
7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo .....	<b>54</b>
7.2.3 Artículo publicado.....	<b>55</b>
7.2.4 Resumen.....	<b>56</b>
7.2.5 Apartados del artículo .....	<b>57</b>
<b>8. Resultados adicionales en su caso</b> .....	<b>82</b>
<b>9. Discusión general</b> .....	<b>84</b>
<b>10. Conclusiones generales</b> .....	<b>88</b>
<b>11. Referencias</b> .....	<b>89</b>
<b>12. Anexos</b> .....	<b>96</b>
12.1. Anexo 1. Cronograma .....	96
12.2 Productos de la investigación .....	97

**Resumen:**

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) se expresa normalmente en células epiteliales de la próstata, pero se sobreexpresa en el 95% de los cánceres de próstata metastásicos (mPCa). Es por eso que PSMA es un apropiado objetivo molecular para la obtención de imágenes y radioterapia de mPCa utilizando radiofármacos específicos.

Por otro lado, los radiopéptidos basados en la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) muestran una alta afinidad y selectividad por las integrinas  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$ . Como resultado, estos péptidos son útiles para unirse a tumores debido a la sobreexpresión de integrinas en la neovascularización tumoral. De forma similar, el péptido bombesina (BN) posee alta expresión en etapas tempranas del cáncer prostático (PCa), el cual se une específicamente al receptor de péptido liberador de gastrina (GRPr), que es sobreexpresado en el 84% del PCa humano. GRPr es clínicamente relevante debido a su alta expresión en etapas de PCa temprano.

Los tumores humanos muestran heterogeneidad intrínseca y cambios en el fenotipo durante la progresión de la enfermedad, lo que implica diferentes niveles de expresión de los receptores de la superficie celular. La investigación sobre nuevos productos farmacéuticos heterodiméricos radiomarcados con Lu-177 que interactúen con dos blancos moleculares diferentes en células tumorales es una estrategia para mejorar el rendimiento radioterapéutico. Este estudio tuvo como objetivo sintetizar y caracterizar dos nuevos radiofármacos heterobivalentes, el  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD y el  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, así como evaluar su potencial para enlazarse a células cancerosas que sobreexpresan PSMA, integrinas  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$  y GRPr, respectivamente. Los radiofármacos fueron preparados con una pureza radioquímica >98%, demostrando alta estabilidad en suero humano, reconocimiento específico con afinidad adecuada hacia los receptores correspondientes, así como capacidad para inhibir la proliferación de células cancerosas. En el caso de la presencia del péptido RGD, se demostró la capacidad para inhibir la señalización de VEGF (efecto antiangiogénico). En el caso de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN se observó una alta captación tumoral *in vivo* por las células LNCaP y PC3. Las imágenes de micro-SPECT/CT demostraron la capacidad del heterodímero para dirigirse a los tumores, sin aumentar la captación de forma significativa, comparado con sus monómeros, pero siendo captado por los distintos fenotipos de tumores y por lo tanto en las diferentes etapas del cáncer. Los resultados obtenidos justifican realizar estudios preclínicos adicionales para establecer la eficacia terapéutica de los radiofármacos heterodiméricos.

**Abstract:**

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is normally expressed in epithelial cells of the prostate, but is overexpressed in 95% of metastatic prostate cancers (mPCa). That is why PSMA is an appropriate molecular target for imaging and radiotherapy of mPCa using specific radiopharmaceuticals.

Radiopeptides based on the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence show high affinity and selectivity for integrins  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$ . As a result, these peptides are useful for binding tumors due to overexpression of integrins in the malignant neovasculature. Similarly, the bombesin peptide (BN) has high expression in early stages of prostate cancer (PCa), which specifically binds to the gastrin-releasing peptide receptor (GRPr), which is overexpressed in 84% of human PCa. GRPr is clinically relevant due to its high expression in early PCa stages.

Human tumors show intrinsic heterogeneity and changes in the phenotype during disease progression, which implies different levels of cell surface receptor expression. Research on new radiolabeled heterodimeric pharmaceutical products with Lu-177 that interact with two different molecular targets in tumor cells is a strategy to improve radiotherapeutic performance.

This study aimed to synthesize and characterize two new heterobivalent radiopharmaceuticals, the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD and the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, as well as assessing its potential of binding to cancer cells that overexpress PSMA, integrins  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$  and GRPr, respectively. The radiotracers were prepared with a radiochemical purity >98%, demonstrating high stability in human serum, specific recognition with adequate affinity for the corresponding receptors, as well as the ability to inhibit the proliferation of cancer cells. In the case of the presence of the RGD peptide, ability to inhibit VEGF signaling (antiangiogenic effect). In the case of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, a high tumor uptake by LNCaP and PC3 cells was shown *in vivo*. Micro-SPECT/CT images demonstrated the ability of the heterodimer to target tumors, without significantly increasing uptake compared to their monomers, but being captured by different tumor phenotypes and therefore at different stages of cancer. The results obtained justify additional preclinical studies to establish the therapeutic efficacy of heterodimeric radiopharmaceuticals.

## **Introducción:**

La expresión “investigación traslacional” se refiere al traslado de los conocimientos de la investigación básica al desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades. Los radiofármacos de blancos moleculares son únicos en su capacidad para detectar sitios bioquímicos específicos tales como los receptores y las enzimas. Estos actúan como un simple dispositivo médico que transporta al radionúclido a un blanco molecular específico, donde la energía de radiación depositada es altamente selectiva para eliminar a las células malignas. En particular, los radiofármacos de lutecio-177 con reconocimiento molecular específico, se han propuesto como una nueva clase de radiofármacos teranósticos debido a las propiedades terapéuticas (emisión  $\beta^-$  máxima de 497 keV) y diagnósticas (emisión  $\gamma$  de 113 y 208 keV, para imagen nuclear) del radionúclido. El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más común en hombres en todo el mundo. La principal causa de muerte en pacientes con CaP es la progresión a la independencia de andrógenos, ya que existen lesiones con alta heterogeneidad en la expresión de receptores, o incluso pérdida total o parcial de la expresión de ciertos receptores (p. ejemplo: PSMA). Es por esto que los radiofármacos basados en moléculas heterodiméricas (que pueden unirse a más de un receptor) pueden incrementar sinérgicamente la afinidad de unión al blanco molecular específico. Por lo tanto, cualquier avance en el aumento de la sensibilidad de los radiofármacos para la detección de las células cancerosas puede incrementar la significancia clínica y de diagnóstico.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Radiofármacos e investigación traslacional.

En la industria farmacéutica, la expresión “investigación traslacional” se refiere al traslado de los conocimientos de la investigación básica al desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades. Estos estudios tienen carácter preliminar y preceden a los ensayos clínicos a gran escala, propios de la investigación aplicada y de la etapa final de la investigación para el registro y comercialización de un fármaco. La investigación traslacional es una investigación básica aplicada a las primeras fases del desarrollo de un fármaco, cuya finalidad es conseguir que los descubrimientos de las ciencias básicas redunden en beneficio de los pacientes [1].

Un radiofármaco es una molécula orgánica que contiene en su estructura átomos radiactivos y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada a seres humanos para el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades [2]. Los radiofármacos de blancos moleculares son únicos en su capacidad para detectar sitios bioquímicos específicos tales como los receptores y las enzimas. Las imágenes nucleares moleculares, a menudo identifican anomalías en etapas muy tempranas en la progresión de una enfermedad. La medicina nuclear cuenta con aplicaciones terapéuticas importantes. La referencia a radiofármacos terapéuticos no implica un efecto farmacológico, ya que la molécula acarreadora del radionúclido (ej. anticuerpo, péptido, oligonucleótido, aptámero, etc.) se administra a una concentración muy baja (traza) de forma que no perturbe el sistema bioquímico, actuando como un simple dispositivo médico que transporta al radionúclido a un blanco molecular específico, donde la energía de radiación depositada es altamente selectiva para eliminar a las células malignas. De hecho, a los radiofármacos aplica el concepto de “microdosis”, el cual se define como 1/100 de la dosis requerida para producir un efecto farmacológico, ya que por lo general también se aplican por ocasión única. Los fármacos aplicados bajo el concepto de “microdosis” no requieren de estudios de genotoxicidad antes de ser aplicados a pacientes [3-5].

En particular, los radiofármacos de lutecio-177 con reconocimiento molecular específico, se han propuesto como una nueva clase de radiofármacos teranósticos debido a las propiedades terapéuticas (emisión  $\beta^-$  máxima de 497 keV) y diagnósticas (emisión  $\gamma$  de 113 y 208 keV, para imagen nuclear) del radionúclido [6].



## 1.2 Radiofármacos como tratamiento para el cáncer de próstata.

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más común en hombres en todo el mundo [7]. En los pacientes con CaP localizado, la tasa de supervivencia a cinco años se aproxima al 100%; sin embargo, en los pacientes con metástasis, la tasa de supervivencia a los cinco años es de 31% [8]. Casi todos los pacientes con metástasis responden inicialmente bien a los tratamientos anti-andrógenos. Sin embargo, la principal causa de muerte en pacientes con CaP es la progresión a la independencia de andrógenos [9].

Considerando el aumento de la esperanza de vida, se espera que la incidencia de CaP aumente en el futuro, además un mayor número de casos son detectados debido a los constantes avances en su diagnóstico. El aumento mundial de letalidad por CaP, va de 156.000 en 1990 a 256.000 en 2010 [10].

El diagnóstico inicial para CaP consiste actualmente en la cuantificación del antígeno prostático específico (PSA) en suero y biopsia guiada por ecografía. Las lesiones intraprostáticas pueden ser detectadas y biopsiadas, más directamente con la información adicional derivada de las imágenes de mpMRI (resonancia magnética multiparamétrica). Sin embargo, la mpMRI tiene sus limitaciones ya que presenta hallazgos negativos en el 10% de los pacientes con CaP. En aquellos casos de resultados no concluyentes, el uso adicional de imágenes de PET (tomografía por emisión de positrones) con trazadores específicos para el CaP (como los ligandos de PSMA, antígeno prostático específico de membrana) podría ser de utilidad. Las opciones de tratamiento para el CaP localizado incluyen la vigilancia activa, la prostatectomía radical, la radioterapia u otra terapia focal [10].

Desde hace algunos años se sabe que el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) se expresa en la mayoría de los CaP y representa un blanco molecular ideal para fines diagnósticos y terapéuticos. Recientemente, se han desarrollado algunos radiofármacos de PSMA, entre los que encontramos al PSMA-11 y el PSMA-617. El conjugado PSMA-HBED-CC (PSMA-11), sólo puede usarse para fines de diagnóstico. Sin embargo, pronto se hizo evidente que los inhibidores de PSMA también se pueden utilizar para tratamiento [11]. La primera aplicación terapéutica clínica de un PSMA, se informó en 2014, en pacientes que padecen enfermedad de etapa tardía, usando versiones radioyodadas del inhibidor de PSMA MIP-1095, que fue descrito originalmente por Babich *et al.* en 2009 [12]. Considerando los

resultados del grupo en Heidelberg se comenzó una iniciativa destinada a transformar el trazador de diagnóstico PSMA-11 en la variante terapéutica PSMA-617 se puede radiomarcarse con radiometales trivalentes terapéuticamente relevantes. Utilizando como agente quelante el DOTA, el PSMA-617 se identificó como el mejor candidato para utilizarse en tratamientos [13,14]. En paralelo, también se presentó otro radiofármaco de PSMA, llamado PSMA I&T (imagen y terapia) [10, 15].

El radiofármaco dirigido al PSMA más utilizado actualmente ( $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA-11}$ ) cuenta con algunas limitaciones. Por ejemplo, su tiempo de semivida relativamente baja de 68 minutos y el acceso limitado a sistemas generadores en la rutina clínica. Existen en desarrollo nuevos trazadores que podrían ayudar a superar esas limitaciones y abrir nuevas posibilidades (ej.  $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ ), sin embargo muchos de ellos no han sido aprobados y se necesitan más ensayos [16]. En los últimos años, los diferentes ligandos de PSMA han demostrado relevancia clínica en numerosos entornos, además de señalarse amplios usos que no se limitan al CaP [10].

Actualmente los datos disponibles muestran claramente que PSMA tiene un impacto importante en el diagnóstico de CaP. La terapia sistémica de radioligandos que usan trazadores de PSMA radiomarcados, tienen una gran potencialidad en los entornos de resistencia a los enfoques terapéuticos convencionales. Se espera que los estudios en curso analicen aún más el valor de los trazadores de PSMA en medicina nuclear [10].

### **1.3 Receptores de membrana en células cancerosas.**

Los receptores de membrana son proteínas o glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Son proteínas clave que permiten la comunicación externa con la interna. Los receptores de membrana de células cancerosas, cambian su expresión según el estado del cáncer. Determinados receptores de membrana, encargados principalmente de señalizaciones relacionadas con la supervivencia y proliferación celular, se sobre-expresan en la superficie de la membrana celular. Esto permite que estos receptores sean utilizados como blancos moleculares para su localización, a través de péptidos que puedan reconocer dichos receptores de tal forma que puedan unirse específicamente [17]. Entre los receptores sobre expresados en CaP, encontramos al PSMA, al GRPr y la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

### 1.3.1 PSMA

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es un receptor localizado en la bicapa lipídica de la membrana celular como glicoproteína transmembranal, actuando como una enzima glutamato carboxipeptidasa de tipo II (su porción N-terminal es intracelular). Esta glicoproteína transmembranal de tipo II, tiene funciones de proliferación celular y trasducción de señales en las células epiteliales de la glándula prostática. Se encuentra expresada en células epiteliales de la próstata y altamente sobre-expresada en el 95 % de los cánceres de próstata avanzados. Se ha encontrado expresión en lesiones primarias, metastásicas y adenocarcinomas de próstata, con mayor expresión en estadios avanzados de la enfermedad, además de estar sobreexpresada en la neovasculatura del tumor [18].

Su estructura está compuesta por tres dominios (Fig. 1): 1) un corto dominio citoplasmático NH<sub>2</sub>-terminal (CD) que contiene un grupo de orientación endocítica (A), 2) una región transmembranal hidrofóbica (TM) y 3) un gran dominio extracelular (ED), que se encuentra altamente glicosilado (proteínas destinadas a utilizarse fuera de la célula) con nueve sitios predichos de N-glicosilación (oligosacaridos unidos al grupo amida, -NH<sub>2</sub>, de la asparagina). El ED contiene dos dominios de función desconocida que abarcan los residuos de aminoácidos 44-150 (B) y 151-274 (D), las regiones ricas en prolina y glicina, abarcan los residuos de aminoácidos 145-172 y 249-273, respectivamente (C y E), un dominio catalítico que abarca los residuos de aminoácidos 274-587 donde contiene Zn como su centro activo (F) y un dominio final de función desconocida (aminoácidos 587-750) al que está localizado un dominio de dimerización helicoidal (aminoácidos 601-750) (G) [18].

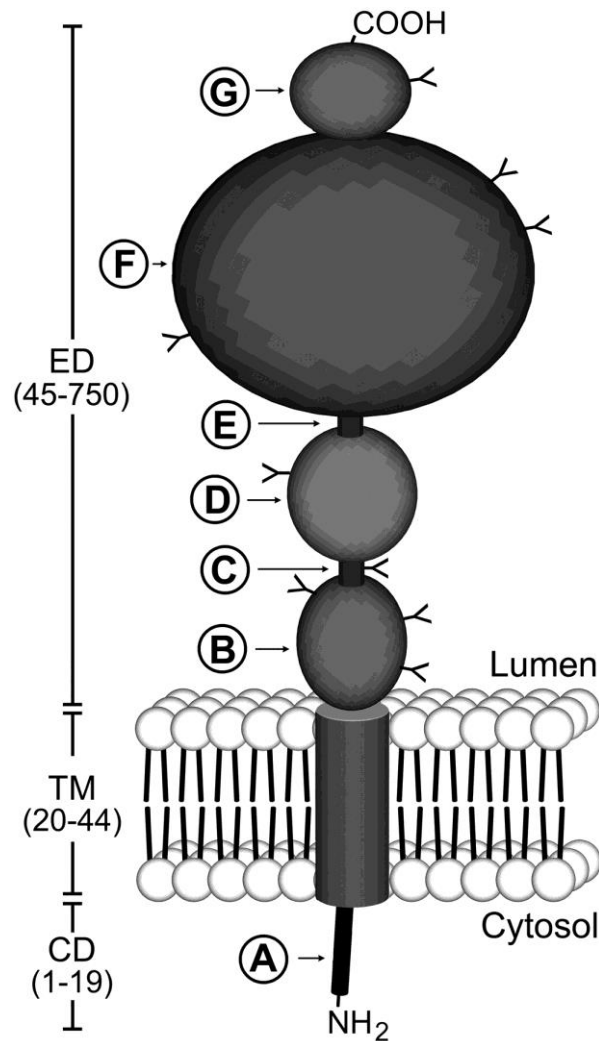


Figura 1. Estructura del antígeno prostático específico de membrana (PSMA), compuesta por tres dominios: un corto dominio citoplasmático NH<sub>2</sub>-terminal (CD), una región transmembranal hidrofóbica (TM), y un gran dominio extracelular (ED) [18].

### 1.3.2 Integrina $\alpha_v\beta_3$ .

Las integrinas son una familia de glicoproteínas transmembranales que facilitan la adhesión de las células con las proteínas de la matriz extracelular. Se encuentran expresadas en bajos niveles en células epiteliales y células endoteliales maduras y altamente expresadas en procesos de inflamación y fibrosis, además de células cancerígenas, su ambiente, en procesos de angiogénesis y metástasis [19,20].

El proceso angiogénico es regulado por receptores de adhesión celular, por lo que estas integrinas se encuentran sobre-expresadas en las células endoteliales activadas en la neovascularización de tumores. Además la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  correlaciona bien con la progresión e invasividad del tumor, ya que las integrinas expresadas en las células tumorales

contribuyen a la progresión y metástasis del tumor aumentando la migración, invasión, proliferación y supervivencia de las células tumorales [21, 22].

Las integrinas conforman una super-familia de glicoproteínas heterodiméricas su estructura está conformada por la unión no covalente de dos cadenas (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ) con funciones de señalización para diversas y específicas respuestas celulares [23]. Un ligando importante para muchas integrinas es la secuencia tripeptídica RGD. Las integrinas con reconocimiento de la secuencia RGD como las  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$  han recibido mayor atención como marcadores terapéuticos debido a su expresión en varios tipos celulares, están sobreexpresadas en tumores sólidos, contribuyen al crecimiento tumoral, diseminación metastásica, diferenciación de células endoteliales y en la angiogénesis [24].

### 1.3.3 GRPr

El receptor del péptido liberador de la gastrina (GRPr) es una glicoproteína de 7 pasos transmembranales acoplada a proteínas G heterotriméricas Existen 4 tipos de receptores diferentes con reconocimiento del péptido bombesina, sin embargo se comprobó que en tumores de próstata el receptor sobre-expresado es el GRPr. Esta glicoproteína transmembranal, estimula la proliferación de las células tumorales y está implicada en la microcirculación tumoral [25].

Se encuentra expresado en células neurales y endocrinas humanas y sobre-expresado en el 84% de CaP, su expresión es más alta en estadios tempranos y más bajo en cáncer de alto grado (contrario a PSMA). Se puede encontrar mayormente en metástasis, en nódulos linfáticos y en lesiones de hueso (52.9%). Este receptor se encuentra altamente expresado en cáncer de próstata, mama, pulmón, cáncer medular de tiroides, melanoma, cáncer gastrointestinal, duodenal, de colon, gastrinomas, algunas neoplasias uterinas y en hipotálamo e hipófisis. Sin embargo existe una expresión masiva de GRPr en tejido prostático que está en un proceso de transformación maligna. Los receptores GRP pueden ser marcadores de cambios moleculares en carcinogénesis prostática y útiles en la diferenciación de hiperplasia de neoplasia prostática [25].

La estructura del GRPr humano es glicosilado en Asn20, palmitoilado en Cys339 y tiene un enlace disulfuro entre Cys113 y Cys196 (Fig.2). Para la unión con su agonista (activa al

receptor), los aminoácidos Gln120, Pro198, Arg287 y Ala307 son esenciales. Además numerosos aminoácidos en o cerca de los dominios (TM) 2, 3, 4, 6 y 7 son esenciales para la unión del agonista. Para la unión con su antagonista (bloquea e inactiva al receptor), los aminoácidos Thr296, Phe301 y Ser304 y los dominios TM 6 y 7 son esenciales para la unión del antagonista [26].

El GRPr es un receptor de 7 pasos transmembranales acoplado a proteínas G heterotriméricas  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{12/13}$ , a nivel molecular, cuando es activado, interactúa con la proteína G causando el cambio de fosfatidilinositol, provocando una actividad incrementada de la proteína quinasa C y elevación del  $Ca^{2+}$  citosólico. El GRPr causa la fosforilación de tirosina de EGFR, ERK, FAK, paxillin, y Src, conduciendo al aumento de la proliferación celular [27].

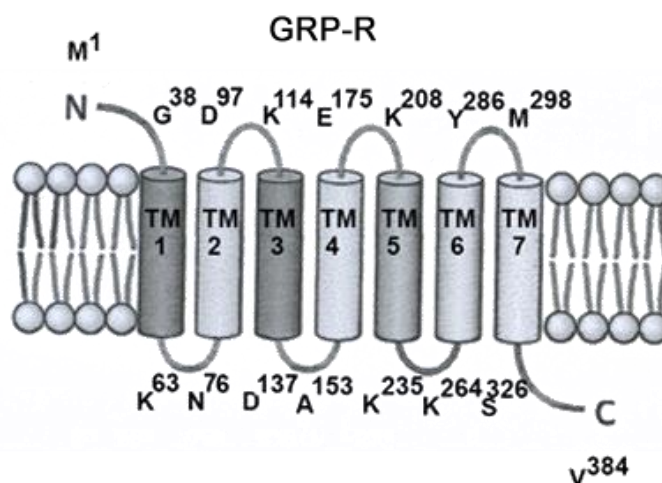


Figura. 2. Estructura del GRPr humano los aminoácidos Gln120, Pro198, Arg287 y Ala307 son esenciales para la unión con su agonista [26]

#### 1.4 Radiofármacos heterodiméricos.

Los radiofármacos heterodiméricos son aquellos radiofármacos que en su estructura contienen dos péptidos enlazantes diferentes que permitan unirse a dos distintos blancos moleculares en una misma molécula radiactiva [28].

Las moléculas heterodiméricas pueden incrementar sinérgicamente las afinidades de unión al blanco, debido a que existen lesiones con alta heterogénea en la expresión de receptores, o incluso pérdida total o parcial de la expresión de ciertos receptores predilectos (p. ejemplo: PSMA). Las lesiones de los tumores, incluso en el mismo paciente, pueden diferir en los niveles de expresión del receptor, los tipos de receptores expresados, el grado de malignidad celular. Sí se considera un solo receptor, pueden existir falsos negativos. Por lo tanto, cualquier avance en el aumento de la sensibilidad de la detección de las células cancerosas puede incrementar la significancia clínica y de diagnóstico, dicho aumento en la sensibilidad puede ser dado por las moléculas heterodiméricas [28,29].

Es así que el diseño, síntesis y evaluación *in vitro* e *in vivo* de nuevos conjugados heterodiméricos del tipo iPSMA-bombesina (Fig. 4) ó iPSMA-RGD (Fig. 5), podría permitir mejorar el reconocimiento específico por las células de cáncer de próstata respecto al monómero iPSMA (Fig.3).

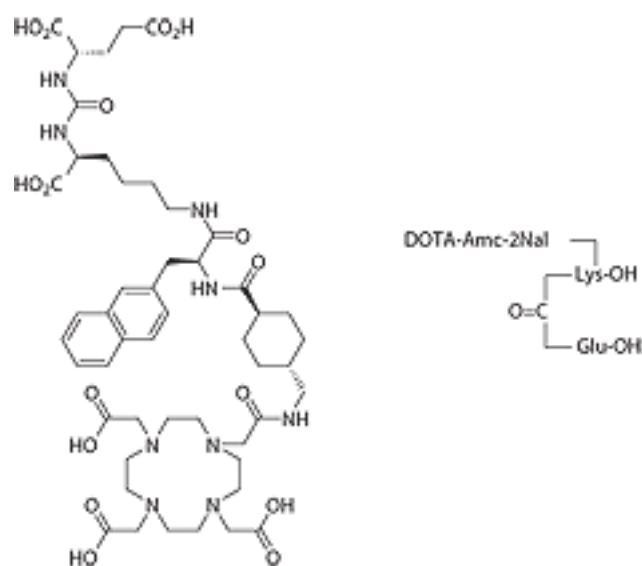


Figura 3. Derivado iPSMA que marcado con Lu-177, mostró una disminución significativa en los niveles del antígeno prostático (PSA) en el 70% de los pacientes con CaP, sin mostrar efectos secundarios severos [30].

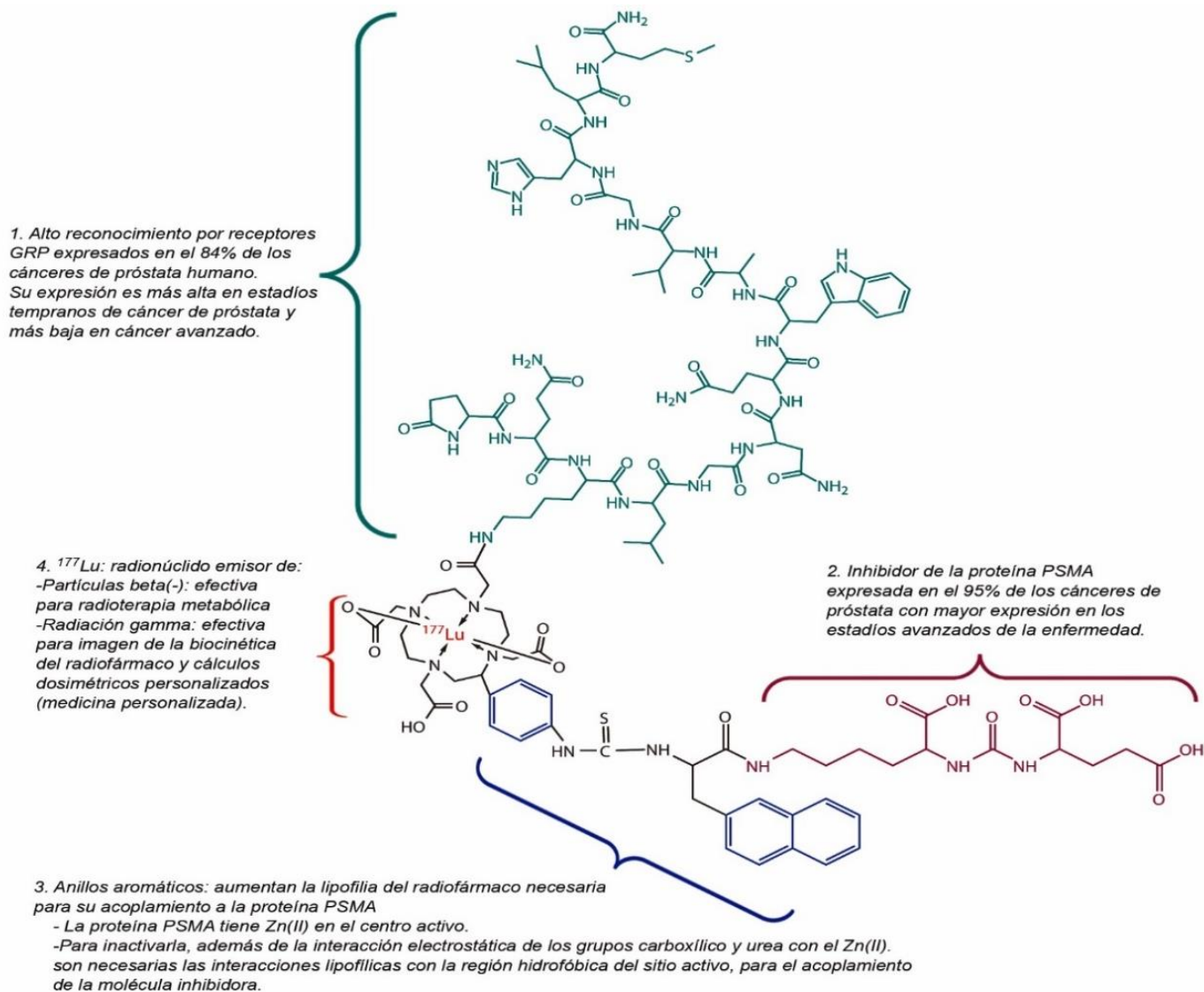


Figura. 4. Nuevo radiofármaco heterodimérico iPSMA-Bombesina. Propuesto para incrementar el reconocimiento específico por las células de cáncer de próstata respecto al monómero iPSMA, así como sus propiedades teranósticas (obtención de imágenes y radioterapia) al marcarlos con  $^{177}\text{Lu}$  para su uso en medicina nuclear traslacional.



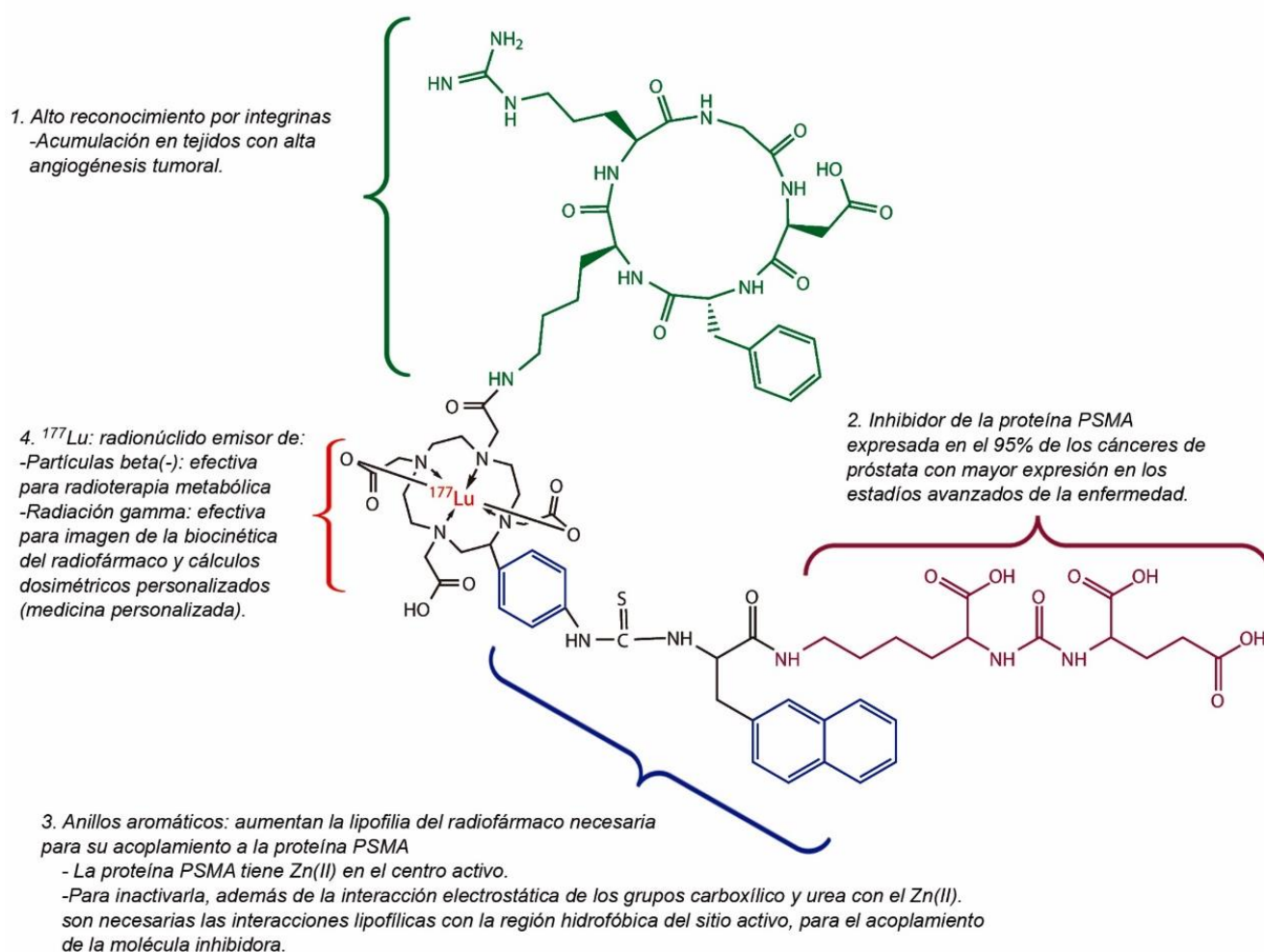


Figura 5. Nuevo radiofármaco heterodimérico iPSMA-RGD. Propuesto para incrementar el reconocimiento específico por las células de cáncer de próstata respecto al monómero iPSMA, así como sus propiedades teranósticas (obtención de imágenes y radioterapia) al marcarlos con  $^{177}\text{Lu}$  para su uso en medicina nuclear traslacional.

## 1.5 iPSMA como péptido ligante del Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA).

La enzima glutamato carboxipeptidasa II, también conocida como antígeno prostático específico de membrana (PSMA), está expresada en las células epiteliales de la próstata y altamente sobre-expresada en el 95% de los cánceres de próstata avanzados. Los niveles de expresión del PSMA se correlacionan directamente a la independencia de andrógenos, la metástasis y a la progresión de CaP [31]. Por lo tanto, el PSMA es un blanco molecular

adecuado para la radioterapia de cáncer de próstata metastásico utilizando radiofármacos específicos. El PSMA tiene mayor expresión en estadios avanzados de la enfermedad.

El iPSMA contiene Zn en el centro activo de la enzima, por lo que la secuencia Glu-NH-CO-NH-Lys( $\beta$ -naftil alanina) = Glu-Urea-Lys(NaI) (iPSMA péptido inhibidor del antígeno prostático específico de membrana), se ha propuesto como un inhibidor efectivo de su actividad (Fig. 1) [32]. En la interacción química específica, los 3 grupos carboxílico del fragmento Glu-Urea-Lys interactúan electrostáticamente con las cadenas laterales peptídicas en el centro activo del iPSMA, el oxígeno de la urea se coordina al Zinc y la estructura aromática en NaI interactúa para el acoplamiento con el sitio hidrofóbico activo de la enzima. En un estudio clínico preliminar reciente, la aplicación de un derivado iPSMA marcado con Lu-177, mostró una disminución significativa en los niveles del antígeno prostático (PSA) en el 70% de los pacientes con CaP, sin mostrar efectos secundarios severos [30].

### **1.6 Bombesina (BN) como péptido ligante del Receptor del Péptido Liberador de la Gastrina (GRPr).**

Por otro lado, se ha demostrado que el péptido bombesina se une específicamente a receptores de membrana del péptido liberador de la gastrina (“gastrin releasing peptide receptors”, GRPr), los cuales también se encuentran sobre-expresados en el 84% de los cánceres de próstata humano y teniendo una expresión más alta en estadios tempranos y más bajo en cáncer avanzado [33-34].

La bombesina tiene una secuencia de 14 aminoácidos: pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub>. Los péptidos análogos a las bombesinas son obtenidos por acción enzimática a través de precursores proteicos que son transformados a su forma madura, el producto final contiene de 8-14 aminoácidos. La porción biológicamente activa perteneciente a la porción C-terminal de 7 aminoácidos, se le considera común a las bombesinas, los primeros pueden ser modificados sin interferir con la función biológica de la bombesina [35]. El péptido liberador de gastrina (GRP, 27 aminoácidos) difiere de la bombesina en solo 10 residuos carboxilo terminales lo que permite tener una actividad biológica similar en los dos péptidos, permitiendo una unión específica de la bombesina a los

GPRr, favoreciendo que los análogos del péptido bombesina sean ideales para marcar con radionúclidos para medicina nuclear [36, 37].

Una estrategia para marcar con átomos radioactivos es utilizar ligantes que enlazan en el extremo N-inicial con el elemento, llamados ligantes quelantes bifuncionales (BFCAs) [38]. Una estrategia de marcado diferente, es a través de la síntesis del péptido asociado a una molécula que se una directamente con el radionúclido. Esto se ha realizado en la síntesis de un pentadecapéptido con bombesina, formando un complejo estable y con actividad biológica idéntica a la de la bombesina, en donde se modificó el extremo N-inicial sustituyendo el ácido piroglutámico por Cys-Aca, de tal forma que el conjugado Cys-Aca-bombesina se marca fácilmente con  $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  [39]. Desde hace ya varios años se han desarrollado algunos radiofármacos análogos de bombesina, dirigidos a la medicina nuclear, los cuales han sido preparados para la detección de tumores malignos, en cáncer de próstata, seno y nódulos linfáticos [25, 35, 36, 40-42], sin embargo en muy pocos de ellos se ha utilizado el radiomarcaje con  $^{177}\text{Lu}$ , además que la mayoría de los análogos de bombesina marcados con  $^{99}\text{Tc}$  tienen la tendencia a acumularse en el intestino e hígado debido a su alta liofilia y su aclaramiento hepatobiliar, lo cual puede interferir en la detección de cánceres positivos y su metástasis en áreas abdominales [43].

### **1.7 RGD como péptido ligante de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ .**

La angiogénesis es un proceso crítico del tumor para su crecimiento y metástasis. El proceso angiogénico es regulado por receptores de adhesión celular. Las integrinas son una familia de glicoproteínas que facilita la adhesión de las células con las proteínas de la matriz extracelular. La secuencia tri-peptídica Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (Arg-Gly-Asp=RGD), presente en muchas de estas proteínas extracelulares, contiene Arginina (R) aminoácido básico, cargado positivamente, Glicina (G) aminoácido apolar muy pequeño y ácido aspártico (D) aminoácido cargado negativamente. Esta secuencia de RGD reconoce de manera específica a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  (Fig.6) [23,44]. Dichas integrinas, están expresadas en bajos niveles sobre las células epiteliales y las células endoteliales maduras, pero están altamente expresadas sobre las células endoteliales activadas en la neovasculatura de tumores [23, 45]. La expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  correlaciona bien con la progresión e invasividad del tumor [23]. El RGD tiene un alto reconocimiento por las integrinas, las cuales tienen una

acumulación en tejidos con alta angiogénesis tumoral, al unirse el RGD selectivamente se inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos recién formados [46].

Péptidos radiomarcados basados en análogos de RGD como su parte biológica activa, han sido reportados como radiofarmacéuticos altamente selectivos y con alta afinidad por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , por lo que el RGD puede ser utilizado como molécula de monitoreo no invasiva para angiogénesis tumoral en técnicas de imagenología molecular [23, 47], sin embargo en la mayoría de las investigaciones se han utilizado en unión con nanopartículas y en muy pocos con radiomarcaje por  $^{177}\text{Lu}$ . [20, 34, 48-50]. El análogo del RGD que se propone utilizar es el c-RGDf, donde la cisteína adicionada a la cadena lateral de la lisina, forma un espacio suficiente que permite la unión de los grupos SH- a la superficie del radionúclido [50].

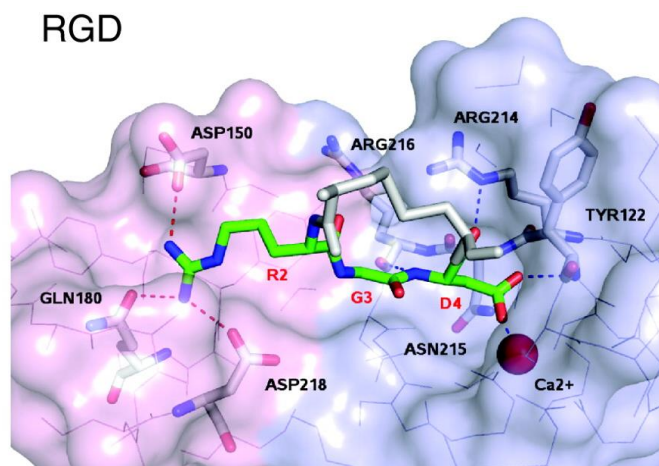


Figura 6. Interacción de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  con el RGD. Las subunidades de la integrina  $\alpha$ - y  $\beta$  están representadas en cian rosado y pálido, respectivamente. Los residuos RGD se muestran en verde, cistina en gris y átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre en azul, rojo y amarillo, respectivamente. El  $\text{Ca}^{2+}$  unido al sitio de adhesión dependiente de los iones metálicos está representado por una esfera roja. Los residuos de la integrina y el ligando implicados en la unión se marcan con el código de tres y una letra, respectivamente. Las líneas punteadas indican enlaces de hidrógeno entre ligandos e integrina.

## 2. Planteamiento del Problema:

Los receptores celulares de membrana, son proteínas o glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Participan en la comunicación de señales entre los espacios extracelular e intracelular y son clave en el establecimiento de las interacciones intercelulares. Estos receptores cambian su nivel de expresión en la membrana celular cuando las células se vuelven cancerosas, sobrexpresando determinados receptores, debido a que la célula demanda mayor proliferación y supervivencia. Sin embargo, los distintos receptores celulares que se sobrexpresan cambian según el estado del cáncer y su fenotipo.

Por lo tanto las lesiones de los tumores, incluso en el mismo paciente pueden diferir en sus niveles de expresión del receptor y los tipos de receptores expresados. Aunado a esto existen lesiones con alta heterogeneidad en la expresión de receptores, o incluso pérdida total o parcial de la expresión de ciertos receptores predilectos (p. ejemplo: PSMA). Sí en el radiofármaco se considera un solo receptor, pueden existir falsos negativos. Es por esto que los radiofármacos con moléculas heterodiméricas, que podrían unirse a dos receptores, pueden incrementar sinérgicamente las afinidades de unión al objetivo. Por lo tanto cualquier avance en el aumento de la sensibilidad de los radiofármacos para la detección de las células cancerosas puede incrementar la significancia clínica y de diagnóstico.

El diseño, síntesis y evaluación *in vitro* e *in vivo* de nuevos conjugados heterodiméricos del tipo iPSMA-BN (Fig. 4) ó iPSMA-RGD (Fig. 5), permitirá mejorar el reconocimiento específico por las células de cáncer de próstata respecto al monómero iPSMA, así como sus propiedades teranósticas (obtención de imágenes y radioterapia) al marcarlos con  $^{177}\text{Lu}$  para su uso en medicina nuclear traslacional. De esta forma, se espera que la investigación realizada permita trasladar los resultados a la asistencia clínica y al mismo tiempo retroalimentar los estudios básicos con nuevas preguntas.

Pregunta investigación: ¿Cuál es el potencial de los sistemas heterodiméricos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD como nuevos radiofármacos oncoteranósticos, dirigidos a la medicina nuclear traslacional?

### 3. Justificación

El cáncer es un padecimiento de alta incidencia en México, se ubica como la tercera causa de muerte. Los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (OMS, 2014 y 2015A).

La investigación de nuevos radiofármacos dirigidos a la medicina nuclear traslacional es una opción muy conveniente para que el conocimiento científico generado tenga un impacto real en la sociedad mexicana. La investigación sobre radiofármacos oncoteranósticos heterodiméricos para el tratamiento de cáncer de próstata avanzado, generará conocimiento de frontera y es de interés en el ámbito mundial. La propuesta es transformadora cuando se toma en cuenta que el objetivo de los radiofármacos de blancos moleculares específicos es obtener imágenes y terapias utilizando herramientas desarrolladas por la biología molecular pero con métodos aplicables *in vivo*. Esto implica una constante búsqueda y diseño de nuevos radiosensores o biomoléculas transportadoras de radionúclidos utilizando nuestras propias capacidades orgánicas. La viabilidad para realizar este proyecto está respaldada por la experiencia del grupo de trabajo, donde investigaciones previas del mismo grupo de investigación, sustentan las nuevas preguntas planteadas en esta propuesta.

El uso de radiofármacos oncoteranósticos permite aplicar el concepto de medicina personalizada, ya que mediante la aplicación de una dosis de radiación mínima, pueden obtenerse imágenes moleculares de las lesiones malignas y calcular la dosis de radiación exacta a aplicar (dosimetría interna a partir de imágenes) para eliminar a las células malignas sin sobrepasar la dosis máxima tolerada a los órganos no blanco; así como también tomar la decisión de no aplicar la dosis de radiación terapéutica a los pacientes cuyas células cancerosas no captan lo suficiente al radiofármaco administrado.

#### 4. Hipótesis:

Por sus propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento molecular específico, los **radiofármacos heterodiméricos:  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD**, que interactúan de forma concomitante con el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y el receptor del péptido liberador de gastrina (GRPr), o de forma concomitante con el PSMA y las integrinas  $\alpha(v)\beta(3)$  de las células tumorales, respectivamente, son **efectivos como nuevos radiofármacos oncoteranósticos** dirigidos a la medicina nuclear traslacional.

Hipótesis alterna:

Los radiofármacos heterodiméricos:  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD son **efectivos como nuevos radiofármacos oncoteranósticos** dirigidos a la medicina nuclear traslacional.

Hipótesis nula:

Los radiofármacos heterodiméricos:  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD **no** son **efectivos como nuevos radiofármacos oncoteranósticos** dirigidos a la medicina nuclear traslacional.

## 5. Objetivos:

### General:

Sintetizar y caracterizar químicamente los sistemas heterodiméricos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD, así como estudiar sus propiedades fisicoquímicas, la captación específica, afinidad y dosimetría *in vitro* en células de cáncer, la biodistribución y dosimetría de radiaci *in vivo* a partir de imágenes moleculares en modelos murinos con tumores inducidos, con la finalidad de determinar su potencial como nuevos radiofármacos oncoteranósticos dirigidos a la medicina nuclear traslacional.

### Específicos:

- 1) Preparar el radiofármaco monomérico  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA (Glu-NH-CO-NH-Lys( $\beta$ -naftil alanina-DOTA) como control para la evaluación de los radiofármacos heterodiméricos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD.
- 2) Sintetizar y caracterizar químicamente el conjugado Glu-NH-CO-NH-Lys( $\beta$ -naftil alanina)-NH-CO-NH-Benzoil-DOTA-ciclo-RGDf(K) (iPSMA-RGD).
- 3) Obtener el radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD con pureza radioquímica mayor al 98%.
- 4) Sintetizar y caracterizar químicamente el conjugado Glu-NH-CO-NH-Lys( $\beta$ -naftil alanina)-NH-CO-NH-Benzoil-DOTA-Lys<sup>3</sup>-Bombesina (iPSMA-Bombesina).
- 5) Obtener el radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina con pureza radioquímica mayor al 98%.
- 6) Evaluar la estabilidad en suero humano y la unión a proteínas séricas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia y ultrafiltración de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD.
- 7) Evaluar la captación específica y afinidad *in vitro* de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD a células de cáncer de las líneas LNCaP (PSMA+/GRPr-) y PC3 (PSMA-/GRPr+) a la integrina humana  $\alpha_v\beta_3$  y a la proteína recombinante del receptor péptido liberador de gastrina (GRPr).
- 8) Realizar la dosimetría celular y evaluar *in vitro* el efecto de la radiación beta de los radiofármacos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD sobre la proliferación celular en líneas de cáncer de próstata humano LNCaP y PC3.
- 9) Obtener los modelos radiofarmacocinéticos de la biodistribución de los radiofármacos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD en ratones atómicos con tumores inducidos de próstata humano LNCaP y PC3.
- 10) Obtener imágenes nucleares (micro-SPECT/CT system) de los radiofármacos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD en ratones atómicos con tumores inducidos de próstata humano.



## 6. Diseño metodológico:

### 6.1. Diseño del Estudio

Tipo de estudio: Prospectivo, experimental, comparativo, longitudinal.

### 6.2. Procedimientos.

#### 6.2.1. Síntesis y caracterización de los radiofármacos.

- **Análisis y caracterización de las moléculas heterodiméricas por HPLC/UV.**

La preparación de los conjugados iPSMA-Bombesina y el iPSMA-RGD se realizó a partir del derivado Glu-NH-CO-NH-Lys(Nal) obtenido comercialmente (PiChem, Austria), el cual se conjuga por el grupo amino terminal al p-SCN-Bz-DOTA. Utilizando HATU como activador del grupo carboxílico, se conjugó la Lys<sup>3</sup>-Bombesina ó el c-RGDf(K) a un grupo carboxilo del macrociclo DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético). El macrociclo DOTA fue utilizado como el sitio para incorporar al Lu-177. La caracterización química se realizó por técnicas de espectroscópicas UV-Vis, IR, HPLC y masas. El DOTA-iPMSA (a utilizar como control) se adquirió comercialmente (ONTORES, China).

- **Radiomarcado**

La pureza radioquímica y estabilidad en suero humano de los radiofármacos se realizó por radio-HPLC y ultrafiltración. La finalidad fue obtener los radiofármacos heterodiméricos con pureza radioquímica mayor al 98%.

#### 6.2.2. Estudios *in vitro*

- **Cultivo celular**

Para el análisis de los radiofármaco heterodimérico <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD y <sup>177</sup>Lu-iPSMA-BN, se utilizaron diferentes líneas celulares: la línea celular LNCaP (PSMA+/GRPr-) son células de metástasis de adenocarcinoma prostático humano; la línea celular PC3 (PSMA-/ GRPr+) son células de metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV; la línea celular C6 (PSMA+/α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>+), son células cancerosas de glioma de rata y las células U87MG (PSMA+/α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>+), son células cancerosas de glioma humano.

- **Captación y afinidad *in vitro*.**

En la captación del radiofármaco *in vitro* se obtuvo el porcentaje de radiofármaco captado e internalizado por la línea celular correspondiente. Para este ensayo se colocaron  $1 \times 10^5$  células/pozo en cajas de 24 pozos, 24 h previas. Se eliminó el medio y se colocó PBS para incubar con una solución 25 nM de cada tratamiento por 60 minutos a 37°C. Para la captación celular específica se determina por bloqueo competitivo según corresponda con el péptido iPSMA, BN o RGD. Posterior a la incubación se lava 4 veces con 1 mL de PBS. Se incubaron las células 2 veces con 0.5 mL de Glicina-HCl en PBS (50mM,pH 2.8) por 5 min, para remover el enlace a la superficie celular (la unión celular del fármaco). Se mide la captación en un contador gamma. Para observar el radiofármaco internalizado, se lavaron las células con 1 mL de PBS y se lisaron las células usando una solución 0.3 N de NaOH (0.5 mL). Se midió la captación en un contador gamma.

La afinidad *in vitro* se evaluó por estudios de competencia para determinar el IC<sub>50</sub>. Este análisis se realizó con la línea celular correspondiente, con 12 diferentes concentraciones del péptido a competir con el radiofármaco, de tal forma que se observe la concentración de péptido frío necesario para inhibir la unión del radiofármaco en un 50% (IC<sub>50</sub>). Se incubaron las células correspondientes (100 000/pozo) con una solución  $1 \times 10^{-10}$  M de los tratamientos en presencia de RGD o BN con iPSMA en 12 diferentes concentraciones (0-5,000 nM, en 100 µl/pozo). Después de la incubación a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h con agitación suave, se eliminó el tratamiento con el buffer de fosfatos con pH 5. Se lavó dos veces con 100 µl y una vez con 200 µl de tampón de unión frío, se midió la radiactividad unida a las células con un contador gamma. Los valores de la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) se calcularon ajustando los datos utilizando un algoritmo de regresión no lineal. Los experimentos se realizaron al menos tres veces.

- **Dosimetría *in vitro*.**

La dosimetría *in vitro* se realizó a través del efecto de los radiofármacos heterodiméricos sobre la proliferación celular de las líneas celulares correspondientes a través de ensayos de viabilidad con el reactivo XTT.

### 6.2.3. Estudios *in vivo*

Los estudios preclínicos de imagen, la eficacia terapéutica y toxicidad sistémica se realizaron en ratones atímicos con tumores inducidos de las líneas celulares correspondientes. Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células y se dejó crecer el tumor por 15 días o hasta que tuviera el tamaño de  $1 \text{ cm}^3$ .

- **Biodistribución *in vivo***

Para la biodistribución *in vivo*, se realizó con ratones con tumores inducidos de  $1 \text{ cm}^3$  de la línea celular correspondiente, a los cuales se les inyectó el radiofármaco heterodimérico (1MBq). Después de 1 hora de la inyección, se extrajeron los órganos de interés. Se pesaron y se calculó la radioactividad (usando un contador gamma).

- **Dosis absorbida *in vivo* ( $\mu\text{PET}$ )**

Por el otro lado para dosis absorbida *in vivo* se realizó con ratones que tengan tumores inducidos de  $1 \text{ cm}^3$  de la línea celular correspondiente, a los cuales se les inyectó el radiofármaco heterodimérico (5MBq/100 pmol). Se utilizó un microescáner PET a 1 y 24 horas postinyección.

### 6.3. Análisis de datos

#### Variables de Estudio

**Independientes:**

Radiofármacos:  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD.

**Dependientes:**

Captación específica y afinidad *in vitro*, dosimetría *in vitro*., biodistribución *in vivo*, dosis absorbida *in vivo*

**Intervinientes:** N/A

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<b>INDEPENDIENTES</b>					
<b>Radiofármaco</b>	Sustancia que contiene en su estructura átomos radiactivos y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada a un paciente para su diagnóstico y/o tratamiento.	Según la composición estructural de la molécula del radiofármaco.	Catagórica nominal	Nominal: 1) <sup>177</sup> Lu-iPSMA-BN 2) <sup>177</sup> Lu-iPSMA-RGD.	Prueba de t-de student
<b>Captación específica <i>in vitro</i></b>	Capacidad del radiofármaco de unirse específicamente a los receptores correspondientes de las líneas celulares.	Numero de cuentas de radiación dadas por línea celular	Cuantitativa	% de captación	Distribución normal Prueba de t-de student
<b>Afinidad <i>in vitro</i></b>	Capacidad del radiofármaco de continuar uniéndose específicamente a los receptores correspondientes de las líneas celulares, de acuerdo a la concentración del péptido correspondiente.	Numero de cuentas de radiación dadas por línea celular	Cuantitativa	IC50	Distribución normal Prueba de t-de student
<b>Dosimetría <i>in vitro</i></b>	Energía deposita en una región blanco con masa conocida, en componentes celulares.	Efecto de los radiofármacos heterodiméricos sobre la proliferación celular.	Cuantitativa	% de viabilidad celular	Distribución normal Prueba de t-de student
<b>Biodistribución <i>in vivo</i></b>	Forma en la cual se encuentra distribuido el radiofármaco en los órganos del organismo en estudio.	Numero de cuentas gamma, en los órganos de interés.	Cuantitativa	% de captación	Distribución normal Prueba de t-de student

<b>Dosis absorbida <i>in vivo</i></b>	Energía deposita en una región blanco con masa conocida, en modelo animal..	Metodología MIRD	Cuantitativa	Gy	Distribución normal Prueba de t-de student
---------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------	---------------------	--------------	----	-----------------------------------------------

#### **6.4. Análisis Estadísticos**

En la investigación se llevará a cabo una comparación entre tratamientos ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD), serán evaluados por una prueba de t de student, para considerar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado (para cada concentración, grupo y tratamiento), esto permitió contar con la media y la desviación estándar de cada tratamiento, correspondiente a cada ensayo.

#### **6.5. Aspecto ético**

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

Los estudios de biodistribución con ratones se realizarán de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Todos los estudios serán realizados bajo la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la clasificación y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Artículo aceptado

#### 7.1.1 Título del artículo aceptado

Artículo Original. “Preparation and *in vitro* evaluation of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical”



## 7.1.2 Página frontal del manuscrito

# *Preparation and in vitro evaluation of $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical*

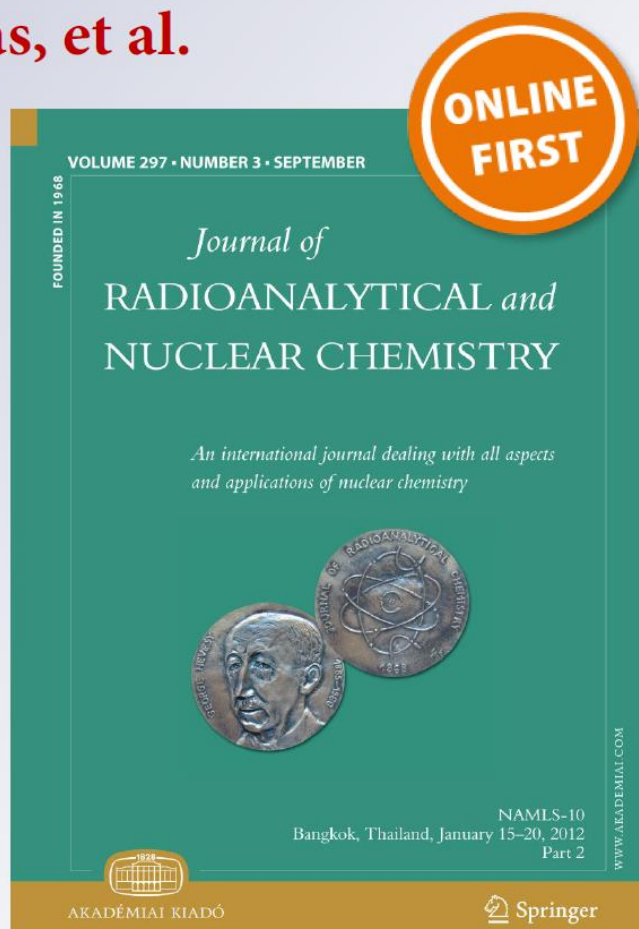
**Alondra Escudero-Castellanos, Blanca E. Ocampo-García, Guillermina Ferro-Flores, Keila Isaac-Olivé, Clara L. Santos-Cuevas, et al.**

**Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**

An International Journal Dealing with All Aspects and Applications of Nuclear Chemistry

ISSN 0236-5731

J Radioanal Nucl Chem  
DOI 10.1007/s10967-017-5555-9



## 7.1.3 Artículo publicado

Author's personal copy

J Radioanal Nucl Chem  
DOI 10.1007/s10967-017-5555-9**Preparation and in vitro evaluation of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical**Alondra Escudero-Castellanos<sup>1,2</sup> · Blanca E. Ocampo-García<sup>1</sup> ·  
Guillermina Ferro-Flores<sup>1</sup> · Keila Isaac-Olivé<sup>2</sup> · Clara L. Santos-Cuevas<sup>1</sup> ·  
Andrea Olmos-Ortiz<sup>3</sup> · Janice García-Quiroz<sup>4</sup> · Rocío García-Becerra<sup>4</sup> ·  
Lorenza Díaz<sup>4</sup>Received: 29 August 2017  
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2017

**Abstract** This study aimed to synthesize a new  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD heterobivalent radiopharmaceutical, as well as to assess the in vitro radiopharmaceutical potential to target cancer cells overexpressing PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins. The radiotracer prepared with a radiochemical purity of  $98.8 \pm 1.0\%$  showed stability in human serum, specific recognition with suitable affinity to PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins, and capability to inhibit cancer cell proliferation and VEGF signaling (antiangiogenic effect). Results warrant further preclinical studies to establish the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD potential as a dual therapeutic radiopharmaceutical.

**Keywords** PSMA inhibitor · RGD peptide ·  $^{177}\text{Lu}$  ·  $^{177}\text{Lu}$ -labeled PSMA inhibitor ·  $^{177}\text{Lu}$ -labeled RGD · Heterobivalent radiopharmaceutical

**Introduction**

The prostate specific membrane antigen (PSMA) is expressed in normal prostate epithelial cells but is overexpressed in 95% of metastatic prostate cancers (mPCa) [1]. That is why the PSMA protein is an appropriate molecular target for imaging and radiotherapy of mPCa using specific radiopharmaceuticals [2, 3]. However, PSMA is a multifunctional protein, as it can act as an internalization receptor, as a nutrient absorption enzyme, or as a peptidase involved in signal transduction in epithelial cells and cell migration [4]. Thus, radiopharmaceuticals based on PSMA inhibitors (iPSMA) can also be used in other types of neoplasia different than mPCa, such as differentiated thyroid cancer, gliomas, metastatic breast cancer, and osteosarcomas, among others [5–8].

Radiopeptides based on the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence show high affinity and selectivity for the  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins. As a result, these peptides are useful for targeting tumors due to the overexpression of integrins in the tumor neovasculature and lung carcinoma, neuroblastoma, glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, and breast cancer tumor cells [9, 10].

The research on new heterobivalent radiopharmaceuticals that interact with two different targets on tumor cells is a strategy for the enhancement of tumor imaging and therapy [11–13]. Therefore, a heterobivalent conjugate of iPSMA and RGD is expected to improve the recognition of cancer cells positive for PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins.

The aim of this study was to synthesize the Glu-CO-Lys-Nal-Cys(cRGDfK(MP))-DOTA- $^{177}\text{Lu}$  ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD) heterobivalent radioconjugate, as well as to assess its in vitro potential to target C6 and U87MG cells overexpressing PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins.

✉ Blanca E. Ocampo-García  
blanca.ocampo@inin.gob.mx; ocampo\_be@yahoo.com.mx

- <sup>1</sup> Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico
- <sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, 50180 Toluca, Estado de México, Mexico
- <sup>3</sup> Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales No. 800, Lomas de Virreyes, 11000 Ciudad de México, Mexico
- <sup>4</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Av. Vasco de Quiroga 15, 14080 Ciudad de México, Mexico

Published online: 20 October 2017

Springer

#### 7.1.4 Resumen

Este estudio tuvo como objetivo sintetizar un nuevo radiofármaco heterobivalente  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD, así como evaluar el potencial in vitro del radiofármaco para enlazarse a células cancerosas que sobreexpresan PSMA y las integrinas  $\alpha(v)\beta(3)$ . El radiotrazador preparado con una pureza radioquímica de  $98.8 \pm 1.0\%$  mostró estabilidad en suero humano, reconocimiento específico con afinidad adecuada a PSMA y a las integrinas  $\alpha(v)\beta(3)$ , así como capacidad para inhibir la proliferación de células cancerosas y la señalización de VEGF (efecto antiangiogénico). Los resultados justifican más estudios preclínicos para establecer el potencial de  $^{177}\text{Lu}$  iPSMA-RGD como radiofármaco terapéutico dual.

#### 7.1.5 Apartados del artículo

### **Introduction**

The prostate specific membrane antigen (PSMA) is expressed in normal prostate epithelial cells but is overexpressed in 95% of metastatic prostate cancers (mPCa)[1]. That is why the PSMA protein is an appropriate molecular target for imaging and radiotherapy of mPCa using specific radiopharmaceuticals [2,3]. However, PSMA is a multifunctional protein, as it can act as an internalization receptor, as a nutrient absorption enzyme, or as a peptidase involved in signal transduction in epithelial cells and cell migration [4]. Thus, radiopharmaceuticals based on PSMA inhibitors (iPSMA) can also be used in other types of neoplasia different than mPCa, such as differentiated thyroid cancer, gliomas, metastatic breast cancer, and osteosarcomas, among others [5-8].

Radiopeptides based on the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence show high affinity and selectivity for the  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins. As a result, these peptides are useful for targeting tumors due to the overexpression of integrins in the tumor neovasculature and lung carcinoma, neuroblastoma, glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, and breast cancer tumor cells [9,10].

The research on new heterobivalent radiopharmaceuticals that interact with two different targets on tumor cells is a strategy for the enhancement of tumor imaging and therapy [11-13]. Therefore, a heterobivalent conjugate of iPSMA and RGD is expected to improve the recognition of cancer cells positive for PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins.

The aim of this study was to synthesize the Glu-CO-Lys-Nal-Cys(cRGDfK(MP))-DOTA-Lu-177 ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD) heterobivalent radioconjugate, as well as to assess its *in vitro* potential to target C6 and U87MG cells overexpressing PSMA and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins.

## Experimental

### 1. Synthesis of iPSMA-RGD

The iPSMA-RGD (((5-(2-(3-((1-(4-((4-((2S,5S,11S,14R)-14-benzyl-11-(carboxymethyl)-5-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacyclo-pentadecan-2-yl)butyl)amino)-4-oxobutyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)-2-(2-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetamido)propanamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)-1-carboxypentyl)carbamoyl)glutamic acid) (MW 1775.37 g/mol) peptide (Fig. 1A) was designed at ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Mexico) and synthesized with the support of Ontores Biotechnology Co., Ltd (Zhejiang, China). Briefly, the Glu-CO-Lys sequence was first obtained as previously reported [2]. The peptide synthesis continued by addition of Fmoc- $\beta$ -naphthyl alanine, Fmoc-cysteine(tBu) and DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) to form the Glu-CO-Lys-Nal-Cys-DOTA sequence following the standard solid-phase peptide synthesis protocols (SPPS) [14]. The cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(maleimidepropionyl)) (cRGDfK(MP)) was synthesized as reported elsewhere [15], with the difference being the use of D-Phe instead of D-Tyr. Finally, MP from the cRGDfK(MP) molecule was used as the crosslinking site to react with the cysteine sulfhydryl group of Glu-CO-Lys-Nal-Cys-DOTA in order to obtain the Glu-CO-Lys-Nal-Cys(cRGDfK(MP))-DOTA conjugate (iPSMA-RGD) (Fig. 1). The molecular structure was characterized by IR (ATR-FTIR), mass (MALDI as ionization technique) [ $m/z$  [MALDI+2H] $^{2+}$ =888.6, [M+H] $^{+}$  (calc. 887.6)] and UV spectroscopies. The chemical purity was >98%, as determined by reversed phase

HPLC (RP-HPLC) (Fig. 1). The peptide eluted at  $t_R=9.14$  min from an analytical HPLC column, using a water/acetonitrile gradient containing 0.1% and 0.08% TFA from 95/5 to 10/90 in 30 min at a flow rate of 1 mL/min (room temperature).

## 2. Labeling of iPSMA-RGD with Lu-177

To 100  $\mu$ L of a solution of iPSMA-RGD (0.5 mg in 1 mL of 0.2 M acetate buffer, pH 5), 50  $\mu$ L (740 MBq) of  $^{177}\text{LuCl}_3$  (>3 TBq/mg, EndolucinBeta®, ITG, Germany) were added. The mixture was placed in a block heater at 95°C for 30 min. The final solution was diluted to 1 mL with a solution of ascorbic acid (10 mg/mL). For comparative studies, the DOTA-cyclo-RGDfK (Pichem, Austria) synthesized as previously reported [10] and DOTA-PSMA-617 (ABX, Germany) were also radiolabeled under the same procedure.

Radiochemical purity was evaluated on a reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Waters, USA) equipped with UV and radioactivity detectors. Analyses were performed using an analytical C18 column ( $\mu$ Bondapak 5  $\mu$ m, 3.9 x 300 mm) under a linear gradient of water/acetonitrile containing 0.1% of TFA from 98/5 to 2/90 in 30 min at a flow rate of 1 mL/min. The retention time for  $^{177}\text{LuCl}_3$  was  $3.6 \pm 0.3$  min and  $15.6 \pm 0.3$  min,  $14.1 \pm 0.3$  min and  $15.3 \pm 0.3$  min for  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-cyclo-RGDfK ( $^{177}\text{Lu}$ -RGD) and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA-617 ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA), respectively.

## 3. Serum stability

For the stability evaluation of the radiopeptides in serum, an analytical size-exclusion HPLC column (ProteinPak 300SW Waters) at a 1 mL/min flow rate and 0.01 M PBS as eluent was used.  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was incubated with 2 mL of diluted (1:10) human serum at 37°C. Samples (30  $\mu$ L) were taken at different times (from 30 min to 24 h) for radio-HPLC analysis.

## 4. *In vitro* cell studies

### 4.1 Cell culture

C6 (RGD-positive) rat brain glioma cells (ATCC<sup>®</sup> CCL-107<sup>™</sup>), U87MG (RGD-positive) human primary glioblastoma cell line (ATCC<sup>®</sup> HTB-14<sup>™</sup>) and EA.hy926 endothelial cells (ATCC<sup>®</sup> CRL-2922<sup>™</sup>) were originally obtained from ATCC (USA). The cells were routinely grown at 37°C in an incubator with humidified air (85% humidity), 5% CO<sub>2</sub> and cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Sigma-Aldrich Co.), supplemented with antibiotics (100µg/mL streptomycin and 100U/mL penicillin) and 10% fetal bovine serum.

### 4.2 Cell binding affinity

<sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD binding affinity was determined by a competitive cell binding assay. Briefly, C6 or U87MG cells (1x10<sup>5</sup> per well) were incubated at 37°C in 96-well cell culture plates for 24 h. Then, cells were incubated at 37°C for 1 h with “cold” peptides (iPSMA and/or RGD) at 8 different concentrations (from 10,000 to 0.01 nM, 30 µL/well, n=3) in the presence of a constant concentration of <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD (0.2 nM, 100 µL, 10 kBq). After incubation, the supernatant was removed, and the cells were washed three times with cold binding buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4). The radioactivity of each well was counted in a gamma NaI(Tl) detector (NML Inc., USA), which represented the cell-bound activity. The initial activity of each treatment was determined by the previous preparation of a standard representing 100%. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated by fitting the competitive binding curves using a nonlinear regression analysis (Origin8 Software). The same procedure was performed to determine IC<sub>50</sub> values for <sup>177</sup>Lu-iPSMA and <sup>177</sup>Lu-RGD.

### 4.3 Saturation assay

C6 or U87MG cells (8x10<sup>4</sup> per well) were incubated in 48-well cell culture plates for 24 h. Then, cells were incubated at 4°C for 1 h with <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD at eight different concentrations (from 1000 to 0.01 nM, 120 µL/well plus 30 µL of binding buffer, n=3).

The non-specific binding was determined in parallel by addition of 30  $\mu\text{L}$  of the non-radiolabeled analog (2  $\mu\text{M}$   $^{176}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD, prepared by using 82.8% enriched  $^{176}\text{Lu}$ , Isoflex, USA) instead of the 30  $\mu\text{L}$  of the binding buffer. After incubation, the supernatant was removed, the cells were washed three times with 100  $\mu\text{L}$  cold binding buffer, and the radioactivity of the total withdrawn volume was counted in a gamma NaI(Tl) detector (NML Inc., USA), which represented the non-cell-bound activity. The initial radioactivity of each treatment was determined by the previous preparation of standards representing 100%. The cell bound radioactivity corresponds to the activity measurement of the cells collected with 1 M NaOH. Specific binding was calculated as the difference between total binding and non-specific binding.  $B_{\text{max}}$  and  $K_d$  were determined by nonlinear regression analysis (GraphPad Prism software). The same procedure was followed to calculate the  $B_{\text{max}}$  and  $K_d$  values for  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD.

#### 4.4 Cell uptake

U87MG or C6 cells were harvested and diluted in fresh medium ( $1 \times 10^5$  cells/well, 0.5 mL) to then be seeded in 48-well tissue culture plates. After 24 h, the medium was removed, and the cells were incubated with a 25 nM solution of each treatment ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA or  $^{177}\text{Lu}$ -RGD, 30  $\mu\text{L}$ /well, 100  $\mu\text{L}$  of phosphate-buffered saline) for 45 min at 37 °C. Then, two rinses were performed with one mL of ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). The cells were washed twice with 0.5 mL of 1 M NaOH (fraction of cell uptake and radiotracer internalization). Radioactivity was measured in a NaI(Tl) detector (NML Inc. USA). The initial activity of each treatment was taken to represent 100%. In parallel, the non-specific binding was determined using 250  $\mu\text{M}$  of iPSMA-RGD, PSMA-617 or cRGDfK, which blocked cell receptors.

#### 4.5 Cell viability assay

The effect of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA or  $^{177}\text{Lu}$ -RGD treatments on cell viability was assessed by the mitochondrial dehydrogenase activity in living C6 or U87MG cells by using the XTT (2, 3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt; 0.1 mg/mL) assay kit (Roche, Germany). Briefly, C6 cells were

seeded in 96-well microtiter plates ( $8 \times 10^3$  cells/well) and incubated overnight to allow cell attachment. The growth medium was removed, and the cells were incubated for 4 h with approximately 2 kBq/cell of each treatment (200  $\mu$ L). The viability after exposure to the treatment was evaluated 24 h and 48 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 85% humidity). The cell proliferation percentage in each well was evaluated by the spectrophotometric measurement of cell viability (absorbance of the orange solution) at 450 nm in a microplate absorbance reader (Epoch™, BioTek Instruments, USA). The untreated cell absorbance was considered as 100% viability.

#### 4.6 Western blot (inhibition of VEGF signaling)

After a serum fasting overnight, EA.hy926 endothelial cells were exposed during 3 h to 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (hypoxia-like conditions). Then cells were treated with “cold” iPSMA or iPSMA-RGD for 5 min in the presence of serum. Culture medium with and without serum were used as positive and negative control, respectively. Cells were then lysed (HEPES 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NaF 10 mM, Nonidet P-40 0.1%,  $\beta$  glycerophosphate 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7.4). Proteins were separated by SDS-PAGE 10%, transferred to a Hy-bond ECL nitrocellulose membrane (Amersham) and blocked for 1 h at room temperature (skim milk 5% in TBS-tween 0.05%). Membranes were incubated overnight at 4°C in the presence of the rabbit monoclonal antibody anti-pVEGFR2 (Cell Signaling Technology, D5B11, 1:2000 in TBS-T 0.05% + 1% BSA), which identifies phosphorylated VEGFR2 in Y1175, followed by incubation with the secondary antibody HRP-goat anti-rabbit (Zymed, 65-6120) 1:10,000 in TBS-T 0.05% for 1 h at room temperature. Load control was evaluated with actin detection (goat polyclonal anti-actin (Santa Cruz, sc-1616) 1:3000 in TBS-T 0.05% + 3% skim milk overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibody HRP-rabbit anti-goat (Thermo, 31210) 1:30,000 in TBS-T 0.05% for 1 h at room temperature. The proteins were visualized by using the ECL-Plus western blotting detection system (GE Healthcare, UK), using the Bio-Rad ChemiDoc XRS detection system (Bio-Rad Hercules, CA).



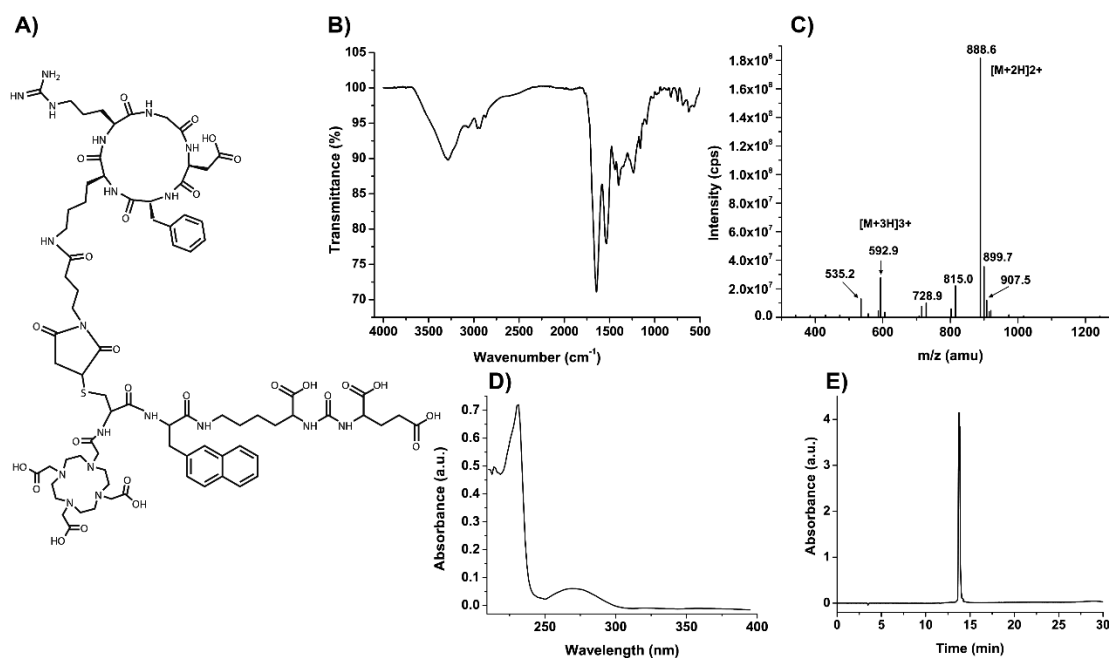
## 5. Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SD of the results of three independent replicas of each assayed condition. Differences between treatments of the unblocked and blocked receptors were evaluated with Student's t-test. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the effects of the different treatments on viability.

## Results and discussion

### *Synthesis and chemical characterization*

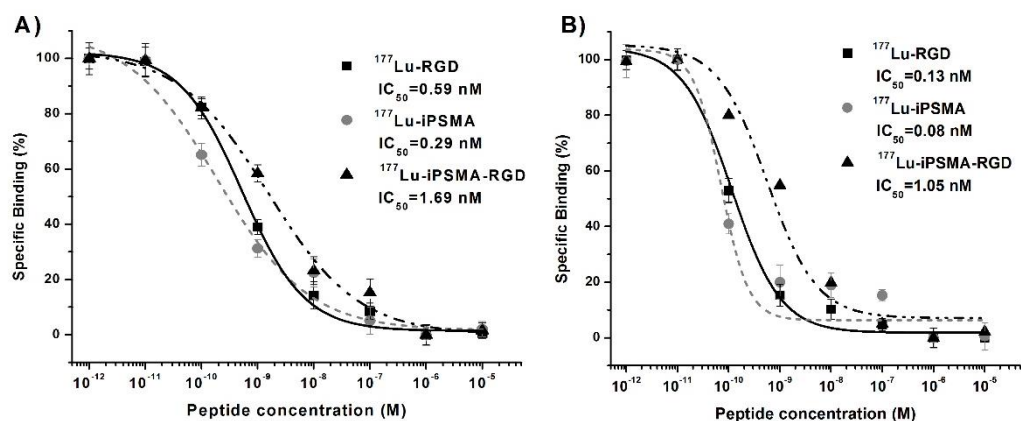
The schematic structure of iPSMA-RGD and its spectroscopic characterization (IR, masses UV-Vis and HPLC) are shown in Figure 1. The IR spectrum (Fig. 1B) shows the vibrations from amide I, II and III of the peptide at  $1646\text{ cm}^{-1}$ ,  $1534\text{ cm}^{-1}$  and  $1470\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$ , respectively. Bands at  $1239\text{ cm}^{-1}$  and  $1161\text{ cm}^{-1}$ , due to C-N-C vibrations from the DOTA and RGD cycles, are observed. Characteristic bands of the C-N stretch vibration from urea at  $1440\text{ cm}^{-1}$ , related to the iPSMA molecule, is also observed (Fig. 1B). The mass spectrum (Fig. 1C) shows the molecular ion  $[M+2H]^{2+}$  at  $m/z = 888.6$  and the ion  $[M+3H]^{3+}$  at  $m/z = 592.9$ . Other signals corresponding to the iPSMA-RGD structure as result of fragmentation pattern of the molecule (ionized fragments) are observed at  $535.2$  (CO- $\beta$ -naphthyl-Ala-Lys-Urea-Glu),  $728.9$  (cRGDfK(MP)) and  $815.0$  (cRGDfK(MP-S-CH<sub>3</sub>))  $m/z$ . The UV spectrum (Fig. 1D) of iPSMA-RGD conjugate shows a band at  $269\text{ nm}$ , which is a displacement of approximately  $8\text{ nm}$  from the iPSMA and cRGDfK UV-spectra, which showed a characteristic band at  $277 \pm 0.5\text{ nm}$ . The HPLC chromatogram indicated a chemical purity of  $>98\%$  (Fig. 1E). The radiochemical purities of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was  $98.8 \pm 1.0\%$ , as obtained by reversed-phase HPLC ( $n > 12$ ).  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD also showed radiochemical purities of  $>98\%$ .



**Fig. 1** A) Schematic structure of the synthesized iPSMA-RGD and its chemical characterization by B) IR (ATR-FTIR), C) mass (MALDI as ionization technique), D) UV-Vis spectroscopies and E) Reversed-phase HPLC analysis

#### *In vitro evaluation and cell studies*

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was highly stable in human serum since, after 1 and 24 h, only 2% and 6% of the radiopharmaceutical was bound to plasma proteins (shift to higher molecular weight), respectively. Only negligible peaks were eluted at lower molecular weights, indicating that  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD is not significantly catabolized in serum and therefore has suitable metabolic stability. These results agree with previous studies in which the average fraction of intact radio-RGD or radio-iPSMA ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RGD and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-RGD or  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-iPSMA) in blood is over 85% [2,16]



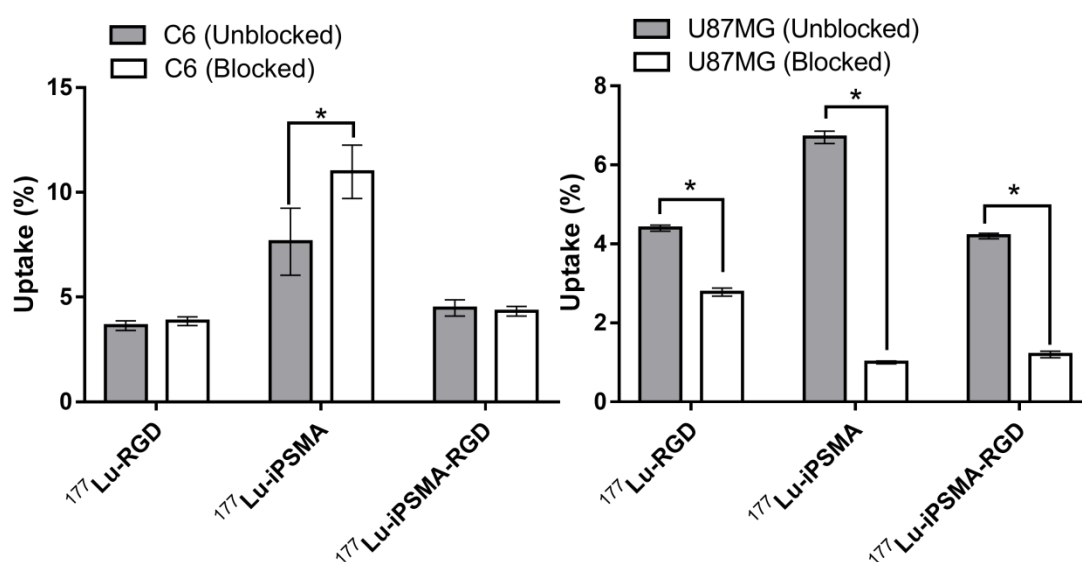
**Fig. 2** Competition assay of a constant concentration of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA, and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD with “cold” peptides (iPSMA and/or RGD) at 8 different concentrations (from 10,000 to 0.01 nM in A) C6 and B) U87MG cells.

Competition and saturation binding assays were conducted to determine the affinity of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD by calculating the  $\text{IC}_{50}$ ,  $K_d$ , and  $B_{\text{max}}$  values. As can be observed in figure 2, figure 3 and table 1,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was specifically recognized by PSMA and  $\alpha(\nu)\beta(3)$  integrins with a suitable affinity (U87MG cells:  $\text{IC}_{50}$ =1.05 nM,  $K_d$ =5.81 nM,  $B_{\text{max}}$ =0.32 nM) to be used as a potential radiotherapeutic radiopharmaceutical. Furthermore, the heterobivalent conjugate also demonstrated the ability to affect significantly ( $p < 0.01$ ) U87MG and C6 cell viability (Fig. 4). However,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD were found to have a slightly greater affinity for PSMA and integrins than  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD (Table 1, Fig. 2 and Fig. 3), although with  $\text{IC}_{50}$ ,  $K_d$  and  $B_{\text{max}}$  values in the same order of magnitude for all radiopharmaceuticals. That means that all of them could be useful in targeted radionuclide therapy.

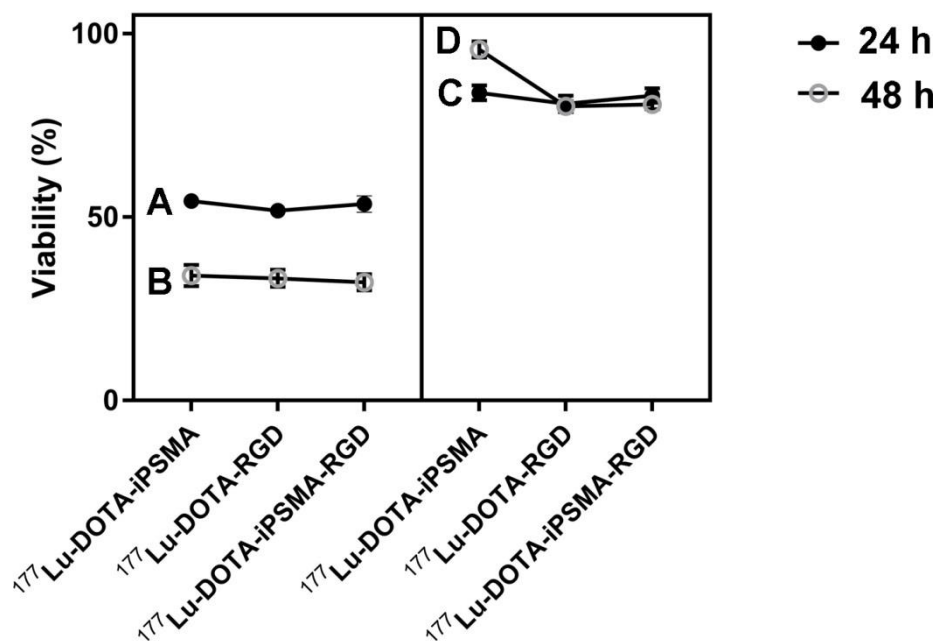
**Table 1.** Affinity of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA, and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD, as determined by the saturation assay

Radiotracer	C6 cells		U87MG cells	
	$K_d$ (nM)	$B_{\text{max}}$ (nM)	$K_d$ (nM)	$B_{\text{max}}$ (nM)
$^{177}\text{Lu}$ -RGD	4.54	0.219	4.31	0.366
$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA	3.89	0.067	3.84	0.383
$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD	4.60	0.284	5.81	0.321

The ANOVA results also indicated that all radioligands had a significant effect ( $p < 0.01$ ) on U87MG and C6 cell viability without statistically significant difference among the three treatments (Fig. 4). Nevertheless, a greater effect on viability was observed in the U87MG cells (~30% at 48 h) with regard to C6 (~80% at 48 h). Of concern is the apparent non-specific cell uptake of radiopharmaceuticals in C6 cells (Fig. 3), in which blocked cells showed a significant radioactivity uptake. However, the specific binding for all radioligands to C6 cells is evident in the affinity assay results (Fig. 2 and Table 1). This fact could be explained based on the concentration of unlabeled peptides used for the competition/blocking receptors since for the cell uptake test a concentration of 250  $\mu\text{M}$  “cold” peptide was used, while for saturation assays it was two orders of magnitude lower (2  $\mu\text{M}$ ). Therefore, the high levels of “cold” peptide possibly trigger C6 cell mechanisms that promote  $^{177}\text{Lu}$ -peptide internalization, instead of a receptor blocking effect.

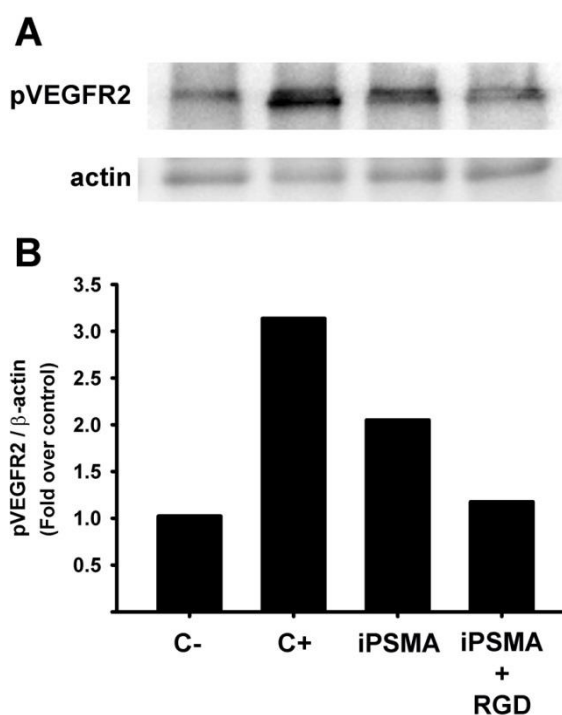


**Fig. 3** Specific uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA, and  $^{177}\text{Lu}$ -RGD in C6 and U87MG cells. Cells with blocked receptors were co-incubated with an excess of the respective “cold” peptides (iPSMA-RGD, iPSMA or RGD).



**Fig. 4** Two-way ANOVA results of the radiopharmaceutical's effect on cell viability: A) U87MG cells after 24 h, B) U87MG cells after 48 h, C) C6 cells after 24 h and D) C6 cells after 48 h. The cells without treatment (control +) represents the 100 % of viability. The cells treated with  $^{177}\text{LuCl}_3$  (control -) represents the unspecific uptake subtracted from the treatments.

Affinity, cell uptake, and viability assays indicated that  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was not able to concomitantly recognize two receptors on the cell surface or to improve the cell uptake concerning  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA or  $^{177}\text{Lu}$ -RGD monomers, as other authors have reported for heterobivalent molecules [11-13]. However, the intrinsic heterogeneity of human tumors, as well as changes in phenotype during disease progression, including the different level expression of cell surface receptors, is well-known. Therefore, the use of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD as a dual targeting radiopharmaceutical may improve detection sensitivity and therefore, absorbed radiation doses during therapy. Furthermore, heterobivalent molecules may display synergic properties such as enhancement of the antiangiogenic potential. As can be seen in figure 5, on hypoxic-like condition iPSMA-RGD was able to inhibit the phosphorylation of VEGFR2 (low pVEGFR2 value) behavior that was not observed with the iPSMA treatment. Therefore, the iPSMA-RGD heterodimeric compound showed suitable properties to act over tumor vasculature as an antiangiogenic molecule [17, 18].



**Fig. 5** A) Western blot showing phosphorylated VEGFR2 (pVEGFR2, upper panel) and actin (lower panel) performed with previously hypoxic ( $\text{CoCl}_2$  200  $\mu\text{M}$ , 3h) EA.hy926 cells cultivated in the presence of iPSMA or iPSMA-RGD concomitantly with serum during 5 minutes. Culture medium without and with serum was used as negative and positive control (C- and C+, respectively). B) Densitometric analysis of pVEGFR2 normalized against actin is shown in graphical form. Figure represents one experiment.

Considering that  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin and PSMA are overexpressed in the neovasculature of primary tumors and in metastatic lesions, a synergistic or dual recognition *in vivo* effect of the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD by different solid tumors is expected.

## Conclusions

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD was prepared with radiochemical purities of  $>98\%$ , as a stable and specific radiopharmaceutical to target PSMA and  $\alpha(\text{v})\beta(3)$  integrins, and with suitable affinity to be used as a radiotherapeutic agent. The iPSMA-RGD heterobivalent molecule showed potential to inhibit the VEGFR2 signaling. Nevertheless, preclinical studies are necessary to evaluate and determine the therapeutic potential of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD.

## Acknowledgements

This research was carried out as part of the activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, (Mexican National Council of Science and Technology, CONACyT-CB-2016-01-281526).”

## References

1. Santoni M, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Cascinu S, Montironi R (2014) Targeting prostate-specific membrane antigen for personalized therapies in prostate cancer: morphologic and molecular backgrounds and future promises. *J Biol Regul Homeost Agents* 28 (4):555-563
2. Ferro-Flores G, Luna-Gutiérrez M, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Azorín-Vega E, Jiménez-Mancilla N, Orocio-Rodríguez E, Davanzo J, García-Pérez FO (2017) Clinical translation of a PSMA inhibitor for  $^{99m}\text{Tc}$ -based SPECT. *Nucl Med Biol* 48:36-44
3. Kratochwil C, Giesel FL, Stefanova M, Benešová M, Bronzel M, Afshar-Oromieh A, Mier W, Eder M, Kopka K, Haberkorn U (2016) PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with  $^{177}\text{Lu}$ -labeled PSMA-617. *J Nucl Med* 57 (8):1170-1176
4. Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ (2005) Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *Am J Physiol Cell Physiol* 288 (5):C975-C981
5. Schwenck J, Tabatabai G, Skardelly M, Reischl G, Beschoner R, Pichler B, La Fougère C (2015) In vivo visualization of prostate-specific membrane antigen in glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42 (1):170

6. Verburg FA, Krohn T, Heinzel A, Mottaghy FM, Behrendt FF (2015) First evidence of PSMA expression in differentiated thyroid cancer using [<sup>68</sup>Ga] PSMA-HBED-CC PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42 (10):1622
7. Zeng C, Ke Z-F, Yang Z, Wang Z, Yang S-C, Luo C-Q, Wang L-T (2012) Prostate-specific membrane antigen: a new potential prognostic marker of osteosarcoma. *Med Oncol* 29 (3):2234-2239
8. Sathekge M, Modiselle M, Vorster M, Mokgoro N, Nyakale N, Mokaleng B, Ebenhan T (2015) 68Ga-PSMA imaging of metastatic breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42 (9):1482-1483
9. Haubner R, Decristoforo C (2009) Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Front Biosci* 14:872-886
10. Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-García B, Jiménez-Mancilla N, Morales-Avila E, León-Rodríguez D, Isaac-Olivé K (2012) 177Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins. *J Labelled Comp Radiopharm* 55 (4):140-148
11. Shallal HM, Minn I, Banerjee SR, Lisok A, Mease RC, Pomper MG (2014) Heterobivalent agents targeting PSMA and integrin- $\alpha v\beta 3$ . *Bioconjug Chem* 25 (2):393-405
12. Zhang J, Niu G, Lang L, Li F, Fan X, Yan X, Yao S, Yan W, Huo L, Chen L (2017) Clinical translation of a dual integrin  $\alpha v\beta 3$ -and gastrin-releasing peptide receptor-targeting PET radiotracer, 68Ga-BBN-RGD. *J Nucl Med* 58 (2):228-234
13. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K (2014) Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA



- and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate* 74 (6):659-668
14. Coin I, Beyermann M, Bienert M (2007) Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc* 2 (12):3247-3256
  15. Ocampo-Garcia BE, Santos-Cuevas CL, De Leon-Rodriguez LM, Garcia-Becerra R, Ordaz-Rosado D, Luna-Guitierrez MA, Jimenez-Mancilla NP, Romero-Pina ME, Ferro-Flores G (2013) Design and biological evaluation of (9)(9mTc-N(2)S(2)-Tat(49-57)-c(RGDyK): a hybrid radiopharmaceutical for tumors expressing alpha(v)beta(3) integrins. *Nucl Med Biol* 40 (4):481-487
  16. Decristoforo C, Gonzalez IH, Carlsen J, Rupprich M, Huisman M, Virgolini I, Wester H-J, Haubner R (2008) 68Ga-and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of  $\alpha\beta_3$  integrin expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (8):1507-1515
  17. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML (2010) Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol* 188 (4):595-609
  18. Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hovalala-Dilke KM (2009) Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* 15 (4):392-400

## 7.2 Artículo enviado

### 7.2.1 Título del artículo enviado

Artículo Original.

Synthesis and preclinical evaluation of the  
 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys<sup>3</sup>-Bombesin heterodimer  
designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer.

## 7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo

Your article has been published in *Nuclear Medicine Communications*



Lippincott

Dear *Nuclear Medicine Communications* Contributor,

The article to which you contributed, **Synthesis and preclinical evaluation of the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys3-bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer**, has been published in [Nuclear Medicine Communications in Vol. 40, No. 3, March 2019.](#)

## How to access your article

---



You can download the PDF of your article by clicking on the secure link below. **This link will expire after 30 days**, so be sure to download soon.

[Access the PDF of your article by clicking this secure Wolters Kluwer link >](#)

**This is copyrighted information and for your use only. It should not to be shared publically.** For questions about acceptable article sharing, please visit [Wolters Kluwer Health Permissions.](#)

## 7.2.3 Artículo publicado

**Nuclear  
Medicine**  
Communications

## Original article

## Synthesis and preclinical evaluation of the $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA (inhibitor)-Lys<sup>3</sup>-bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer

Alondra Escudero-Castellanos<sup>a,b</sup>, Blanca Ocampo-García<sup>a</sup>,  
Guillermina Ferro-Flores<sup>a</sup>, Clara Santos-Cuevas<sup>a</sup>, Enrique Morales-Ávila<sup>c</sup>,  
Myrna Luna-Gutiérrez<sup>a</sup> and Keila Isaac-Olivé<sup>b</sup>

**Background** Human tumors show intrinsic heterogeneity and changes in phenotype during disease progression, which implies different expression levels of cell surface receptors. The research on new heterodimeric lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )-radiopharmaceuticals interacting with two different targets on tumor cells is a strategy for improvement of radiotheranostic performance. This study aimed to synthesize and characterize the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA (inhibitor)-Lys<sup>3</sup>-bombesin ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-iPSMA-Lys<sup>3</sup>-BN) heterodimer and to evaluate its potential to target prostate-specific membrane antigen (PSMA) and gastrin-releasing peptide receptor (GRPr) overexpressed in prostate cancer.

**Methods** The heterodimeric conjugate was synthesized and characterized by infrared, mass, and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopies. The ligand was labeled with  $^{177}\text{Lu}$  and the radiochemical purity was assessed by radio-high-performance liquid chromatography. PSMA/GRPr affinity and the heterobivalent effect on cell viability were evaluated in LNCaP and PC3 prostate cancer cell lines. The biodistribution profile (3 and 96 h) was assessed in athymic mice with induced prostate tumors. Using pulmonary LNCaP (PSMA-positive) and PC3 (GRPr-negative) micrometastasis models, the influence of heterobivalency and affinity on tumor uptake was quantified (micro-SPECT/CT).

**Results**  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN (radiochemical purity > 98%) showed specific recognition for PSMA and GRPr

### Introduction

The prostate-specific membrane antigen (PSMA) is expressed in the epithelial cells of the prostate and overexpressed in 95% of advanced prostate cancers (PCas) [1]. PSMA expression levels correlate with androgen independence and progression of the disease [2]. The therapeutic application of lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )-labeled PSMA inhibitors ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA-I&T) has shown a decrease of more than 50% in the prostate antigen levels and a significant

( $\text{IC}_{50}$  = 5.62 and 3.49 nmol/l, respectively) with a significant decrease in cell viability (10.15% of cell viability in LNCaP and 40.10% in PC3 at 48 h), as well as high LNCaP and PC3 tumor uptake (5.21 and 3.21% ID/g at 96 h, respectively). Micro-SPECT/CT imaging showed the heterodimer ability to target the tumors ( $\text{SUV}_{\text{max}}$  of  $1.93 \pm 0.30$  and  $1.76 \pm 0.10$  in LNCaP and PC3, respectively), possibly influenced by the heterobivalent effect.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-iPSMA-Lys<sup>3</sup>-BN showed suitable affinity for PSMA and GRPr.

**Conclusion** The results warrant further preclinical studies to establish the  $^{177}\text{Lu}$ -radiotracer theranostic efficacy. *Nucl Med Commun* 40:278–286 Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Nuclear Medicine Communications 2019, 40:278–286

**Keywords:** heterobivalent radiopharmaceutical, heterodimer radiotracer, lutetium-177, Lys<sup>3</sup>-bombesin, prostate-specific membrane antigen inhibitor

<sup>a</sup>Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, <sup>b</sup>Facultad de Medicina and <sup>c</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

Correspondence to Blanca Ocampo-García, PhD, Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México C.P. 52750, Mexico  
Tel: +52 555 329 7200 x13871; fax: +52 555 329 7306;  
e-mails: ocampo\_be@yahoo.com.mx, blanca.ocampo@inin.gob.mx

Received 5 October 2018 Revised 19 November 2018  
Accepted 28 November 2018

increase in survival in 70% of patients with metastatic PCa [2–4].

The bombesin (BN) peptide binds specifically to the gastrin-releasing peptide receptor (GRPr), which is also overexpressed in 84% of human PCa. GRPr is clinically relevant because of its high expression in early PCa stages [3,4]. For several years, some radiopharmaceuticals based on BN analogs have been developed for imaging, staging, or assessment of metastatic disease in patients with PCa [5–9].  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA, a BN-based peptide agonist, has shown therapeutic potential in PCas with different levels of GRPr expression [10–12]. However, a phase I clinical study in patients with PCa showed a high accumulation of the radiotracer in the pancreas and some

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.nuclearmedicinecomm.com.

0143-3636 Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/MNM.0000000000000966

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

#### 7.2.4 Resumen

Los tumores humanos muestran heterogeneidad intrínseca y cambios en el fenotipo durante la progresión de la enfermedad, lo que implica diferentes niveles de expresión de los receptores de la superficie celular. La investigación sobre nuevos productos farmacéuticos heterodiméricos radiomarcados con Lu-177 que interactúen con dos blancos moleculares diferentes en células tumorales es una estrategia para mejorar el rendimiento radioterapéutico. Este estudio tuvo como objetivo sintetizar y caracterizar el heterodímero  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA(inhibidor)-Lys<sup>3</sup>-Bombesina y evaluar su potencial para unirse a los receptores de PSMA y GRP sobreexpresado en cáncer de próstata.

El conjugado heterodimérico se sintetizó y caracterizó por espectroscopia infrarroja, espectroscopia de masas y  $^1\text{H}$ -RMN. Los ligandos se marcaron con  $^{177}\text{Lu}$  y la pureza radioquímica (PR) se evaluó por radio-HPLC. La afinidad PSMA/GRPr y el efecto heterobivalente en la viabilidad celular fueron evaluados en líneas celulares de cáncer LNCaP y PC3. El perfil de biodistribución (3 y 96 h) se realizó en ratones atómicos inducidos con tumores de próstata. Usando modelos de micrometástasis pulmonar LNCaP (PSMA-positivo) y PC3 (GRPr-negativo) se cuantificó la influencia de la heterobivalencia y la afinidad en la captación tumoral (micro-SPECT/CT).

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN (PR>98%) mostró reconocimiento específico por PSMA y GRPr (IC<sub>50</sub>=5.62nM y 3.49 nM, respectivamente) con una disminución significativa en la viabilidad celular (10.15% de la viabilidad celular en LNCaP y 40.10% en PC3 a las 48 h) así como una alta captación tumoral por LNCaP y PC3 (5.21% ID/g y 3.21% ID/g a 96h, respectivamente). Imágenes Micro-SPECT/CT demostraron la capacidad del heterodímero para dirigirse a los tumores (SUV<sub>max</sub> de  $1.93 \pm 0.30$  y  $1.76 \pm 0.10$  en LNCaP y PC3, respectivamente), posiblemente influenciado por el efecto heterobivalente.

El radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA(inhibidor)-Lys<sup>3</sup>-Bombesina mostró adecuada afinidad por PSMA y GRPr. Los resultados justifican estudios preclínicos adicionales para establecer la eficacia terapéutica del  $^{177}\text{Lu}$ -radiotrazador.

### 7.2.5 Apartados del artículo.

#### **Introduction**

The prostate-specific membrane antigen (PSMA) is expressed in the epithelial cells of the prostate and overexpressed in 95% of advanced prostate cancers (PCa) [1]. PSMA expression levels correlate with androgen independence and progression of the disease [2]. The therapeutic application of  $^{177}\text{Lu}$ -labeled PSMA inhibitors ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA-I&T) has shown a decrease of >50% in the prostate antigen (PSA) levels and a significant survival increase in 70% of patients with metastatic PCa [2-4].

The bombesin (BN) peptide binds specifically to the gastrin-releasing peptide receptor (GRPr), which is also overexpressed in 84% of human PCa. GRPr is clinically relevant due to its high expression in early PCa stages [3, 4]. For several years, some radiopharmaceuticals based on bombesin analogues have been developed for imaging, staging or assessment of metastatic disease in patients with PCa [5-9].  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA, a bombesin-based peptide agonist, has demonstrated therapeutic potential in prostate cancers with different levels of GRPr expression [10-12]. However, a phase I clinical study in subjects with PCa showed a high accumulation of the radiotracer in the pancreas and some adverse events induced by the high doses of the peptide (1.4–4.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) [13]. The  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PESIN ligand is another bombesin peptide derivative (receptor agonist) that has also shown potential therapeutic properties and better pharmacokinetics than  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA[14].

Several heterodimeric radiotracers have been reported with promising results for imaging of PCa due to the bivalent effect and/or the increase in their probability of molecular

interaction. The DUPA-6-Ahx-(<sup>64</sup>Cu-NODAGA)-5-Ava-BBN(7-14)NH<sub>2</sub> was the earliest dual GRPr/PSMA-targeting approach for molecular imaging of prostate tumors[15]. Subsequently, a novel family of bispecific radioligands targeting GRPr/PSMA was developed. These compounds exhibited a synergistic ability (*in vivo*) for targeting both, PSMA and GRPr-positive tumors, whereas the charged linkers used in each compound significantly reduced the kidney and spleen uptake [10]. The Glu-urea-Lys(Ahx)-HBED-CC-BZH3 labeled with <sup>68</sup>Ga was also developed for GRP/PSMA-PET imaging[12]. It is important to mention that all these heterodimers used derivatives based on BN antagonists and NODAGA (1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-triacetic acid) or HBED-CC (N,N'-Bis[2-hydroxy-5-(carboxyethyl)-benzyl]ethylenediamine-N,N'-diacetic acid) as chelators for the radionuclide.

Wüstemann *et al.* have reported that for diagnostic applications in PCa, a selective uptake by cancer cells is enough to obtain high-quality images. However, to achieve efficient therapies, a selective cell uptake with a high rate of internalization is necessary to prolong the exposure of tumor cells to beta or alpha particle emissions during the decay of radionuclide [11]. It is known that the agonist peptide Lys<sup>3</sup>-Bombesin has a significant internalization rate [13]. Although it has also been reported that the DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid) chelator is responsible for the low internalization of the radioligands based on PSMA inhibitors [11, 14], its intermediate position between two peptide chains (among other features as charge, lipophilicity or size) could induce a steric shielding effect on DOTA moiety and to influence the binding properties. Therefore, a heterodimeric system composed of a PSMA inhibitor, an agonist peptide based on Lys<sup>3</sup>-bombesin, and DOTA at the center of the two monomers, could

improve the cell uptake when it is labeled with Lu-177 as a theranostic radionuclide [16]. Since theranostics combines the potential of therapeutic and diagnostic radionuclides in the same molecular probe, the ligand would also be useful to prepare a new  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$  theranostic pair.

The aim of this study was to synthesize and chemically characterize the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys<sup>3</sup>-Bombesin (HO-Glu-CO-Lys{Nal-Cys[Pyr-Gln-Lys (maleimido butyl)-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>]-DOTA}-OH) heterodimer, as well as to assess its *in vitro* and *in vivo* potential to target both PSMA and GRP receptors in prostate cancer.

## Materials and methods

### Synthesis of iPSMA-BN

The HO-Glu-CO-Lys{Nal-Cys[Pyr-Gln-Lys(maleimidobutyl)-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>]-DOTA}-OH (MW=2764.38 g/mol) where, DOTA=1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid (3D structure, Fig. 1a and 2D structure, Suppl. Material Fig. 1) was designed at the “Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares” (ININ, Mexico) and the synthesis requested to Ontores Biotechnologies Co., Ltd (Hangzhou, China).

Briefly, the Glu-CO-Lys sequence was obtained as previously reported [17]. The peptide synthesis was continued by the addition of Fmoc-β-naphthyl alanine, Fmoc-cysteine(tBu) and DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) to form the Glu-CO-Lys-Nal-Cys-DOTA sequence following the standard solid-phase peptide synthesis protocols (SPPS) [18]. The Lys<sup>3</sup>-BN peptide was conjugated to the N-γ-



maleimidobutyl-oxysuccinimidyl ester moiety through Lys<sup>3</sup>, and the group was used as the branch position to form a thioether with the Cys residue side chain of Glu-CO-Lys-Nal-Cys-DOTA to produce the HO-Glu-CO-Lys{Nal-Cys[Pyr-Gln-Lys(maleimidobutyl)-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>]-DOTA}-OH (iPSMA-BN). The final product was analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), mass spectroscopy (MALDI-MS), <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) and reversed-phase HPLC.

#### **Semi-empirical Augmented MM3 Methodology**

By employing the BioMedCACHe and CACHe Work System Pro 5.04 software (Fujitsu Limited), Molecular Mechanics (MM) calculations for Lu-iPSMA-BN, Lu-BN and Lu-iPSMA were carried out. Subsequently, application of Augmented MM3/CONFLEX procedures yielded the most stable conformers.

#### **Labeling of iPSMA-BN with Lu-177**

To prepare <sup>177</sup>Lu-iPSMA-BN, the labeling method previously reported by our group was carried out[19]. Briefly, 100 μL of a iPSMA-BN solution (0.5 mg/mL in 0.2 M acetate buffer, pH 5), 50 μL (740 MBq) of no-carrier-added lutetium-177 (<sup>177</sup>Lu) chloride with a specific activity >3,000 GBq/mg (ITG, Germany), were added. The mixture in the vial was sealed and heated at 95°C ± 1 °C for 30 min in an aluminum heating block . This solution was diluted to 1 mL with an ascorbic acid solution (10 mg/mL). In order to compare the dual targeting molecule, the DOTA-BN (Pichem, Austria) and DOTA-PSMA-617 (ABX, Germany) monomers were also radiolabeled using the same method.

### **Evaluation of Radiochemical Purity**

The radiochemical purity was evaluated on a reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Waters, USA) equipped with a diode array UV (PDA) and radioactivity detectors. Each separation was carried out using a  $\mu$ Bondapak- C18 column (3.9 x 300 mm, 5  $\mu$ m.). Analyses were performed using a linear gradient at a flow rate of 1 mL/min of water/acetonitrile containing 0.1% of TFA from 98/2 to 10/90 in 30 min. The retention time for  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN was  $16.4 \pm 0.2$  min,  $16.5 \pm 0.3$  min for  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-BN ( $^{177}\text{Lu}$ -BN),  $15.4 \pm 0.3$  min for  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $3.6 \pm 0.1$  min for unbound  $^{177}\text{Lu}$ .

### **Stability against serum proteins**

To evaluate the stability of the radiolabeled peptide in serum, 200  $\mu\text{L}$  of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN were incubated with 800  $\mu\text{L}$  of 1:5 diluted human serum (Sigma-Aldrich, NIST-909c certified human serum sample) at  $37^\circ\text{C}$  for 24h. During this time, 50  $\mu\text{L}$  of the solution was taken at different time points (from 30 min to 24 h). The sample was analyzed by size-exclusion radio-HPLC (Column Protein Pack 300 SW,  $7.5 \times 300$  mm) with an isocratic mode (1 mL/min) using 0.01 M phosphate buffer as the mobile phase.

### **LNCaP and PC3 cell cultures**

The LNCaP (PSMA-positive) human prostatic adenocarcinoma cell line (ATCC<sup>®</sup> CRL-1740<sup>™</sup>) and PC3 (GRPr-positive) human prostatic carcinoma bone metastasis cell line (ATCC<sup>®</sup> CRL-1435<sup>™</sup>) were acquired from ATCC (USA). The cells were grown in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co.) supplemented with fetal bovine serum (10%) and antibiotics

(100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin). The RPMI 1640 medium for LNCaP growth was also supplemented with 0.02 M glucose, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate.

For the experiments conducted with LNCaP cells, the culture plates were previously coated with poly-L-lysine (0.1 % w/v). Briefly, 100 µL of the poly-L-lysine solution was placed in each well and kept at 4°C for 20 min. Then, the solution was removed and the wells were washed with PBS three times.

### **Expression of PSMA and GRPr in LNCaP and PC3 cells**

For the evaluation of PSMA and GRPr expression in LNCaP and PC3 cells, the reverse transcriptase-qPCR assay was carried out. RNA was extracted from cells with trizol (Life Technologies, Carlsbad, USA). The RNA concentration was estimated by spectrophotometry at 260/280 nm and a constant amount of RNA (2 µg) was reverse-transcribed using a conventional assay (Roche Applied Science, IN, USA). Probes and primers for qPCR amplification were obtained from Roche (Universal Probe Library Assay Design Center). Real-time PCR was performed using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) under the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95 °C for 10 min, 45 amplification cycles (10 s at 95 °C, 30 sec at 60 °C and 1 s at 72 °C). Three microliters of cDNA were used for amplification of qPCR with the specific PSMA or GRPr primer: left 5'-TTCTCCTGGAGGCAGATGTT-3' and right 5'-CTGGAATTCGCTCCAGACC-3' or forward 5'-CCCGTGGGAAGGGAATATAACA-3' and reverse 5'-GCGGTACAGGTAGATGACATGAT-3', respectively. The housekeeping gene GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase): 5'-AGCCACATCGC TCAGACAC-3' and reverse 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' was used as an internal control. Data obtained from qPCR were analyzed using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method. Finally, results were expressed as a relative fold expression of PSMA or GRPr between PC3 and LNCaP cells.

### **Cell binding affinity**

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN binding affinity was determined by a competitive cell binding assay. Briefly, LNCaP and PC3 cells ( $1 \times 10^5$  per well) were incubated in 96-well cell culture plates for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . Then, cells were incubated with “cold” peptides (iPSMA and/or BN) at 12 different concentrations (from 0 to 5,000 nM, 100  $\mu\text{L}$ /well,  $n=3$ ) in presence of a constant concentration of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN (40 nM, 70  $\mu\text{L}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. After the incubation, the supernatant was removed and cells were washed three times with cold binding buffer (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 7.4). To measure the cell-bound activity, the radioactivity of each well was counted in a gamma NaI(Tl) detector (NML Inc., USA). A standard representing 100% was prepared for determining the initial activity of each treatment. The 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was estimated by fitting the competitive binding curves to the Hill function on Origin8 Software.

The same procedure was performed to determine  $\text{IC}_{50}$  for  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN. In order to compare the obtained values, the equimolar concentration of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN was used in this assay (20 nM, 70  $\mu\text{L}$ ).

### **Cell uptake and internalization**

LNCaP and PC3 cells were harvested to be seeded in 24-well tissue culture plates ( $1 \times 10^5$  cells/well, 0.5 mL). After 24 h, the medium was removed and the cells were treated with 60 nM (150  $\mu$ L/well) of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN and 30 nM of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN, for 45 min at 37 °C. Then, three washes with 1 mL of ice-cold phosphate-buffered saline were carried out. To calculate the cell uptake fraction, the cells in each well were incubated for 5 min at room temperature (2X) with 0.5 mL of glycine buffer (50 mM, pH 2.8). This fraction was removed and the radioactivity was measured in a NaI(Tl) detector (NML Inc. USA). To evaluate the radiopharmaceutical internalization, the cells were incubated for 10 min at room temperature with 1 mL of NaOH (0.3 M). Again, the radioactivity was measured in a NaI(Tl) detector (NML Inc. USA). For each treatment, a standard of 150  $\mu$ L was taken to represent 100% (n=3). In parallel, the non-specific binding was determined using a 500  $\mu$ M blocking receptor dose of PSMA-617, iPSMA-BN or BN.

### **Cell viability assay**

The mitochondrial dehydrogenase activity in living PC3 or LNCaP cells was assessed to measure the effect of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN on cell viability by using the XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt; 0.1 mg/mL) assay kit (Roche, Germany). Briefly, PC3 or LNCaP cells ( $8 \times 10^3$  cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates. After incubation overnight, the growth medium was removed and the cells were incubated for 4 h with each treatment ( $\sim 2$  Bq/cell, 200  $\mu$ L). The viability after exposure to each treatment was evaluated at 24 h, 48 h and 72 h (37°C, 5%  $\text{CO}_2$  and 85% humidity). The cell absorbance in each well was measured in a

microplate reader at  $\lambda=450$  nm (Epoch™, BioTek Instruments, USA). The untreated cells represented the control group (100 % viability).

### ***In vivo studies***

Preclinical imaging and biodistribution data were obtained from athymic mice induced either with LNCaP or PC3 tumors (two different models). Male BALB/c nu/nu mice (5-6 weeks old) were provided by the “Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán” (Mexico). Experimental models were developed under specifications for laboratory animals, detailed in the Official Mexican Norm NOM 0062-ZOO-1999.

For biodistribution studies, the LNCaP and PC3 tumor-bearing mice model was induced by subcutaneous inoculation of  $1 \times 10^6$  cells into the left (PC3) and right flank (LNCaP). Once the tumor had developed ( $0.3-1.0 \text{ cm}^3$ ),  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN was injected into the tail vein (37 kBq). After 3 h and 96 h of the injection, organs of interest were extracted, weighed and their radioactivity measured in a gamma counter to calculate the % ID/g (n=3).

For micro-SPECT/CT imaging, LNCaP (PSMA-positive) and PC3 (GRPr-positive) lung metastatic tumor models were developed by inoculating  $4 \times 10^5$  cells into the tail vein. At 5 days post-injection,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN was injected (i.v.), keeping the mice under 2% isoflurane anesthesia in prone position and the images were acquired at 24 h after radiotracer administration using a micro-SPECT/CT scanner (Albira, ONCOVISION; Gem Imaging S.A., València, Spain). Standard uptake values ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) in mice were calculated using the the PMOD Data Analysis Software (PMOD technologies, Zürich, Switzerland).

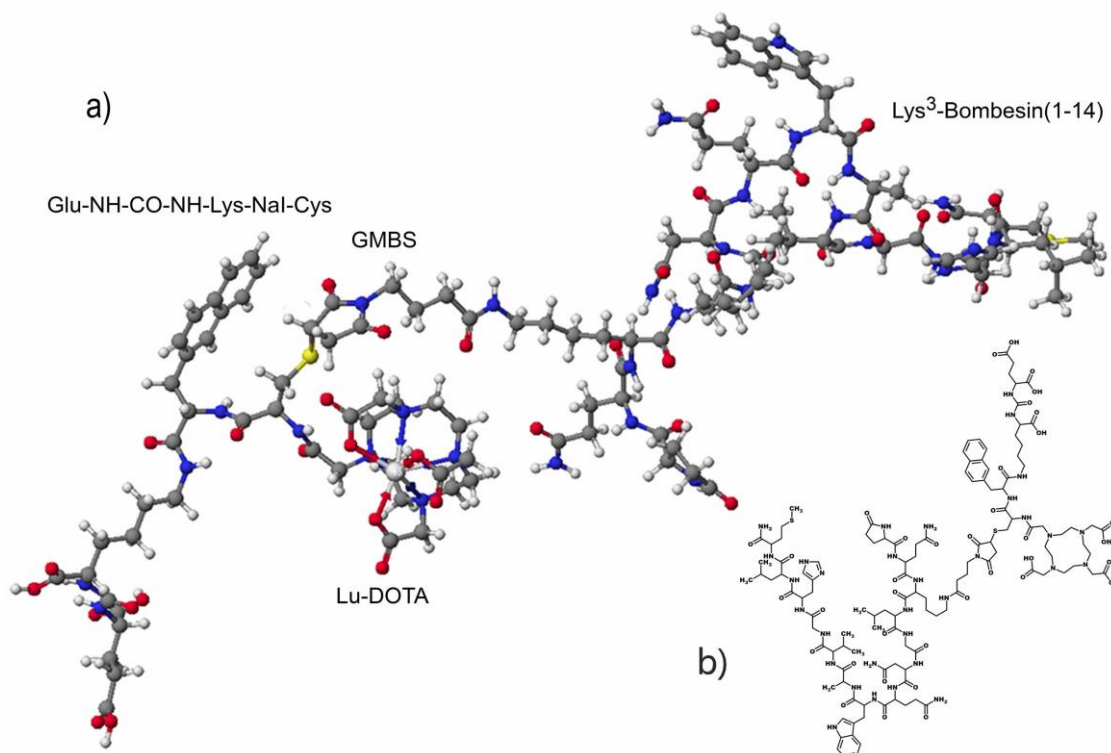
### Statistical analysis

The differences between the unblocked and blocked receptors were evaluated with Student's t-test. Data was indicated as mean  $\pm$  SD of the results of at least three independent replicas of each tested condition. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the effects of the different treatments on viability and on *in vivo* studies in the SUV<sub>max</sub>.

### Results and Discussion

The chemical structure of <sup>177</sup>Lu-iPSMA-BN was examined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), mass spectroscopy (MALDI-MS), <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) and reversed-phase HPLC. The spectroscopic characterization confirmed the presence of characteristic chemical structures in the molecule (Supplementary Material Section). For example, the FT-IR spectrum of iPSMA-BN (Suppl. Material, Fig. 2) exhibited the characteristic band of the C-N stretch vibration from urea at 1404 cm<sup>-1</sup>. The amide I and amide II region of the peptide displayed a shoulder at 1733 cm<sup>-1</sup> and a peak at 1533 cm<sup>-1</sup>. An intense band at 1646 cm<sup>-1</sup>, attributed to the C=O stretch vibration from the DOTA motif was observed. The mass spectrum revealed the molecular ion [M+2H]<sup>2+</sup> at m/z= 1382.8 and [M+3H]<sup>3+</sup> at m/z= 922.2. The fragment assigned to DOTA-iPSMA-GMBS (m/z= 1155.1) was also identified (Suppl. Material, Fig. 3). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum measured in D<sub>2</sub>O showed a signal at 8.4 ppm, corresponding to the histidine hydrogens of the BN chain; at 7.2-7.8 ppm, corresponding to the aromatic H of the  $\beta$ -naphthyl residues; at 4.3 ppm, corresponding to the urea stereocenters present in iPSMA and the  $\alpha$ -H of the carboxylic acids of DOTA, displayed at 3.3 ppm (Suppl. Material, Fig. 4). The synthesized

heterodimer was obtained with a chemical purity of >98%, as determined by reversed-phase HPLC (Suppl. Material, Fig. 5). Figure 1 and Table 1 shows the most stable conformer and chemical properties of the modeled Lu-iPSMA-BN.



**Figure 1.** a) The most stable conformer of the modeled Lu-DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys<sup>3</sup>-Bombesin (Lu-iPSMA-BN) molecule using Augmented MM3/CONFLEX procedures. (C=dark gray, H=white, O=red, N=blue, S=yellow, Lu=light gray). b) DOTA-iPSMA-BN chemical structure.

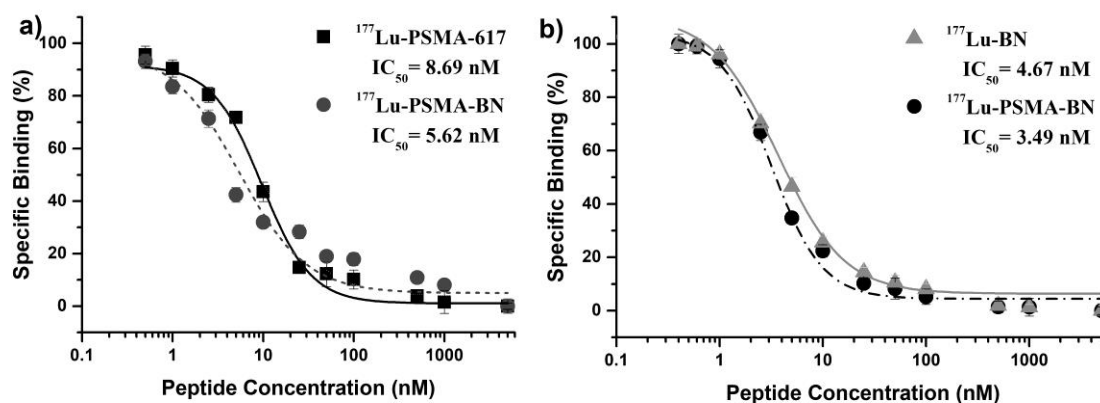
The radiochemical purity of <sup>177</sup>Lu-iPSMA-BN was 99± 1% (n=12), as obtained by reversed-phase radio-HPLC without post-labeling purification. The radiopharmaceutical demonstrated stability in human serum and protein binding of 1.88 %, 1.93%, 2.47% at 0.5, 3 and 24 h, respectively (Suppl. Material, Fig. 6). An important aspect of radiopharmaceuticals to be suitable for diagnostic and therapeutic applications is its stability in human serum, which allows a high concentration of intact radioligand for



receptor binding. The  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN heterodimer showed high metabolic stability in human serum after 24h of incubation. Therefore, remained available for binding.

Table 1. Calculated chemical properties of Lu-iPSMA-BN, Lu-BN and Lu-PSMA-617 using CAChe Work System Pro. Software.

<b>Calculations (kcal/mol)</b>	<b>Lu-iPSMA-BN</b>	<b>Lu-BN</b>	<b>Lu-PSMA-617</b>
Stretch	20.648	15.982	10.184
Stretch-Bend	0.877	0.683	1.196
Improper Torsion	13.361	14.108	0.375
Bend-Bend	2.083	1.785	0.841
Electrostatics	-270.016	-211.757	-197.887
Angle	101.601	82.941	36.20
Dihedral	43.581	51.799	32.247
Torsion Stretch	-4.161	-3.019	-1.925
Van der Waals	126.854	102.034	58.033
Hydrogen bond	-0.050	-8.855	27.07
Energy of the final structure	34.777	45.700	-33.663
Number of conformers	3	8	46
Energy of the most stable conformer	-157.939	-110.227	-47.371

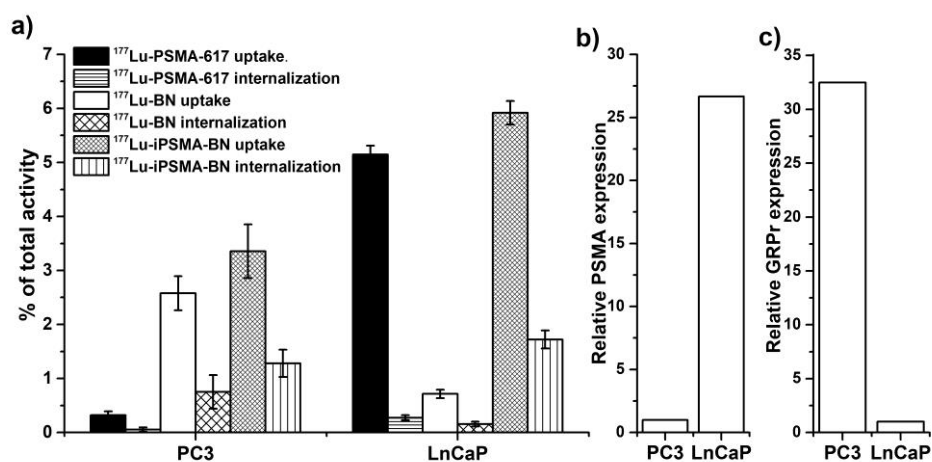


**Figure 2.** Competition assay of  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$ ,  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  and  $^{177}\text{Lu-BN}$  against unlabeled peptides (from 0.1 to 5,000 nM) in a) LNCaP and b) PC3 cells.

A competitive cell binding assay was carried out in order to estimate the  $\text{IC}_{50}$  values (Fig. 2) for  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$  and  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  in LNCaP cells and for  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$  and  $^{177}\text{Lu-BN}$  in PC3 cells. For the PSMA protein in LNCaP cells,  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$  showed an  $\text{IC}_{50}$  of  $5.62 \pm 1.54 \text{ nM}$ , which was in the same order of magnitude of  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  ( $\text{IC}_{50} = 8.69 \pm 1.13 \text{ nM}$ ) (Fig 2a). The affinity for PSMA increased by a factor of 1.5 (from 8.69 nM to 5.62 nM), which did not correlate with the behavior of the monomeric/heterodimeric compounds reported previously, where the  $\text{IC}_{50}$  value for the heterobivalent radiopharmaceutical decreased by a factor of 2.3 [12]. In terms of GRPr (Fig. 2b), the binding affinity of  $^{177}\text{Lu-BN}$  was  $4.67 \pm 0.71 \text{ nM}$  and  $3.49 \pm 0.36 \text{ nM}$  for  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$ , with a statistically significant difference between them ( $p < 0.05$ ).

The enhancement of affinity achieved by  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$  can be attributed to the presence of the  $\beta$ -naphthyl-alanine motif in the final structure and the stereo-chemical orientation of the heterobivalent radiopharmaceutical [20]. These biological results correlate with the stereochemistry obtained through the Augmented MM3 and CONFLEX semi-empirical procedure, which showed the formation of three conformers in the heterodimer

structure (Table 1). The energy of the improper torsion, which typically controls the affinity by strengthening the planar bonds, was lower for Lu-PSMA-617 (0.375 kcal/mol) than for the heterodimer radiopharmaceutical (13.361 kcal/mol). The interaction between BN-GRPr and iPSMA-PSMA on the cell surface mainly depends on the ability of BN or iPSMA to sterically fit into the motif of the receptor and on the electrostatically-formed charges [21]. The minimized energy conformer of the heterodimeric molecule (Fig. 1) shows a proper orientation without steric hindrance of the two active sites responsible for recognition by GRPr and PSMA proteins. The higher values of electrostatic interactions (Coulomb and dipole-dipole; -270.016 kcal/mol) and Van der Waals forces (126.854 kcal/mol) of the heterodimeric conformer with regard to those of the monomers could also be contributing to improve the molecular recognition.



**Figure 3.** Specific cell uptake and internalization of a)  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN in LNCaP and PC3 cells, with the relative b) PSMA expression and c) GRPr expression.

Cell uptake and internalization studies showed a statistically higher uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN compared with the  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 ( $p < 0.05$ ) in LNCaP cells. However, the uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN in PC3 cells was not statistically-significant compared with the

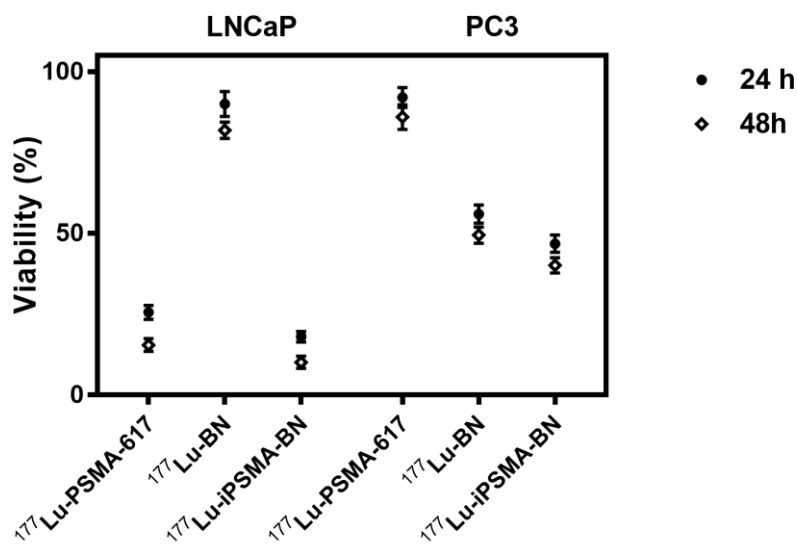
uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -BN ( $p>0.05$ ). PCR studies demonstrated that the PSMA expression level in LNCaP is approximately twenty-five-fold in comparison to PC3, and that the GRPr expression level in PC3 is thirty-two-fold in comparison to LNCaP, which correlated with the percentage of cell uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -radiopharmaceuticals regarding their specific recognition (Fig. 3). Moreover, this study shows that in the heterodimeric molecule, iPSMA specificity contributes considerably to the cell uptake (Fig. 3), in good agreement with the results previously reported[16].

As expected,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 showed the lowest cell internalization, possibly due to the influence of DOTA in the molecule, as Wüstemann *et al.* [11] have reported. However, the heterodimeric radiopharmaceutical was found to have a greater cell uptake and internalization in both cell lines than  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN (Fig. 3). Therefore, the increase in cell internalization of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN with regard to the monomers could be attributed to a steric shielding effect on DOTA due to its position in the center of the heterodimeric molecule, which reduced its biological interaction. As previously mentioned, the internalization of the theranostic  $^{177}\text{Lu}$  radionuclide is necessary to prolong the exposure of tumor cells to the beta particle emissions during decay.

The LNCaP and PC3 cancer cells used in this study overexpress practically only one of the phenotypes of interest for this research. However, prostate tumors overexpress more than one type of receptor, increasing the possibility that PSMA and GRP receptors could concomitantly recognize the  $^{177}\text{Lu}$  -iPSMA-BN ligand, producing a heterobivalent effect.

LNCaP and PC3 cells treated with  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN significantly reduced ( $p<0.05$ ) their viability (10.15% of cell viability in LNCaP and 40.10% of cell viability in PC3 at 48 h), with regard to the treatments with  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA (15.47% of cell viability in LNCaP) and

$^{177}\text{Lu}$ -BN (49.45% of cell viability in PC3, Fig. 4). However, a significantly lower effect on PC3 cell death was observed. A possible explanation could be the mitogenic effect activated by BN (agonist) on the PC3 cell line, stimulating cell proliferation through this pathway[22].



**Figure 4.** Two-way ANOVA results of the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN effect on LNCaP and PC3 cell viability. The cells without treatment (positive control) represents 100 % of viability. The cells treated with  $^{177}\text{LuCl}_3$  (negative control) represents the unspecific uptake subtracted from the treatments.

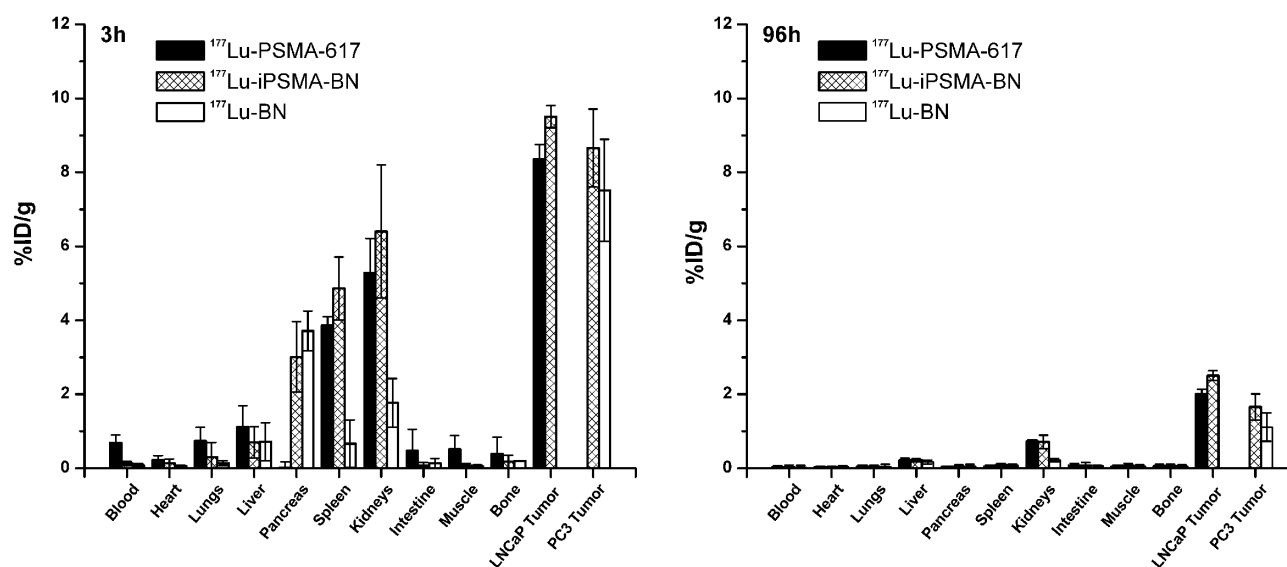
Heterodimeric PSMA-BN (antagonist) radiopharmaceuticals labeled mostly with  $^{68}\text{Ga}$  have been reported [10, 12]. In this study, it is the first time that the effect of a  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN (agonist) on human prostate cancer cell viability is reported. The use of  $^{177}\text{Lu}$  allows to have pharmacokinetic and dosimetric advantages due to the internalization of the theranostic radiopharmaceutical.

The renal excretion of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN in the LnCAP animal model resulted in  $6.41 \pm 1.82$  % at 3 h, this result was associated with the high expression of PSMA in renal tubules of mice [10-12, 23-25] and also influenced by the presence of Lys<sup>3</sup>-bombesin, which is

eliminated rapidly eliminated through urine [13]. The biodistribution profile at 3 h showed a %ID/g of tissue of  $6.41 \pm 1.82$  % for  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-BN,  $5.28 \pm 0.94$  % for  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $1.77 \pm 0.66$  % for  $^{177}\text{Lu}$ -BN. As can be seen in the Fig. 5, there is not significant difference in the renal uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-BN. However, a statistical difference was observed between  $^{177}\text{Lu}$ -BN compared with  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-BN. As expected, the renal excretion was higher for  $^{177}\text{Lu}$ -BN, mainly attributed to hydrophilicity and the size of the molecule. The high kidney uptake observed for  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-BN and  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 was associated with high reported expression of PSMA on renal tubules.

The lower kidney uptake is an advantage of the  $^{177}\text{Lu}$ -heterodimer, since it could significantly reduce the risk of nephrotoxicity in theranostic applications, based on the fact that the kidneys are the main dose-limiting organs during peptide-based radiotherapy [26]. At 96 h post-injection, Fig. 5 showed a renal uptake of  $0.23 \pm 0.14$  %, while at this time point, the uptake was  $5.2 \pm 0.55$  % ID/g and  $3.2 \pm 0.69$  % ID/g in LNCaP and PC3 tumors, respectively.

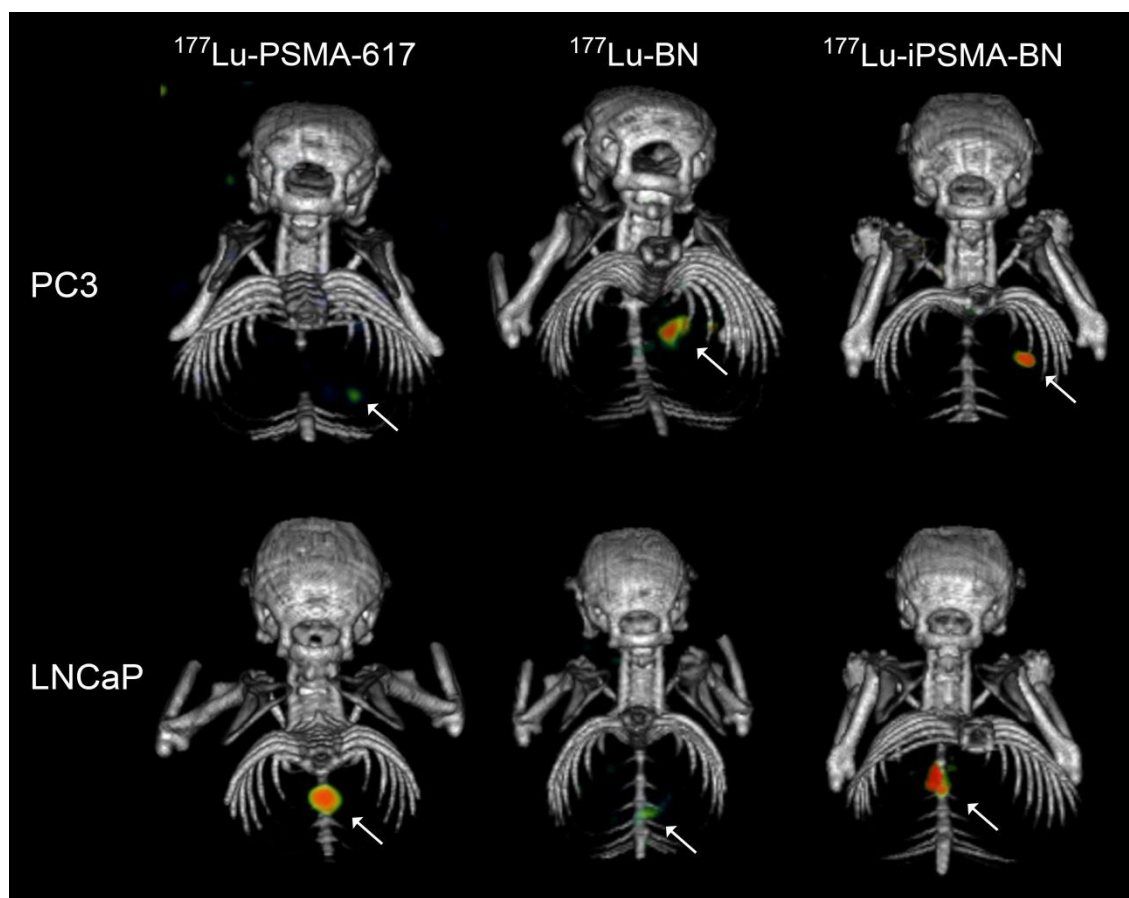
The spleen exhibited significant uptake also mediated by PSMA, in good agreement with the biological behavior for heterodimeric compounds previously reported [12]. Since GRPr are also expressed in the normal pancreas[27], high uptake in this organ is indicative of GRPr targeting for the  $^{177}\text{Lu}$ -BN and  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN due to the bombesin sequence present in both radiopharmaceuticals (Fig. 5)



**Figure 5.** Tissue distribution of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 and  $^{177}\text{Lu}$ -BN in LNCaP tumor-bearing mice. The specific binding *in vivo* is expressed as percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g) three hours and 96 hours post injection.

Preclinical imaging evaluation was performed in nude mice with LNCaP and PC3 tumors located in the lungs. The tumor lesion uptake was quantified using standardized uptake values ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ). Images of tumor-bearing mice showed a contrasting lung tumor reflecting targeted tracer accumulation. Typical images are shown in Figure 6. ANOVA results indicated a statistically-significant difference ( $P < 0.001$ ) among the radiopharmaceuticals and the cell types (Fig. 7). Between  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN and  $^{177}\text{Lu}$ -BN, the expected significant difference was not observed in PC3 tumors. This results show that after radiolabeling, the BN active site remains unchanged in the final structure ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN), which allows the system to keep its ability to bind GRPr, as previously reported for PC3 tumor using heterobivalent molecules [11]. A higher contribution from iPSMA on  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN uptake was not observed due to the small density of PSMA protein expression in PC3 tumor (Fig. 3).

Malignant lesion uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN was significantly higher than that of the monomers ( $^{177}\text{Lu}$ -BN or  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA). Also, it should be noted that the  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN was able to target the tumors of both cell lines, while the monomers were only able to target one of them (Fig. 6 and Fig. 7).

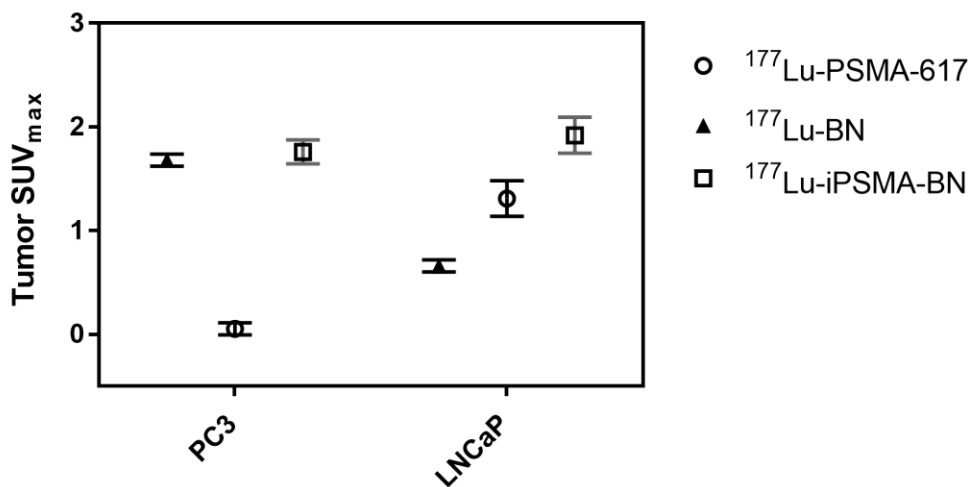


**Figure 6.** Micro SPECT/CT *in vivo* imaging in tumor-bearing athymic male nu/nu mice with LNCaP (PSMA-positive) and PC3 (GRPr-positive) metastatic tumor models at 24 h after  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN administration.

The distribution of PSMA and GRPr on the cell surface is a dynamic process, regulating the binding in multiple sites and therefore, the molecular effects (activation of cellular genetic circuits). Then, the combination of factors such as heterobivalence and a high local concentration of the heterodimeric radiopharmaceutical would result in an enhanced



capability to localize both molecular targets, which is consistent with the increased uptake of  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, compared to the corresponding monomers. This fact could also be explained by the induced internalization of PSMA and GRPr after their interaction with  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, enhancing the radiotheranostic properties.



**Figure 7.** Comparative analysis of the  $\text{SUV}_{\text{max}}$  of PC3 or LNCaP tumor-bearing mice, by a two-way ANOVA graphical representation for  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN,  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 or  $^{177}\text{Lu}$ -BN.

## Conclusions

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN was prepared with radiochemical purities >98%, as a stable and specific radiopharmaceutical to target PSMA and GRPr, and with suitable affinity to be used as a radiotheranostic agent.

## Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This research was approved by the CICUAL-ININ ethics committee (Internal committee of care and use of laboratory animals of the National Institute of Nuclear Research, Approval No. 01/02/2018).

## Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgements

This research was supported and carried out as part of the activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, (Mexican National Council of Science and Technology, CONACyT-LN-293334).”

## References

1. Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(5):C975-C81.
2. Santoni M, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Cascinu S, et al. Targeting prostate-specific membrane antigen for personalized therapies in prostate cancer: morphologic and molecular backgrounds and future promises. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014;28(4):555-63.
3. Jiménez- Mancilla N, Ferro- Flores G, Santos- Cuevas C, Ocampo- García B, Luna- Gutiérrez M, Azorín- Vega E, et al. Multifunctional targeted therapy system based on <sup>99m</sup>Tc/<sup>177</sup>Lu- labeled gold nanoparticles- Tat (49–57)- Lys3- bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *J Label Compd Radiopharm.* 2013;56(13):663-71.
4. Schroeder RP, Müller C, Reneman S, Melis ML, Breeman WA, de Blois E, et al. A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37(7):1386-96.

5. Varvarigou A, Bouziotis P, Zikos C, Scopinaro F, De Vincentis G. Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004;19(2):219-29.
6. Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Meléndez-Alafort L. Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. *Curr Pharm Anal.* 2006;2(4):339-52.
7. Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Zarandi M, Szepeshazi K, Armatis P, et al. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):49-57.
8. Heuser M, Schlott T, Schally A, Kahler E, Schliephake R, Laabs S, et al. Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J Urol.* 2005;173(6):2154-9.
9. Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer J-C, Gugger M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand  $^{125}\text{I}$ -[D-TYR<sup>6</sup>,  $\beta$ -ALA<sup>11</sup>, PHE<sup>13</sup>, NLE<sup>14</sup>] bombesin (6–14). *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):1139-46.
10. Liolios C, Schäfer M, Haberkorn U, Eder M, Kopka KJBC. Novel bispecific PSMA/GRPr targeting radioligands with optimized pharmacokinetics for improved PET imaging of prostate cancer. *Bioconjug Chem.* 2016;27(3):737-51.
11. Wüstemann T, Bauder-Wüst U, Schäfer M, Eder M, Benesova M, Leotta K, et al. Design of internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based radiotherapeutics. *Theranostics.* 2016;6(8):1085.

12. Eder M, Schäfer M, Bauder- Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K. Preclinical evaluation of a bispecific low- molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *Prostate*. 2014;74(6):659-68.
13. Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, et al. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-[Lys3] bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J Nucl Med*. 2004;45(8):1390-7.
14. Ray Banerjee S, Chen Z, Pullambhatla M, Lisok A, Chen J, Mease RC, et al. Preclinical comparative study of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC chelated radiotracers for targeting PSMA. *Bioconjug Chem*. 2016;27(6):1447-55.
15. Bandari RP, Jiang Z, Reynolds TS, Bernskoetter NE, Szczodroski AF, Bassuner KJ, et al. Synthesis and biological evaluation of copper-64 radiolabeled [DUPA-6-Ahx-(NODAGA)-5-Ava-BBN (7-14) NH<sub>2</sub>], a novel bivalent targeting vector having affinity for two distinct biomarkers (GRPr/PSMA) of prostate cancer. *Nucl Med Biol*. 2014;41(4):355-63.
16. Luna-Gutiérrez M, Hernández-Jiménez T, Serrano-Espinoza L, Peña-Flores A, Soto-Abundiz A. Freeze-dried multi-dose kits for the fast preparation of  $^{177}\text{Lu}$ -Tyr 3-octreotide and  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA (inhibitor) under GMP conditions. *J Radioanal Nucl Chem*. 2017;314(3):2181-8.
17. Ferro-Flores G, Luna-Gutiérrez M, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Azorín-Vega E, Jiménez-Mancilla N, et al. Clinical translation of a PSMA inhibitor for  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based SPECT. *Nuclear medicine and biology*. 2017;48:36-44.

18. Coin I, Beyermann M, Bienert M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature protocols*. 2007;2(12):3247-56. Epub 2007/12/15. doi: 10.1038/nprot.2007.454. PubMed PMID: 18079725.
19. Escudero-Castellanos A, Ocampo-García BE, Ferro-Flores G, Isaac-Olivé K, Santos-Cuevas CL, Olmos-Ortiz A, et al. Preparation and in vitro evaluation of <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical. *J Radioanal Nucl Chem*. 2017;314(3):2201-7.
20. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Mier W, et al. Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med*. 2015;56(6):914-20.
21. Bultinck P, De Winter H, Langenaeker W, Tollenare JP. *Computational medicinal chemistry for drug discovery*: CRC Press; 2003.
22. de Aguiar Ferreira C, Fuscaldi LL, Townsend DM, Rubello D, de Barros ALB. Radiolabeled bombesin derivatives for preclinical oncological imaging. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:58-72.
23. Wirtz M, Schmidt A, Schottelius M, Robu S, Günther T, Schwaiger M, et al. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity. *EJNMMI Res* 2018;8(1):84.
24. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Hull W-E, Wängler C, Mier W, et al. <sup>68</sup>Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem*. 2012;23(4):688-97.

25. Kuo H-T, Merkens H, Zhang Z, Uribe CF, Lau J, Zhang C, et al. Enhancing treatment efficacy of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 with the conjugation of an albumin-binding motif: preclinical dosimetry and endoradiotherapy studies. *Mol Pharm*. 2018.
26. Melis M, Krenning EP, Bernard BF, de Visser M, Rolleman E, de Jong M. Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nucl Med Biol*. 2007;34(6):633-41.
27. Lane SR, Nanda P, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa SD, Hoffman TJ, et al. Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists,  $^{64}\text{Cu}$ -NO<sub>2</sub>A-(X)-BBN (7–14) NH<sub>2</sub>, in a prostate tumor xenografted mouse model. *Nucl Med Biol*. 2010;37(7):751-61.

## 8. Resultados adicionales en su caso

### 8.1 Evaluación *in vitro* de $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD en células LNCaP y PC3.

#### 8.1.1 Captación celular e internalización.

En este estudio se muestra el comportamiento del radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD en contacto con células de cáncer prostático LNCaP (PSMA+, integrinas  $\alpha_v\beta_3^-$ ) y PC3 (PSMA-, integrinas  $\alpha_v\beta_3^+$ ). En la gráfica inferior se observa que en las células PC3 existe una captación mayor en presencia del radiofármaco heterobivalente y su monómero  $^{177}\text{Lu}$ -RGD, esto dado por la expresión diferencial de sus receptores. Por otro lado en las células LNCaP existe una captación mayor en presencia del radiofármaco heterobivalente y su monómero  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, por lo tanto iPSMA contribuye de manera considerable a la captación celular (Fig. 1), en concordancia con los resultados previamente reportados [23,31,51-53,57].

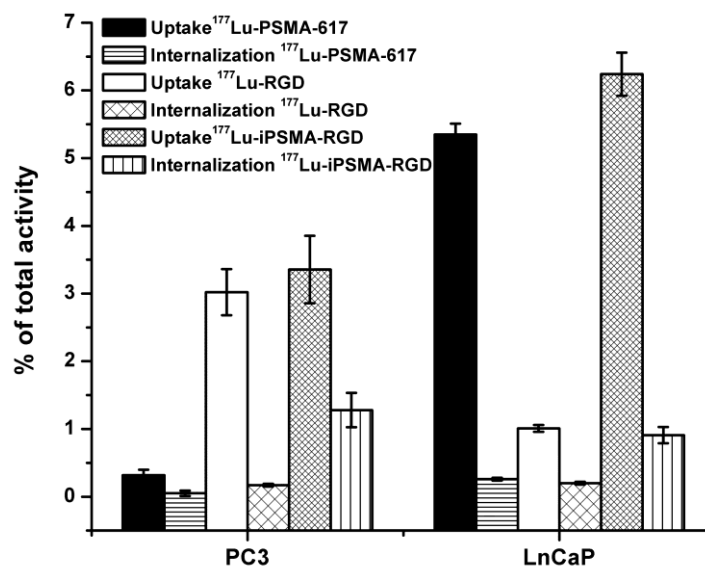


Fig. 1. Captación específica e internalización de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD y sus monómeros en células LNCaP and PC3.  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD (60 nM),  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 y  $^{177}\text{Lu}$ -RGD (30 nM).

### 8.1.2 Afinidad de unión IC<sub>50</sub>

La afinidad de <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD para PSMA ( $5.7 \pm 1.3 \text{ nM}$ ) fue 1.6 veces mayor que su monómero <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 ( $8.9 \pm 0.9 \text{ nM}$ ,  $p < 0.05$ ). En referencia a las integrinas  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$ , la afinidad de unión de <sup>177</sup>Lu-RGD fue  $6.2 \pm 1.2 \text{ nM}$  y  $4.5 \pm 0.7 \text{ nM}$  para <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD, con una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p < 0.05$ ). El radiofármaco <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD se unió de manera específica a los receptores PSMA e integrinas  $\alpha_{(v)}\beta_{(3)}$  con afinidad adecuada.

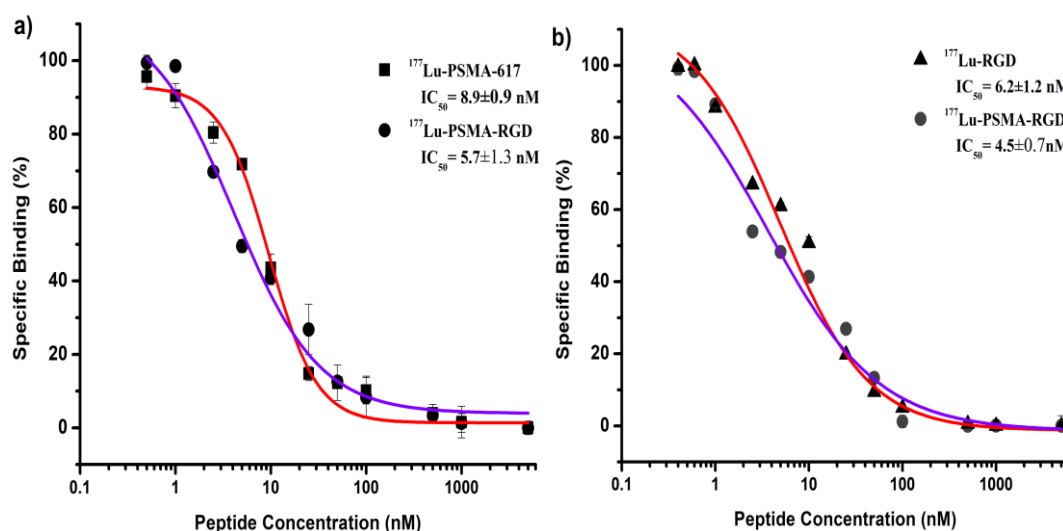


Fig. 2. Afinidad de unión IC<sub>50</sub>. <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD, <sup>177</sup>Lu-iPSMA or <sup>177</sup>Lu-RGD (0.2 nM), iPSMA y/o RGD (0 a 5  $\mu\text{M}$ ,  $n=3$ ). a) LNCaP, b) PC3.

### 8.1.3 Viabilidad celular

Después de la exposición de las células (LNCaP y PC3) al radiofármaco <sup>177</sup>Lu-iPSMA-RGD, el efecto de la viabilidad celular fue 2.5 veces más alto en las células LNCaP (18.61%) comparado con la viabilidad en células PC3 (47.07%).



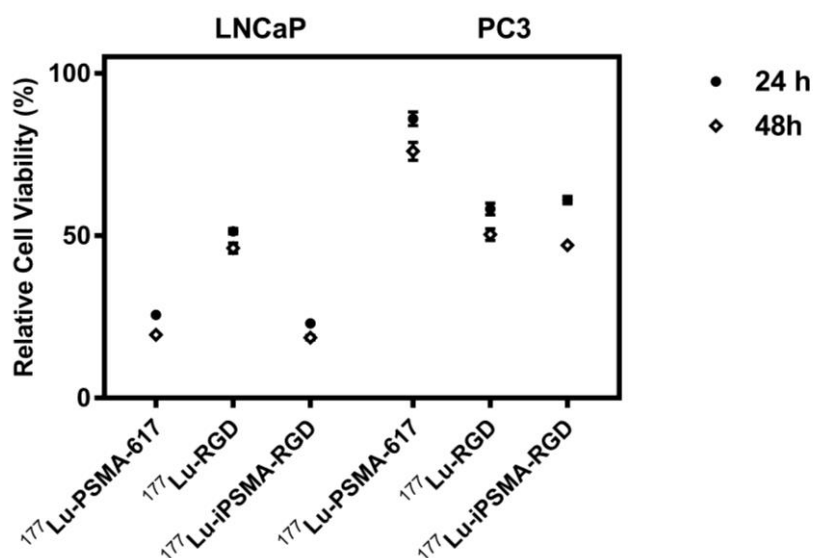


Fig. 3. Viabilidad celular. Células LNCaP y PC3 después de 24 h y 48 h de exposición al radiofármaco. Las células sin tratamiento (control +) representan el 100% de viabilidad. Las células expuestas a  $^{177}\text{LuCl}_3$  (control-) representan la captación inespecífica, la cual es restada en los tratamientos.

El radiofármaco heterodimérico fue capaz de unirse a los dos tipos de líneas celulares, mientras que los monómeros fueron capaces de unirse únicamente a un tipo de línea celular.

Entre  $^{177}\text{Lu-iPSMA-RGD}$  y sus monómeros correspondientes de acuerdo al tipo de línea celular ( $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$ , LNCaP y  $^{177}\text{Lu-RGD}$ , PC3) no existieron diferencias significativas, comportamiento que se atribuye a la preservación del sitio biológico activo de iPSMA y el RGD en la estructura final ( $^{177}\text{Lu-iPSMA-RGD}$ ), lo que permite al sistema mantener la habilidad de unirse a PSMA.

## 9. Discusión general

La estructura química de iPSMA-RGD e iPSMA-BN se examinó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de masas (MALDI-MS),  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz) y HPLC de fase reversa. La caracterización espectroscópica confirmó la presencia de estructuras químicas características en cada molécula. El heterodímero sintetizado  $^{177}\text{Lu-iPSMA-RGD}$  y  $^{177}\text{Lu-iPSMA-BN}$  se obtuvo con una pureza radioquímica de  $> 98\%$ , según lo determinado por HPLC de fase reversa.

En la evaluación *in vitro* en suero humano,  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD y  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN fueron altamente estables en suero humano después de 24 h, los resultados indican que los radiofármacos no son catabolizados significativamente en suero y, por lo tanto, tienen una estabilidad metabólica adecuada. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los cuales la fracción promedio en sangre es superior al 85% [51,52].

Para la evaluación *in vitro* de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD, en ensayos de competencia y saturación, se demuestra que este radiofármaco fue específicamente reconocido por PSMA y las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , con una afinidad adecuada para ser utilizado como un potencial radiofármaco radioterapéutico. Además, el conjugado heterobivalente también demostró la capacidad de afectar significativamente a la viabilidad de células U87MG, C6, LNCaP y PC3. Sin embargo, se observó un mayor efecto sobre la viabilidad en las células U87MG (~ 30% a las 48 h) con respecto a C6 (~ 80% a las 48 h). Y un mejor efecto en las células LNCaP (~ 20% a las 48 h) con respecto a PC3 (~ 45% a las 48 h) e inclusive mejor efecto que en las células U87MG, esto debido a la bien conocida, alta expresión de receptores PSMA en las células LNCaP. [53,54].

Teniendo en cuenta que las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y el receptor PSMA se sobreexpresan en la neovasculatura de tumores primarios y en lesiones metastásicas, se espera un efecto sinérgico o de reconocimiento dual *in vivo* del  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD por diferentes tumores sólidos.

Para la evaluación *in vitro* de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN en ensayos de competencia de unión celular se demostró que la afinidad por PSMA aumentó en un factor de 1.5. La mejora de la afinidad puede atribuirse a la presencia del motivo  $\beta$ -naftil-alanina en la estructura final y la orientación estereoquímica del radiofármaco heterobivalente [55]. La interacción entre BN-GRPr e iPSMA-PSMA en la superficie celular depende principalmente de la capacidad de la BN o iPSMA de ajustarse estéricamente al motivo del receptor y de las cargas formadas electrostáticamente [56]. El confórmero de energía mínima de la molécula heterodimérica, es decir el confórmero funcional, muestra una orientación adecuada sin impedimento estérico de los dos sitios activos responsables del reconocimiento por las proteínas GRPr y

PSMA. Los valores más altos de las interacciones electrostáticas (Coulomb y dipolo-dipolo) y las fuerzas de Van der Waals del conformador heterodimérico con respecto a las de los monómeros también podrían estar contribuyendo a mejorar el reconocimiento molecular.

Los estudios de captación celular e internalización mostraron una captación estadísticamente más alta de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN en comparación con  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 ( $p < 0.05$ ) en células LNCaP, en células PC3 no fue estadísticamente significativa en comparación con  $^{177}\text{Lu}$ -BN ( $p > 0,05$ ). Los estudios de PCR demostraron que el nivel de expresión de PSMA en LNCaP es aproximadamente veinticinco veces en comparación con PC3, y que el nivel de expresión de GRPr en PC3 es treinta y dos veces en comparación con LNCaP, lo que se correlacionó con el porcentaje de captación celular de los  $^{177}\text{Lu}$ -radiofármacos con respecto a su reconocimiento específico. Además, este estudio muestra que en la molécula heterodimérica, la especificidad de iPSMA contribuye considerablemente a la captación celular, de acuerdo con resultados reportados previamente [57].

El aumento en la internalización celular de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN con respecto a los monómeros podría atribuirse a un efecto de protección estérica en DOTA debido a su posición en el centro de la molécula heterodimérica, lo que reduce su interacción biológica. La internalización del radionúclido  $^{177}\text{Lu}$ -teranóstico, es necesario para prolongar la exposición de las células tumorales a las emisiones de partículas beta durante su decaimiento [58].

Las células LNCaP y PC3 tratadas con  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ) su viabilidad con respecto al control. Sin embargo, se observó un efecto significativamente menor sobre la muerte celular de PC3. Una posible explicación podría ser el efecto mitogénico activado por BN, en la línea celular PC3, estimulando la proliferación celular a través de esta vía [59] El uso de  $^{177}\text{Lu}$  permite tener ventajas farmacocinéticas y dosimétricas debido a la internalización del radiofármaco teranóstico.

En los estudios *in vivo* en ratones, la excreción renal de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN en el modelo animal resultó de la alta expresión de PSMA en los túbulos renales de ratones [32, 58, 60-63] y también influida por la presencia de Lys3-bombesina, que se elimina rápidamente a través de la orina [64].

La menor captación de riñón es una ventaja del  $^{177}\text{Lu}$ -heterodímero, ya que podría reducir significativamente el riesgo de nefrotoxicidad en aplicaciones teranósticas, debido al hecho de que los riñones son los principales órganos limitantes de la dosis durante la radioterapia basada en péptidos [65]. Todos los órganos exhibieron una captación significativa también mediada por PSMA, en buen acuerdo con el comportamiento biológico de los compuestos heterodiméricos reportados previamente.

Entre  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN y  $^{177}\text{Lu}$ -BN, la diferencia significativa no se observó en los tumores PC3. Estos resultados muestran que después del radiomarcado, el sitio activo de BN permanece sin cambios en la estructura final ( $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN), lo que permite que el sistema mantenga su capacidad de unirse a GRPr, como reportado previamente para el tumor PC3 utilizando moléculas heterobivalentes [58].

La captación de lesiones malignas de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN fue estadísticamente mayor en tumores LNCaP que la de los monómeros ( $^{177}\text{Lu}$ -BN o  $^{177}\text{Lu}$  iPSMA). Además, debe tenerse en cuenta que el radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$  iPSMA-BN pudo unirse a los tumores de ambas líneas celulares, mientras que los monómeros solo pudieron unirse a uno de ellos.

Los tumores de próstata sobreexpresan más de un tipo de receptor, lo que aumenta la posibilidad de que los receptores PSMA y GRP puedan reconocer concomitantemente el ligando  $^{177}\text{Lu}$  -iPSMA-BN, produciendo un efecto heterobivalente.

Además, es bien conocida la heterogenicidad intrínseca de los tumores humanos, así como los cambios en el fenotipo durante la progresión de la enfermedad, incluido el nivel diferente de expresión de los receptores de la superficie celular. Por lo tanto, el uso de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD como un radiofármaco de doble objetivo puede mejorar la sensibilidad de detección y, por lo tanto, las dosis de radiación absorbida durante la terapia.

Además, las moléculas heterobivalentes pueden mostrar propiedades sinérgicas como la mejora del potencial antiangiogénico de iPSMA-RGD que fue capaz de inhibir la fosforilación de VEGFR2 (bajo valor de pVEGFR2). Por lo tanto, el compuesto heterodimérico iPSMA-RGD mostró propiedades adecuadas para actuar sobre la vasculatura tumoral como una molécula antiangiogénica [66, 67].

La combinación de factores como la heterobivalencia y una alta concentración local del radiofármaco heterodimérico daría como resultado una capacidad mejorada para localizar ambas dianas moleculares, lo que es consistente con la mayor absorción de  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, en comparación con los monómeros correspondientes. Este hecho también podría explicarse por la internalización inducida de PSMA y GRPr después de su interacción con  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN, mejorando las propiedades radioteranósticas.

En la evaluación *in vitro* e *in vivo* de los radiofármacos  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD and  $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN hubo una adecuada captación celular y por lo tanto se observa la preservación de la afinidad hacia los receptores correspondientes. En los estudios de viabilidad celular se observa que ambos radiofármacos en contacto con las células provocan una adecuada muerte celular. El comportamiento en general fue similar a la de sus monómeros, lo que nos indica que no existen impedimentos estéricos que imposibiliten la unión del radiofármaco con los receptores correspondientes a nivel celular. La mejora estaría presente en tumores que presenten heterogeneidad de los receptores celulares como se explicó anteriormente, lo que podría mejorar en obtener un adecuado resultado en la captación a lo largo de la progresión de la enfermedad y no reportar falsos negativos, relacionados a una posible reducción de la expresión de algún determinado receptor en el tumor.

## 10. Conclusiones generales.

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD se obtuvo con purezas radioquímicas mayores a 98%, como un radiofármaco estable y específico para unión a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y el receptor PSMA con una afinidad adecuada para ser utilizado como agente radioterapéutico. La molécula heterobivalente iPSMA-RGD mostró potencial para inhibir la señalización de VEGFR2.

Sin embargo, los estudios preclínicos son necesarios para evaluar y determinar el potencial terapéutico de  $^{177}\text{Lu}$  iPSMA-RGD.

$^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-BN se obtuvo con purezas radioquímicas  $> 98\%$ , como un radiofármaco estable y específico para unirse a PSMA y GRPr, y con una afinidad adecuada para ser utilizado como agente radioteranóstico.

## 11. Referencias

- [1] Zerhoni, E.A. Translational and clinical science—time for a new vision. *N Engl J Med* 2005, 353: 1621-1623.
- [2] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11a Edición, Vol I y II, 2014.
- [3] Kinders R., et al. Phase 0 clinical trials in cancer drug development: from FDA guidance to clinical practice. *Molecular interventions*. 2007, 7: 325-334.
- [4] Marchetti S. and Schellens J.H.M. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *British Journal of Cancer*. 2007, 97: 577 – 581.
- [5] Kelloff G.J., et al. The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin. Cancer Res*. 2005, 11: 7967–7985.
- [6] Banerjee S., et al. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem. Rev*. 2015, 115: 2934-2974.
- [7] Ferlay J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015, 136: E359–386.
- [8] Jemal A., et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010, 60: 277–300.
- [9] Wei Q., et al. Global analysis of differentially expressed genes in androgen-independent prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2007, 10: 167–174.
- [10] Will, L., Sonni, I., Kopka, K., Kratochwil, C., Giesel, F. L., & Haberkorn, U. 2017. Radiolabeled prostate-specific membrane antigen small-molecule inhibitors. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging*: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of..., 61(2), 168-180.
- [11] Hillier SM, Maresca KP, Femia fJ, Marquis Jc, Foss Ca, Nguyen N, et al. Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane

antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. *Cancer Res.* 2009. 69:6932-40

[12] Zechmann CM, Afshar-Oromieh A, Armor T, Stubbs JB, Mier Whadaschik B, et al. Radiation dosimetry and first therapy results with a (124)I/(131)I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014.41:1280-92.

[13] Benesova M, Bauder-Wust u, Schafer M, Klika Kd, Mier W, Hhaberkorn U, et al. Linker Modification Strategies to Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-conjugated PSMA inhibitors. *J Med Chem.* 2016. 59:1761-75.

[14] Benesova M, Schafer M, Bauder-Wust u, afshar-orumieh a, Kratochwil c, Mier W, et al. Preclinical evaluation of a Tailor-Made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker Moiety for imaging and endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2015. 56:914-20.

[15] Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, Baum rP, yildiz a, Beykan S, et al. <sup>68</sup>Ga- and <sup>177</sup>Lu-labeled PSMA I&T: optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J Nucl Med.* 2015. 56:1169-76

[16] Cardinale J, Schafer M, Benesova M, Bauder-Wustu, Leotta K, Eder M, et al. Preclinical evaluation of [18f]PSMa-1007: a new PSMA ligand for Prostate Cancer Imaging. *J Nucl Med.* 2017 58:425-31.

[17] Ferro-Flores, G., de M Ramirez, F., Melendez-Alafort, L., & Santos-Cuevas, C. L.. Peptides for *in vivo* target-specific cancer imaging. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2010. 10(1), 87-97.

[18] Rajasekaran, A. K., Anilkumar, G., & Christiansen, J. J. (2005). Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(5), C975-C981.

[19] Kok, R. J., Schraa, A. J., Bos, E. J., Moorlag, H. E., Ásgeirsdóttir, S. A., Everts, M., ... & Molema, G. (2002). Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as  $\alpha\beta 3$  integrin directed therapeutics. *Bioconjugate chemistry*, 13(1), 128-135.

[20] Mitrasinovic, P.M. Advances in  $\alpha\beta 3$  integrin targeting cancer therapy and imaging with radiolabeled RGD peptides. *Curr. Radiopharm.* 2009. 2:214-219.

- [21] Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scopinaro, F., & De Vincentis, G. (2004). Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2004. 19(2): 219-229.
- [22] Arteaga de Murphy, C., & Ferro-Flores, G. Bombesina y bombesinas radiomarcadas: estado actual. *Rev. med. nucl. Alasbinn j*, 2005. 8(30).
- [23] Haubner, R.; Decristoforo, C. Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Front. Biosci.* 2009, 14: 872-886.
- [24] Krammer A, Lu H, Isralewitz B, Schulten B, Vogel V. Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals tensile molecular recognition switch. *Biophys*, 1999: 1351–1356.
- [25] Reubi, J. C., Wenger, S., Schmuckli-Maurer, J., Schaer, J. C., & Gugger, M. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers Detection with the Universal Radioligand  $^{125}\text{I}$ -[d-TYR6,  $\beta$ -ALA11, PHE13, NLE14] Bombesin (6–14). *Clinical Cancer Research*. 2002. 8(4), 1139-1146.
- [26] Atlas Genetic Oncology. GRPRID40759chXp22
- [27] O Laukkanen, M., & Domenica Castellone, M Gastrin-releasing peptide receptor targeting in cancer treatment: emerging signaling networks and therapeutic applications. *Current drug targets*. 2016. 17(5), 508-514.
- [28] Eder, M., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Haberkorn, U., Eisenhut, M., & Kopka, K. (2014). Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate*, 74(6), 659-668.
- [29] Shallal, H. M., Minn, I., Banerjee, S. R., Lisok, A., Mease, R. C., & Pomper, M. G. (2014). Heterobivalent agents targeting PSMA and integrin- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . *Bioconjugate chemistry*, 25(2), 393-405.
- [30] Ahmadzadehfar H., et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with  $^{177}\text{Lu}$ -DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res*. 2015, 5:36 doi: 10.1186/s13550-015-0114-2.
- [31] Santoni M., et al. Targeting prostate-specific membrane antigen for personalized therapies in prostate cancer: morphologic and molecular backgrounds and future promises. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014, 28: 555–563.



- [32] Eder M. et al.  $^{68}\text{Ga}$ -Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23: 688-697.
- [33] Schroeder R.P.J., et al. A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010, 37: 1386–1396.
- [34] Jiménez-Mancilla N., et al. Multifunctional targeted therapy system based on  $(^{99\text{m}}\text{Tc}/(^{177}\text{Lu})$ -labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys(3)-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2013, 56: 663-671.
- [35] Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scopinaro, F., & De Vincentis, G. (2004). Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals.* 2004. 19(2): 219-229.
- [36] Arteaga de Murphy, C., & Ferro-Flores, G. Bombesina y bombesinas radiomarcadas: estado actual. *Rev. med. nucl. Alasbimn j,* 2005. 8(30).
- [37] Santos-Cuevas, C. L., Ferro-Flores, G., de Murphy, C. A., Ramírez, F. D. M., Luna-Gutiérrez, M. A., Pedraza-López, M., ... & Ordaz-Rosado, D. Design, preparation, in vitro and in vivo evaluation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N 2 S 2-Tat (49–57)-bombesin: a target-specific hybrid radiopharmaceutical. *International journal of pharmaceutics.* 2009. 375(1), 75-83.
- [38] Varvarigou, A. D., Scopinaro, F., Leondiadis, L., Corleto, V., Schillaci, O., De Vincentis, G., ... & Xanthopoulos, S. Synthesis, chemical, radiochemical and radiobiological evaluation of a new  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled bombesin-like peptide. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals,* 2002. 17(3): 317-326.
- [39] Gali, H., Hoffman, T. J., Sieckman, G. L., Owen, N. K., Katti, K. V., & Volkert, W. A. Synthesis, characterization, and labeling with  $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  of peptide conjugates containing a dithia-bisphosphine chelating agent. *Bioconjugate chemistry.* 2001. 12(3): 354-363.
- [40] Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C., Meléndez-Alafort, L. Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. *Current Pharmaceutical Analysis.* 2006. 2(4): 339-352.
- [41] Stangelberger, A., Schally, A. V., Varga, J. L., Zarandi, M., Szepeshazi, K., Armatis, P., & Halmos, G. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-

releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clinical Cancer Research*. 2005. 11(1), 49-57.

[42] Heuser, M., Schlott, T., Schally, A. V., Kahler, E., Schliephake, R., Laabs, S. O., & Hemmerlein, B. Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *The Journal of urology*. 2005. 173(6), 2154-2159.

[43] Melendez-Alafort, L., Ferro-Flores, G., Arteaga-Murphy, C., Pedraza-Lopez, M., Gonzalez-Zavala, M. A., Tendilla, J. I., & García-Salinas, L. Labeling peptides with rhenium-188. *International journal of pharmaceutics*. 1999. 182(2): 165-172.

[44] Corti, A., & Curnis, F. (2011). Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin–ligand recognition. *J Cell Sci*, 124(4), 515-522.

[45] Ortiz-Arzate Z., et al. Kit preparation and biokinetics in women of  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub> for breast cancer imaging. *Nucl Med Commun*. 2014, 35: 423-432.

[46] Liu, S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin  $\alpha\beta 3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjugate chemistry*, 2009. 20(12): 2199-2213.

[47] Luna-Gutiérrez, M., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Jiménez-Mancilla, N., Morales-Avila, E., León-Rodríguez, D., & Isaac-Olivé, K. 2012.  $^{177}\text{Lu}$ -labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing  $\alpha$  (v)  $\beta$  (3) integrins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2012. 55(4): 140-148.

[48] Montet, X., et al. Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. *J. Med. Chem*. 2006. 49: 6087-6093.

[49] Li, Z, et al.  $^{64}\text{Cu}$ -labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor integrin  $\alpha\beta 3$  expression. *J. Nucl. Med*. 2007. 48: 1162-1171.

[50] Morales-Avila, E., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B. E., De León-Rodríguez, L. M., Santos-Cuevas, C. L., García-Becerra, R., ... & Gómez-Oliván, L. Multimeric system of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled gold nanoparticles conjugated to c [RGDfK (C)] for molecular imaging of tumor  $\alpha$  (v)  $\beta$  (3) expression. *Bioconjugate chemistry*. 2011. 22(5), 913-922.

- [51]Ferro-Flores G, Luna-Gutiérrez M, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Azorín-Vega E, Jiménez-Mancilla N, Orocio-Rodríguez E, Davanzo J, García-Pérez FO (2017) Clinical translation of a PSMA inhibitor for  $^{99m}\text{Tc}$ -based SPECT. *Nucl Med Biol* 48:36-44
- [52]Decristoforo C, Gonzalez IH, Carlsen J, Rupprich M, Huisman M, Virgolini I, Wester H-J, Haubner R (2008)  $^{68}\text{Ga}$ -and  $^{111}\text{In}$ -labelled DOTA-RGD peptides for imaging of  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (8):1507-1515
- [53] Shallal HM, Minn I, Banerjee SR, Lisok A, Mease RC, Pomper MG (2014) Heterobivalent agents targeting PSMA and integrin- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . *Bioconjug Chem* 25 (2):393-405
- [54] Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K (2014) Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate* 74 (6):659-668
- [55] Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Mier W, et al. Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med*. 2015;56(6):914-20.
- [56] Bultinck P, De Winter H, Langenaeker W, Tollenare JP. *Computational medicinal chemistry for drug discovery*: CRC Press; 2003.
- [57] Luna-Gutiérrez M, Hernández-Jiménez T, Serrano-Espinoza L, Peña-Flores A, Soto-Abundiz A. Freeze-dried multi-dose kits for the fast preparation of  $^{177}\text{Lu}$ -Tyr 3-octreotide and  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA (inhibitor) under GMP conditions. *J Radioanal Nucl Chem*. 2017;314(3):2181-8.
- [58] Wüstemann T, Bauder-Wüst U, Schäfer M, Eder M, Benesova M, Leotta K, et al. Design of internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based radiotherapeutics. *Theranostics*. 2016;6(8):1085.
- [59] de Aguiar Ferreira C, Fuscaldi LL, Townsend DM, Rubello D, de Barros ALB. Radiolabeled bombesin derivatives for preclinical oncological imaging. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:58-72.
- [60] Liolios C, Schäfer M, Haberkorn U, Eder M, Kopka KJBc. Novel bispecific PSMA/GRPr targeting radioligands with optimized pharmacokinetics for improved PET imaging of prostate cancer. *Bioconjug Chem*. 2016;27(3):737-51.

- [61] Eder M, Schäfer M, Bauder Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K. Preclinical evaluation of a bispecific low molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *Prostate*. 2014;74(6):659-68.
- [62] Wirtz M, Schmidt A, Schottelius M, Robu S, Günther T, Schwaiger M, et al. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity. *EJNMMI Res* 2018;8(1):84.
- [63] Kuo H-T, Merkens H, Zhang Z, Uribe CF, Lau J, Zhang C, et al. Enhancing treatment efficacy of <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 with the conjugation of an albumin-binding motif: preclinical dosimetry and endoradiotherapy studies. *Mol Pharm*. 2018.
- [64] Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, et al. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with <sup>64</sup>Cu-DOTA-[Lys3] bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J Nucl Med*. 2004;45(8):1390-7.
- [65] Melis M, Krenning EP, Bernard BF, de Visser M, Rolleman E, de Jong M. Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nucl Med Biol*. 2007;34(6):633-41.
- [66] Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML (2010) Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol* 188 (4):595-609
- [67] Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodivala-Dilke KM (2009) Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* 15 (4):392-40

## 12. Anexos

## 12.1 CRONOGRAMA

Actividad	2017A	2017B	2018A	2018B	2019A	2019B
	1-6	7-12	12-18	19-24	25-30	31-36
Revisión bibliográfica y Redacción de Tesis.	X	X	X	X	X	X
Preparación del radiofármaco monomérico $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA (control).	X					
Síntesis y caracterización química del conjugado iPSMA-RGD.	X	X				
Obtención del radiofármaco $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD (Pureza radioquímica > 98%).	X	X				
Síntesis y caracterización química del conjugado iPSMA-Bombesina.		X				
Obtención del radiofármaco $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina (Pureza radioquímica > 98%).		X	X			
Evaluación de la estabilidad de $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD.		X	X			
Evaluación de la captación específica y afinidad <i>in vitro</i> de $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-Bombesina y $^{177}\text{Lu}$ -iPSMA-RGD (LNCaP y PC3).		X	X			
Obtención de la dosimetría celular y evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la radiación beta de los radiofármacos sobre la proliferación celular.		X	X			
Redacción y envío del primer artículo			X			
Obtención de los modelos radiofarmacocinéticos de la biodistribución de los radiofármacos en ratones atómicos.			X	X		
Obtención de imágenes nucleares de los radiofármacos, en ratones atómicos.				X	X	
Redacción y envío del segundo artículo					X	
Sumisión de Tesis y examen recepcional para la obtención del grado de doctor en ciencias de la salud.						X

**12.2 PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN**  
**Asistencia y presentación de trabajo en el ISTR 2019 (International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals), Viena, Austria**



**IAEA**

*Atoms for Peace and Development*

الوكالة الدولية للطاقة الذرية

国际原子能机构

International Atomic Energy Agency

Agence internationale de l'énergie atomique

Международное агентство по атомной энергии

Organismo Internacional de Energía Atómica

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria

Phone: (+43 1) 2600 • Fax: (+43 1) 26007

Email: [Official.Mail@iaea.org](mailto:Official.Mail@iaea.org) • Internet: <https://www.iaea.org>

In reply please refer to **CN-276**

Dial directly to extension: (+43 1) 2600-21321

1 November 2019

*TO WHOM IT MAY CONCERN*

This is to certify that Ms Alondra Escudero-Castellanos from Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Mexico, attended the **International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, ISTR 2019**, which took place at the IAEA's Headquarters in Vienna, Austria, from **28 October to 1 November 2019**.



Julie Zellinger

Conference Services Section

Division of Conference and Document Services

Premio “Investigador Joven” por el segundo lugar obtenido en la presentación de trabajo de investigación en la modalidad poster, en el ISTR 2019, Viena, Austria

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
TRENDS IN RADIOPHARMACEUTICALS  
#ISTR2019  
28 October – 1 November 2019

**CERTIFICATE FOR THE YOUNG  
INVESTIGATOR AWARD**

The International Atomic Energy Agency recognizes  
*Ms Alondra Escudero-Castellanos*

For her outstanding performance and for winning the second place at the ISTR 2019  
Poster Presentation Competition for Young Investigators




*Mr João Alberto Osso Júnior*  
Symposium Scientific Secretary  
Radioisotope Products and Radiation Technology Section  
Department of Nuclear Sciences and Applications






## Solicitud de patente nacional “(Lys<sup>3</sup>)BN-iPSMA radiomarcada para el reconocimiento dual de las proteínas PSMA y GRPr *in vivo*” MX/E/2019/071992

<b>gob mx</b>
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

### Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad o de Registro de Diseño Industrial

<table border="1"> <tr> <th>Homoclave del formato</th> </tr> <tr> <td>IMPI-00-009</td> </tr> <tr> <th>Fecha de publicación del formato en el DOF</th> </tr> <tr> <td>03 / 09 / 2019</td> </tr> </table>	Homoclave del formato	IMPI-00-009	Fecha de publicación del formato en el DOF	03 / 09 / 2019	<table border="1"> <tr> <th>Folio y Fecha de Recepción</th> </tr> <tr> <td> <p>INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisiva de Patentes</p> <p>Solicitud: MX/a/2019/012648 Expediente: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Fecha: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Folio: MX/E/2019/071992 682844</p>  </td> </tr> </table>	Folio y Fecha de Recepción	<p>INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisiva de Patentes</p> <p>Solicitud: MX/a/2019/012648 Expediente: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Fecha: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Folio: MX/E/2019/071992 682844</p> 
Homoclave del formato							
IMPI-00-009							
Fecha de publicación del formato en el DOF							
03 / 09 / 2019							
Folio y Fecha de Recepción							
<p>INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisiva de Patentes</p> <p>Solicitud: MX/a/2019/012648 Expediente: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Fecha: 23/OCT/2019 Hora: 12:30:45 Folio: MX/E/2019/071992 682844</p> 							
<table border="1"> <tr> <th>Datos generales de la solicitud</th> </tr> <tr> <td> <p>Marcar con una X sólo una opción</p> <p><input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:</p> <p><input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial</p> </td> </tr> </table>	Datos generales de la solicitud	<p>Marcar con una X sólo una opción</p> <p><input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:</p> <p><input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial</p>					
Datos generales de la solicitud							
<p>Marcar con una X sólo una opción</p> <p><input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> PCT</p> <p><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:</p> <p><input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial</p>							

Datos generales del o de los solicitante(s)																	
<table border="1"> <tr> <th>Personas físicas</th> </tr> <tr> <td>CURP (opcional):</td> </tr> <tr> <td>Nombre(s):</td> </tr> <tr> <td>Primer apellido:</td> </tr> <tr> <td>Segundo apellido:</td> </tr> <tr> <td>Nacionalidad:</td> </tr> <tr> <td>Teléfono (lada, número, extensión):</td> </tr> <tr> <td>Correo electrónico:</td> </tr> <tr> <td> <input type="radio"/> El solicitante es el inventor <input type="radio"/> Continúa en anexo         </td> </tr> </table>	Personas físicas	CURP (opcional):	Nombre(s):	Primer apellido:	Segundo apellido:	Nacionalidad:	Teléfono (lada, número, extensión):	Correo electrónico:	<input type="radio"/> El solicitante es el inventor <input type="radio"/> Continúa en anexo	<table border="1"> <tr> <th>Personas morales</th> </tr> <tr> <td>RFC (opcional): INI790127252</td> </tr> <tr> <td>Denominación o razón social: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES</td> </tr> <tr> <td>Nacionalidad: MEXICANA</td> </tr> <tr> <td>Teléfono (lada, número, extensión): 53297200,13871</td> </tr> <tr> <td>Correo electrónico: blanca.ocampo@inin.gob.mx </td> </tr> <tr> <td><input type="radio"/> Continúa en anexo</td> </tr> </table>	Personas morales	RFC (opcional): INI790127252	Denominación o razón social: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES	Nacionalidad: MEXICANA	Teléfono (lada, número, extensión): 53297200,13871	Correo electrónico: blanca.ocampo@inin.gob.mx 	<input type="radio"/> Continúa en anexo
Personas físicas																	
CURP (opcional):																	
Nombre(s):																	
Primer apellido:																	
Segundo apellido:																	
Nacionalidad:																	
Teléfono (lada, número, extensión):																	
Correo electrónico:																	
<input type="radio"/> El solicitante es el inventor <input type="radio"/> Continúa en anexo																	
Personas morales																	
RFC (opcional): INI790127252																	
Denominación o razón social: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES																	
Nacionalidad: MEXICANA																	
Teléfono (lada, número, extensión): 53297200,13871																	
Correo electrónico: blanca.ocampo@inin.gob.mx 																	
<input type="radio"/> Continúa en anexo																	

Domicilio del o de los solicitante(s)	
Código postal: 52750	
Calle: Carretera México-Toluca	
<small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Avila Camacho, Calzada, Corredor, etc.)</small>	
Número exterior: s/n	Número interior:
Colonia: La marquesa	
<small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sector, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Ocoyoacac	Localidad:
Entidad Federativa: Estado de México	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)	
CURP (opcional): FFG630516MDFRLL06	
Nombre(s): GUILLERMINA	
Primer apellido: FERRO	
Segundo apellido: FLORES	
Nacionalidad: MEXICANA	



**Solicitud de patente (PCT) “(Lys<sup>3</sup>)BN-iPSMA radiomarcada para el  
reconocimiento dual de las proteínas PSMA y GRPr *in vivo*”**

**PCT/MX2019/000025**

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2019/177449  
PCT/MX2019/000025

**ADVANCE E-MAIL**

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF  
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH  
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT  
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

FERRO FLORES, Guillermina  
Carretera México-Toluca S/N  
La Marquesa  
Ocoyoacac, Estado de México, 52750  
MEXIQUE

Date of mailing ( <i>day/month/year</i> ) 17 October 2019 (17.10.2019)		<b>IMPORTANT NOTICE</b>	
Applicant's or agent's file reference			
International application No. PCT/MX2019/000025	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 07 March 2019 (07.03.2019)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 14 March 2018 (14.03.2018)	
Applicant INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES			
<p>1. <b>ATTENTION:</b> For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), <b>does apply</b>, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).</p> <p>2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, <b>does not apply</b>, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below: 19 September 2019 (19.09.2019)</p> <p style="text-align: center;">None</p> <p>In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).</p> <p>3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, <b>does not apply</b>, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :</p> <p style="text-align: center;">LU, TZ</p> <p>In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.</p> <p>4. <b>TIME LIMITS for entry into the national phase</b></p> <p>For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of <b>19 months</b> from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, <b>subject to what is said in the following paragraph</b>, be <b>20 MONTHS</b> from the priority date.</p> <p>In practice, <b>time limits other than the 20-month time limit</b> will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For <b>regular updates on the applicable time limits</b> (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the <i>PCT Gazette</i>, the <i>PCT Newsletter</i> and the <i>PCT Applicant's Guide</i>, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <a href="http://www.wipo.int/pct/en/index.html">http://www.wipo.int/pct/en/index.html</a>.</p> <p>It is the applicant's <b>sole responsibility</b> to monitor all these time limits.</p>			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Authorized officer  Simin Baharlou	
Facsimile No. +41 22 338 82 70		e-mail: <a href="mailto:pct.team9@wipo.int">pct.team9@wipo.int</a>	