

Estudio comparativo de complejos tricarbonílicos de fluconazol y voriconazol en infecciones fúngicas

Leticia Fernández¹, Laura Reyes¹, Ana María Rey Ríos¹, Mariella Terán¹.

1 - Cátedra de Radioquímica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay..

Resumen

Entre las opciones más utilizadas para el diagnóstico de infecciones mediante imágenes encontramos radiografías, ultrasonido, CT, MRI complementados con leucocitos marcados u otros radiofármacos que proporcionan información anatómica y funcional para localizar los focos. Sin embargo no siempre conducen a una interpretación clínica sencilla y fiable debido a una baja especificidad y sensibilidad. En este trabajo se presentan los resultados del estudio comparativo del marcado de dos antifúngicos: Fluconazol y Voriconazol como posibles agentes de diagnóstico. La metodología utilizada es la sustitución a partir del precursor triaquotricarboniltecnecio(I). Se trabajó con modelos animales de ratones CD1 con lesiones causadas por inflamación estéril, infección por *Candida albicans* y por *Aspergillus niger*. Los resultados biológicos muestran que ambos complejos presentan buena especificidad en la diferenciación de inflamación y de infección. Las imágenes centellográficas, sin embargo, no logran alcanzar una sensibilidad adecuada para la detección de estos dos procesos.

Palabras clave: Voriconazol, Fluconazol, ^{99m}Tc, tricarbonilo, infección, HIV, *Cándida*, *Aspergillus*.

Abstract

Widely used options for infection detection include traditional imaging procedures like X-ray, ultrasound, CT, MRI complemented with labeled leukocytes or other radiopharmaceuticals which provide anatomic and functional information to localize the foci. However, these methods not always lead to reliable clinical interpretation due to their low specificity and sensitivity. This paper shows the results of a comparative study of two radiolabeled antifungal compounds: Fluconazole and Voriconazole as potential diagnostic agents. Labeling was performed using Triaquotricarbonyltechnetium(I) as precursor, followed by substitution with ligands of interest. Biological studies were performed using CD1 mice and injury models were sterile inflammation, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* infections. Results show that both complexes present good specificity in differentiating inflammation and infection. Nevertheless, scintigraphic images fail to achieve adequate sensitivity for the detection of these two processes.

Key words: Voriconazole, Fluconazole, ^{99m}Tc, tricarbonyl, infection, HIV, *Candida*, *Aspergillus*.

Introducción

Las enfermedades infecciosas en pacientes con supresión inmunológica avanzada, ya sea causada por cirugías, co-infecciones virales, HIV o exposición ambiental suelen ser difíciles de manejar, con un claro impacto tanto en el tiempo de estadía hospitalaria como en el tratamiento y los resultados clínicos finales. Las infecciones por *Cándida* spp y *Aspergillus* spp son las causas más frecuentes de micosis invasivas. Los métodos de diagnóstico más usados son el hemocultivo y las técnicas basadas en el sistema antígeno-anticuerpo, pero aun así son subóptimos, llevando a retrasos en el inicio de las terapias antifúngicas. Esto tiene como consecuencia que a pesar de contarse con varios antifúngicos de última generación, los índices de mortalidad siguen siendo muy elevados⁽¹⁻⁷⁾.

El diseño y desarrollo de nuevos radiofármacos para centellografía de infecciones está basado en la definición y descripción de las propiedades ideales para esta categoría. Estos compuestos deben tener alta sensibilidad para infección/ inflamación y capacidad de diferenciar entre infección aguda y crónica. Asimismo deben tener alta especificidad, rápida depuración sanguínea y escasa captación gastrointestinal. Por último deben ser fáciles de preparar, económicos y fácilmente asequibles. Se ha trabajado mucho en estas líneas y es así que algunas mejoras importantes en las técnicas nucleares SPECT y PET para detectar

infecciones incluyen el radiomarcado de antifúngicos, antibióticos, anticuerpos monoclonales, péptidos quimotáticos, liposomas y agentes mediados por avidina. Entre los agentes antimicrobianos que pueden ser radiomarcados se encuentran los grupos de antifúngicos como azoles, equinocandinas y anfotericina; estos pueden ser marcados con un agente emisor gamma que permita la detección de los focos de infección⁽⁸⁻¹²⁾.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo del comportamiento fisicoquímico y biológico de los complejos radiomarcados de los antifúngicos fluconazol y voriconazol como potenciales agentes para el diagnóstico de infecciones mediante centellografía gamma.

El fluconazol (F) es un antifúngico ampliamente utilizado. Como otros triazoles, tiene 2 anillos conteniendo 3 átomos de nitrógeno; el anillo bencénico a su vez posee 2 átomos de flúor (fig. 1a). Su estructura simétrica y polar favorece la hidrosolubilidad; es una base extremadamente débil (pKa 3,7) y no es ionizable a pH fisiológico. Su forma de acción es a través de la inhibición de la enzima citocromo P₄₅₀ 14 α -demetilasa, requerida para la síntesis del ergosterol; esta enzima es fundamental para la producción y mantenimiento de la pared celular fúngica. El fluconazol puede asociarse a los sitios activos de la enzima mediante enlaces de hidrógeno entre su grupo OH y el grupo C=O de la enzima.

El voriconazol (V) es un antifúngico de amplio espectro generalmente utilizado para el tratamiento de infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos. Se trata de un triazol de segunda generación, que inhibe la enzima citocromo P₄₅₀ 14 α -demethylasa (fig. 1b)⁽¹³⁻¹⁶⁾.

Dado que ambos antifúngicos cuentan con aminas aromáticas, son capaces de unirse al complejo precursor fac-^{[99mTc] [(CO)₃(H₂O)₃]+}, el cual es ampliamente utilizado debido a sus ventajas de fácil preparación y estabilidad química.

El triaquotricarboniltecnecio(I) fac-^{[99mTc] [(CO)₃(H₂O)₃]+} es un complejo desarrollado por Alberto et al⁽¹⁷⁾, que puede ser utilizado como precursor de una variedad importante de compuestos. Este precursor cuenta con 3 posiciones de coordinación ocupadas por moléculas de CO fuertemente unidas al metal. El intenso campo ligando resultante, conjuntamente con la configuración electrónica d⁶ de bajo spin del metal, favorece el estado de oxidación +1 y previene que ocurran otras reacciones de oxidación-reducción. El resto de las posiciones de coordinación está ocupado por 3 moléculas de agua débilmente unidas, las que pueden reemplazadas por átomos donores con gran afinidad por el metal. Existe una gama amplia de posibilidades, desde grupos duros e hidrofílicos basados en ácidos carboxílicos y aminas alifáticas, hasta otros blandos y lipofílicos, preferentemente aminas aromáticas. La ventaja de este tipo de core radica en que las tres posiciones que quedan libres para la sustitución se pueden coordinar con varios ligandos (mono, bi o tridentados) formando distintos tipos de conjugados. La síntesis de los complejos tricarbónicos de fluconazol y voriconazol puede realizarse mediante la sustitución directa de moléculas de agua del precursor por los ligandos de interés⁽¹⁷⁻²⁵⁾.

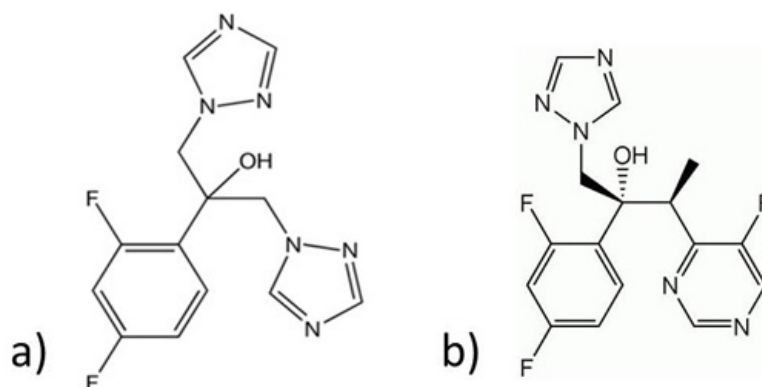


Figura 1. a) Fluconazol: 2 - (2,4-Difluoro-fenyl) -1,3-bis (1H-1 ,2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol. b) Voriconazole: 2 - (2,4-Difluoro-phenyl) - 3- (fluoropyrimidin-4-yl)-1- [1,2,4] triazol-1-yl-butan-2-ol.

Material y Método

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de pureza analítica adecuada, los solventes orgánicos fueron de grado HPLC. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada, se filtraron a través de membranas Millipore 0,22 μ m y se desgasificaron en baño de ultrasonido.

El ^{99m}TcNaTcO₄ se eluyó de un generador comercial (Tecnuclear, Argentina). Los complejos tricarbónicos se obtuvieron mediante una ruta de síntesis en dos etapas. La primera etapa consistió en la preparación del precursor, fac-^{[99mTc] (CO)₃(H₂O)₃+} de acuerdo con lo descrito por Alberto et al.¹⁷⁻¹⁸, brevemente borohidruro de sodio (7,0 mg), tartrato de sodio y potasio (20 mg) y carbonato de sodio (4,0 mg) bajo atmósfera de CO(g) con posterior agregado de ^{99m}TcO₄Na (740 MBq, 20mCi) e incubación a 60-70 °C durante 30 min. Su pureza radioquímica fue controlada mediante HPLC de fase reversa con una columna Phenomenex C18-LUNA (5 μ m, 150 x 4,60 mm), flujo 1,0 mL/min y como fase móvil metanol y una solución de H₃PO₄(aq) llevada a pH 2,5 con trietilamina; los gradientes se muestran en la tabla 1.

Después del calentamiento, el complejo se neutralizó con buffer fosfato (NaH_2PO_4) 390 mg/mL en relación de volumen 10:1 carbonilo:fosfato. El pH final de la solución se mantuvo entre 6,5 y 7,5 después de la neutralización. La sustitución de los ligandos de interés (L), Fluconazol (F) o Voriconazol (V) se logró mediante la adición de una alícuota de 200 a 400 mL del precursor neutralizado a 5 mg del ligando (L) previamente disuelto en 200 μL de etanol anhidro absoluto y se llevó a un volumen final de 1 mL con agua para inyección. La mezcla se incubó en baño de agua a 65-67 °C durante 30 minutos. La pureza radioquímica fue controlada por HPLC utilizando el mismo sistema mencionado anteriormente.

Tabla 1. Gradiente de solventes

Tiempo (min)	% solución H ₃ PO ₄	% MeOH
0-3	100	0
3-6	100-75	0-25
6-9	75-66	25-34
9-20	66-0	34-100
20-27	0	100
27-30	0-100	100-0

Evaluación in vitro

Para analizar la estabilidad temporal, se evaluó por HPLC a distintos tiempos la pureza radioquímica in vitro de los complejos mantenidos en el medio de reacción.

La unión a proteínas se estudió mediante incubación de 25 µL del complejo con 475 µL de plasma humano a 37 °C. Se extrajo una alícuota de 50 µL de la mezcla a 30, 60, 90 min post-incubación y se sembró en una micro columna de gel filtración (MicroSpin G-50 GE). La columna se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos; se determinó la actividad eluida y retenida en la columna en un contador de centelleo sólido EGYG ORTEC. El porcentaje de unión a proteínas (UPP) se determinó por medio del porcentaje de actividad eluida. El procedimiento se realizó por triplicado y contra un blanco con NaCl 0,9%.

La lipofilia se determinó a través del coeficiente de partición de los complejos entre n-octanol y buffer fosfato de sodio (0,1 M; pH 7,4). En un tubo de centrifuga se colocaron 2,0 mL de n-octanol, 1,8 mL de buffer fosfato y 0,2 mL del complejo. La mezcla se agitó en un Vortex durante 2 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se midieron muestras de 0,2 mL de cada fase (n = 3). La lipofilia se expresa como: $L = \log P$, donde $P = (\text{act. octanol})/(\text{act. buffer})$.

La estabilidad en plasma se investigó incubando un volumen de 50 µL de los complejos con 950 µL de plasma humano en baño de agua a 37 °C. Se recogieron alícuotas de 200 µL a tiempos de 0,5, 1, 2, 3 y 4 horas, a las que se indujo la precipitación de las proteínas con 200 µL de EtOH anhidro frío (-15 °C) y agitación en Vortex; posteriormente se incubaron 5 minutos en freezer. Se separó el pellet del sobrenadante mediante centrifugación a 15.000 rpm por 5 min. Se analizó una muestra de sobrenadante por HPLC según el sistema de referencia (tabla 1).

Para el ensayo de unión de levaduras se prepararon las siguientes soluciones de acuerdo a Welling et al⁴: Solución A: Buffer fosfato 14 mM, pH 7,5. Suspensión B: *C. albicans* 15x10⁸ cfu/mL en solución A (Cat. N° 0443, Lote 443-183 ATCC (R) 10231TM). Solución C: 0,01% de Tween 80 en Buffer A. Solución D: ácido acético 0,1%. Solución E: mezcla v/v de soluciones C y D, preparada inmediatamente antes de su uso. Se prepararon 7 diluciones en serie de la suspensión B (n=2) con solución de NaCl 0,9% en tubos Ependorff y un tubo de control conteniendo solamente NaCl 0,9% (volumen final = 0,4 mL/tubo). Cada tubo recibió 0,8 mL de solución de E y se incubó 15 min a 4 °C para estabilizar los microorganismos. Luego se añadió a cada tubo 0,1 mL de la molécula marcada previamente diluido 1/10 en buffer A y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Se midió la actividad de la serie completa y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió con 1 mL de solución E y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente para evitar perturbar el sedimento y se midió su actividad final. El porcentaje de unión se calculó como: $(\text{actneta pellet} \times 100\%) / (\text{actnetaTotal})$.

Evaluación in vivo

Todos los procedimientos de biodistribución en animales se realizaron de acuerdo al protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Universidad de la República, Uruguay). El modelo animal consistió en ratones hembras CD1 de 8-10 semanas de edad y un peso entre 22±2 g (n=3 por grupo). Los animales fueron mantenidos en condiciones de alojamiento higiénicas, con ciclos de 12:12 horas de luz-oscuridad y temperatura de 22±2 °C, con alimento y agua ad libitum. La evaluación biológica se realizó en cuatro grupos, uno con animales normales para determinar la distribución biológica del complejo, con especial atención en sangre, comportamiento farmacocinético, vías de eliminación y sitios de captación como referencia. Un segundo grupo de animales a los que se indujo inflamación estéril por inyección de 0,2 mL de aceite de Trementina diluida en suero fisiológico (1:5 v/v) en la pata trasera izquierda. A los grupos tercero y cuarto se indujo la infección con 0,2 mL (9x10⁸ufc) de *C. albicans* (N° catálogo 0443 Lote 443-183 ATCC (R) 10231TM) y *A. niger* (N° catálogo 0392 Lote 392-87 ATCC (R) 16404TM) respectivamente, en la pata trasera izquierda. Los complejos diluidos en suero fisiológico se administraron por vía IV en la vena de la cola (37 MBq, 1mCi en 0,1 mL). A tiempos de biodistribución de 1 y 3 horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los órganos extraídos en forma individual a fin de medir la actividad acumulada en cada uno de ellos. Se colectaron muestras de orina, sangre, músculo, hueso y del sitio de infección/inflamación.

Previamente, para la adquisición de imágenes, los animales fueron anestesiados con isoflurano 2,5% en flujo de 1,5 mL/min de O₂. La adquisición se realizó a un tiempo de 3 h post inyección, en un sistema de imagen preclínico para pequeños animales TriumphTM PET / SPECT / CT (Gamma Medica, Inc.) durante 60 min, ROR de 40 mm, colimador 5-pinhole, matriz de 80x80 píxeles.

Resultados

Estudios in vitro

El precursor fac- $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ se obtuvo con una pureza radioquímica superior al 98%, lo que permitió el proceso de sustitución. La técnica de marcación fue realizada por sustitución del precursor con los ligandos fluconazol y voriconazol. Los cromatogramas de ambos complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-L}]$ mostraron la presencia de 2 picos mayoritarios: en el caso del $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-F}]$ a 18,1 y 19,5 min y en relación 1:2; en el caso de $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-V}]$ a los 23 y 23,5 min en una relación 1:1,6. Para el $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-F}]$ se purificó el pico de mayor tiempo de retención, ya que es el que aparece en mayor proporción. Los estudios de estabilidad en el tiempo muestran restablecimiento de las otras especies químicas en el medio (fig. 2); el perfil se mantiene por 4 h, lo que supone un estado de equilibrio para las especies formadas.

Toda la caracterización fisicoquímica y biológica de los complejos se realizó tomando el total de la actividad, sin purificar los picos (tabla 2). Los valores de unión a proteínas reportados en la literatura para fluconazol y voriconazol son de 11 y 58% respectivamente; luego del marcado, los complejos $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-F}]$ y $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-V}]$ presentaron valores de 73,5 y 65,5 % respectivamente. La lipofilia de un compuesto es un parámetro importante, relacionado con su capacidad para atravesar las membranas y con la unión a proteínas plasmáticas. El coeficiente de reparto entre 1-octanol y buffer fosfato de sodio para ambos compuestos mostró una mayor afinidad por la fase acuosa. En el análisis de la estabilidad en plasma, la descomposición para Fluconazol fue de 50% y para Voriconazol de 36% después de 210 min, en ambos casos con nueva formación del precursor tricarbonilo. La unión a levaduras mostró valores del orden del 14% en ambos complejos.

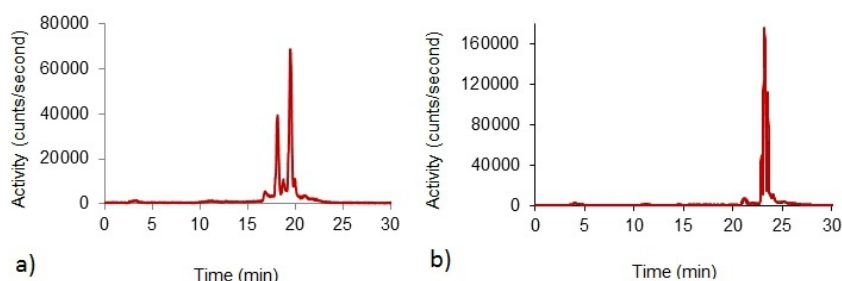


Figura 2. Cromatogramas HPLC de a) $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-Fluconazol}]$ y b) $[^{99m}\text{Tc}][(\text{CO})_3\text{-Voriconazol}]$.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los complejos

Complejo				
	Estabilidad en plasma ^a	Log P	Unión a proteínas ^b	Unión a <i>C. Albicans</i> ^c
[^{99m} Tc(CO) ₃ - Fluconazol]	50	-0,31	74,6	14
[^{99m} Tc(CO) ₃ - Voriconazol]	64	-0,02	65,5	12

^a Porcentaje de actividad remanente en los picos principales luego de 210 min de incubación en plasma humano. ^b Porcentaje de actividad unido a proteínas plasmáticas luego de 90 min de incubación. ^c Porcentaje de actividad unida al pellet de levaduras.

Estudios in vivo

Los estudios de biodistribución se realizaron a 1 y 3 h; los mejores resultados se obtuvieron a las 3 h post inyección. El comportamiento biológico de ambos compuestos se caracterizó por baja actividad en sangre y riñones; la depuración es principalmente hepatobiliar, mientras que la actividad en el resto de los órganos y tejidos es depreciable. Las relaciones blanco/no blanco (T/NT) se muestran en la tabla 3; a pesar de tener baja captación sanguínea, los 2 complejos presentan bajas relaciones blanco/sangre (T/B), por debajo de 1 en cualquiera de los modelos biológicos utilizados.

En la figura 3 se muestran las imágenes centellográficas de los tres modelos de lesiones. Los valores T/NT de las imágenes fueron 1,26 para inflamación estéril, 2,36 para infección por *C. albicans* y 1,05 para *A. niger*. El perfil de los valores concuerda con las distribuciones biológicas.

Tabla 3. Propiedades biológicas de los complejos

	Sangre (Candida-Aspergillus)	Hígado (Candida-Aspergillus)	Riñones (Candida-Aspergillus)	T/NTInflamación estéril	T/NT Candida	T/NT Aspergillus	T/B Candida	T/B Aspergillus
[^{99m} Tc(CO) ₃ - Fluconazol]	6,9 - 4,1	19 - 14,7	15 - 8,8	1,73	2,3	2,8	0,22	0,36
[^{99m} Tc(CO) ₃ - Voriconazol]	3,4 - 5,9	11,3 - 16,7	6,4 - 8,3	1,4	2,64	1,24	0,36	0,23

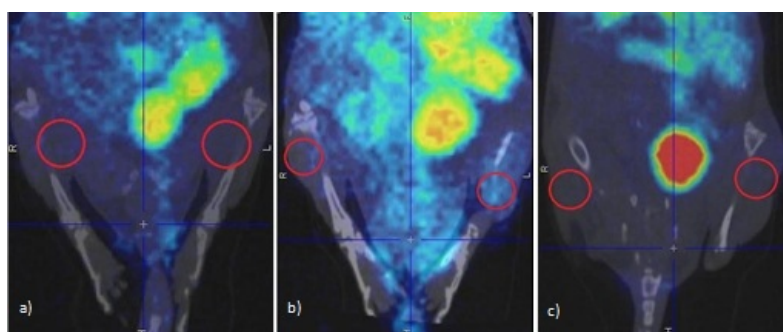


Figura 3. Imágenes centellográficas de [^{99m}Tc][(CO)₃-Voriconazol] en lesiones en la pata trasera izquierda a) *Aspergillus niger*; b) *Candida albicans*; c) Inflamación estéril.

Discusión

El marcado de ambos agentes antifúngicos mostró un perfil cromatográfico con dos picos mayoritarios; esta situación seguramente se deba a que las especies principales se interconvierten en las diferentes formas de coordinación de los respectivos ligandos con el precursor. A pesar de ello, el perfil se mantiene constante durante 4 h. En el caso de la UPP, los valores son altos, lo que puede explicarse por el hecho que en las proteínas plasmáticas existen grupos funcionales de los aminoácidos con buena capacidad donadora de electrones, con potencial para desplazar al ligando de su unión con el metal si ésta no es suficientemente fuerte.

Con respecto al comportamiento in vivo, las relaciones T/NT en ambos casos evidencian una buena especificidad para detectar infección por *C. albicans* con respecto a la inflamación estéril, aunque con una baja sensibilidad. Para la infección de *A. niger* el [^{99m}Tc (CO)₃-F] tiene la mayor sensibilidad de detección. A pesar de la baja captación de los complejos en sangre, la relación blanco/sangre es <1, lo cual indica que no sería posible distinguir claramente los sitios de captación con respecto al fondo. Las imágenes centellográficas confirman estos resultados, pues las lesiones experimentales revelan diferencias apreciables entre inflamación estéril y *C. albicans*, pero no así en el caso de la infección con *A. niger*. Asimismo, la alta captación a nivel hepático

dificulta la visualización de lesiones en esa región del cuerpo.

De acuerdo a las características buscadas en un radiofármaco para diagnóstico de infecciones, tanto el fluconazol como el voriconazol fueron fácilmente marcados pero su comportamiento in vivo no cumplió con los requisitos de sensibilidad y especificidad, por lo que se desestiman estos complejos como agentes para diagnóstico por centellografía. Sin embargo, dadas las características químicas de los antifúngicos utilizados, es deseable explorar otras estrategias de marcado para su evaluación como agentes de detección de infecciones.

Agradecimientos

PEDECIBA-Química, ANII por beca de iniciación a la investigación de Leticia Fernández; CUDIM por los estudios de imágenes.

Referencias

01. Teran M, Paolino A, Vilar J, et al. Evaluación clínica y dosimétrica de ^{99m}Tc -Hynic-IgG como agente diagnóstico de focos de infección en pacientes HIV positivos. *Rev Panam Infectol* 2010;12:12-7.
02. Gemmel F, Dumarey N, Welling M. Future diagnostic agents. *Semin Nucl Med* 2009;39:11-26.
03. Reyes L, Martínez E, Giglio J, Terán M. Evaluación biológica de ^{99m}Tc -Voriconazol como potencial agente de diagnóstico de infecciones fúngicas por centellografía gamma. *Alasbimn Journal* Year 14, N° 54, October 2011.
04. Welling M, Lupetti A, Balter H, et al. ^{99m}Tc -labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. *J Nucl Med* 2001;42,5:788-94.
05. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1347-70.
06. Shaha SQ, Rafiullah Khan M. Radiosynthesis and biological evaluation of the ^{99m}Tc -tricarbonyl moxifloxacin dithiocarbamate complex as a potential *Staphylococcus aureus* infection radiotracer. *Appl Radiat Isot* 2011;69:686-90.
07. Signore A, D'Alessandria A, Lazzeri A, Dierckx R. Can we produce an image of bacteria with radiopharmaceuticals? *Eur J Med Mol Imaging* 2008;35:1051-5.
08. Aristizabal Henao N, Vagner B. Infections of the central nervous system by *Candida*. *J Infect Dis Immun* 2011;3:79-84.
09. Fortún J, Ruiz I, Martín-Dávila P, Cuenca-Estrella M. Fungal infection in solid organ recipients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2012;30(S2):49-56.
10. Lucignani G. The many roads to infection imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2007;34:1873-7.
11. Lupetti A, Welling M, Mazzi U, et al. Technetium-99m labeled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *J Nucl Biol Med* 2002;29:674-9.
12. Lupetti A, Welling M, Pauwels EK, Nibbering PH. Detection of fungal infections using radiolabeled antifungal agents. *Curr Drug Targets* 2005;6:945-54.
13. Carlo P, Brouwer WM, Welling A. The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides. *J Pharm Sci* 2008;97:1633-51.
14. Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, et al. Use of radiolabeled peptides for scintigraphy in non-oncologic diseases. ^{99m}Tc -Antimicrobial peptides: promising candidates for infection imaging. *Q J Nucl Med* 2003;47:238-45.
15. Schibili R, Schubiger PA. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* 2002;29:1529-42.
16. Kuijpers B, Groothuys S, Keereweer A. Synthesis of Triazole-linked glycosylamino acids and peptides. *Org Lett* 2004;6:3123-6.
17. Alberto R, Schibili R, Egli A, Schubiger AP. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J Am Chem Soc* 1998;120:7987-8.
18. Alberto R, Schibili R, Waibel R, et al. Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (M = Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coordination Chemistry Reviews* 1999;190-192:901-19.
19. Alberto R. $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ chemistry: a promising new concept for SPET? *Eur J Nucl Med Mol Imag*

2003;30:1299-302.

20. Schibli R, Schubiger PA. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* 2002;29:1529-1542.
21. Alberto R. New organometallic technetium complexes for radiopharmaceutical imaging. *Top Curr Chem* 2005;252:1-44.
22. Agorastos N, Borsig L, Renard A, et al. Cell-specific and nuclear targeting with $[M(CO)_3]^+$ ($M=^{99m}Tc$, Re)-based complexes conjugated to acridine orange and bombesin. *Chemistry* 2007;13:3842-52.
23. Gorshkov NI, Lumpov AA, Miroslavov AE, Suglobov DN. 2 + 1 Chelating Systems for Binding Organometallic Fragment $Tc(CO)_3$. *Radiochemistry* 2005;47:45-9.
24. Gorshkov NI, Schibli R, Schubiger AP, et al. "2 + 1" Dithiocarbamate-isocyanide chelating systems for linking $M(CO)_3^+$ ($M = ^{99m}Tc$, Re) fragment to biomolecules. *J Organomet Chem* 2004;689:4757-63.
25. Miroslavov AE, Sidorenko GV, Lumpov AA, et al. Synthesis and properties of $^{99}Tc(I)$ and $^{99m}Tc(I)$ hexacarbonyl in aqueous solutions. *Radiochemistry* 2009;51:124-31.