



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**Desarrollo de un radiofármaco teranóstico
basado en aptámeros anti VEGF y péptidos
NLS-RGD conjugado con nanopartículas de
Oro y radiomarcado con Lu-177.**

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Abraham González Ruiz

Comité Tutorial:

Dra. Keila Isaac Olivé

Tutor Académico

Dr. Enrique Morales Ávila

Tutor Interno

Dra. Guillermina Ferro Flores

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, Marzo de 2019

Este trabajo se desarrolló en la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud (Departamento de Materiales Radiactivos) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, como parte de las actividades del laboratorio nacional de investigación y desarrollo de radiofármacos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero al proyecto CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443.

Agradecimientos:

- Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por permitirme desarrollar el presente proyecto en sus instalaciones y brindarme todos los recursos a su alcance para la consecución del mismo.
- A la Universidad Autónoma del Estado de México por bríndame la oportunidad de entrar al programa de doctorado en ciencias de la salud.
- Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para asistir al evento Nanotech France 2017 celebrado en París, Francia.
- Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca de manutención que me permitió desarrollar la presente investigación.

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Acorde a Instituto Nacional de Cancerología en México cada año se suman 128,000 nuevos casos de cáncer. El proceso de angiogénesis en un tumor es un proceso crítico durante el desarrollo, crecimiento y metástasis del mismo, ya que si la neovasculatura necesaria para poder adquirir los nutrientes necesarios el tumor no puede crecer más allá de 1-2 mm.

Durante el complejo proceso de angiogénesis, son liberados por las células tumorales diversos factores de crecimiento endotelial que fomentan el desarrollo de nueva neovasculatura. Dentro los principales factores proangiogénicos se encuentran como dominantes el factor de crecimiento endotelial VEGF₁₆₅ (por sus siglas en inglés) y la sobre expresión de las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$ en distintas células tumorales.

El desarrollo de radiofármacos teranósticos en la medicina nuclear para el tratamiento y diagnóstico de cáncer es una de las áreas de mayor crecimiento en la última década. La implementación de radiofármacos de tercera generación que en su estructura conjunten un isótopo radioactivo, un agente quelante bifuncional y un agente bioactivo, ha sido expuesta como una potencial herramienta en el diagnóstico y terapia de células tumorales.

En esta investigación se sintetizó y caracterizó químicamente el compuesto ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD-NLS-Aptámero el cual es específico para el cáncer. Este compuesto está basado en: nanopartículas de Au (AuNP), la secuencia de localización nuclear (NLS), el péptido Arg-GlyAsp y un aptámero (HS-pentil-pegaptanib). El compuesto ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD-NLS-Aptámero se obtuvo con una pureza radioquímica de 99± 1% y presento una alta afinidad por la integrina $\alpha(v)\beta(3)$ y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo cuales se encuentran sobreexpresados en la

neovascularización tumoral. Además, se desarrolló un ensayo de formación de túbulos para probar la capacidad del nanosistema para inhibir la angiogénesis. La inhibición completa de la formación de tubos (angiogénesis) se demostró cuando las células endoteliales (EA.hy926), cultivadas en un soporte de matriz extracelular 3D, se trataron con el nanosistema desarrollado.

Además, se evaluó el efecto fototérmico y radioterapéutico del nanosistema antiangiogénico ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptamer sobre la viabilidad de las células cancerosas U87MG mediante el uso de modelos *in vitro* e *in vivo*, y se evaluó el efecto sinérgico de ambas terapias. Los resultados *in vitro* demostraron una disminución en la viabilidad celular a $2.14 \pm 0.27\%$ después del tratamiento con terapia fototérmica más radioterapia. Estos resultados se correlacionaron con la respuesta terapéutica *in vivo* observada en ratones con tumores inducidos por U87MG, en los cuales ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptámero bajo irradiación con láser inhibieron la progresión tumoral. La combinación de radioterapia y termoterapia del compuesto sintetizado en el presente estudio podría ser potencialmente útil para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: AuNPs, ^{177}Lu , Integrinas, Aptámeros, radioterapia dirigida, terapia fototérmica, Antiangiogénesis.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. According to the National Cancer Institute in Mexico every year there are 128,000 new cases of cancer. The process of angiogenesis in a tumor is a critical process during the development, growth and metastasis, without the necessary neovasculature to acquire nutrients the tumor cannot grow beyond 1-2 mm.

During the complex process of angiogenesis, endothelial growth factors that promote the development of new neovasculature are released by the tumor cells. Within the main proangiogenic factors are dominant the endothelial growth factor VEGF₁₆₅ and the overexpression of integrins $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(v)$ in different tumor cells.

The development of theranostic radiopharmaceuticals in nuclear medicine for the treatment and diagnosis of cancer is one of the areas of greatest growth in the last decade. The implementation of third-generation radiopharmaceuticals that in their structure combine a radioactive isotope, a bifunctional chelating agent and a bioactive agent, has been exposed as a potential tool in the diagnosis and therapy of tumor cells.

In this research was synthesized and chemically characterized a cancer-specific ¹⁷⁷Lu-Aunoradiopharmaceutical based on gold nanoparticles (AuNPs), the nuclear localization sequence (NLS)-Arg-GlyAsp peptide and an aptamer (HS-pentyl-pegaptanib) to target both the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and the vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpressed in the tumor neovasculature. Furthermore, tube formation assay was developed to probe the nanosystem capability to inhibit angiogenesis. ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD-NLS-Aptamer was obtained with a radiochemical purity of $99 \pm 1\%$. Complete inhibition of tube formation (angiogenesis) was

demonstrated when endothelial cells (EA.hy926), cultured in a 3D-extracellular matrix support, were treated with the developed nanosystem.

In addition, the photothermal and radiotherapeutic effect of the ^{177}Lu -AuNP-RGD-NLS-Aptamer antiangiogenic nanosystem was evaluated on the viability of U87MG cancer cells by using *in vitro* and *in vivo* models, as well as was assessed the synergic effect of both therapies. *In vitro* results demonstrated a decrease in cell viability to $2.14 \pm 0.27\%$ after the treatment with photothermal therapy plus radiotherapy. These results correlated with the observed *in vivo* therapeutic response in mice with U87MG-induced tumors, in which ^{177}Lu -AuNP-RGD-NLS-Aptamer under laser irradiation inhibited tumor progression. The combination of radiotherapy and thermotherapy in one nanoradiopharmaceutical could be potentially useful for cancer treatment.

Nomenclatura

^{177}Lu -AuNPs	^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNPs
^{177}Lu -AuNPs-RGD	^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNPs-c[RGDfK(C)]
% DI	% de dosis inyectada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AQB	Agente Quelante Bifuncional
ARN	Ácido ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de oro
APT	Aptámero
CT	Tomografía computarizada
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''- tetraacético
FDG	Flúor Desoxiglucosa
GGC	Glicina-Glicina-Cisteína
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
NIR	Infrarrojo cercano
PET	Tomografía por emisión de positrones
RGD	Arginina-Glicina-Ácido aspártico
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotones



individuales

TEM

Microscopia de transmisión electrónica

TLC

Cromatografía en capa fina

VEGF

Factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
NOMENCLATURA	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. ANTECEDENTES	1
1.1. CÁNCER	1
1.1.1. Angiogénesis en cáncer y metástasis	3
1.1.2. Sobreexpresión de VEGF durante el crecimiento tumoral	5
1.1.3. Sobreexpresión de las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$ en células tumorales	7
1.2. MEDICINA NUCLEAR	8
1.2.1. Péptidos de reconocimiento específico	10
1.2.2. Radioterapia de blancos moleculares	14
1.2.3. Radiofármacos teranósticos marcados con Lutecio-177	17
1.2.4. Radiofármacos Teranósticos basados en Nanopartículas de Au	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVO GENERAL	36
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. JUSTIFICACIÓN	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1. DISEÑO DE ESTUDIO	39
6.1.1. Universo	39
6.1.2. Método de muestreo	39
6.1.3. Tamaño de Muestra	39
6.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN	40
6.2.1. Criterios de Inclusión	40
6.2.2. Criterios de Exclusión	40
6.2.3. Criterios de Eliminación	40

6.3. PROCEDIMIENTOS	41
6.3.1. Síntesis de los péptidos NLS-RGD, DOTA-GGC.....	41
6.3.2. Preparación de la conjugación ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC.....	43
6.3.3. Síntesis de las AuNPs.....	44
6.3.4. Preparación de los péptidos a las AuNPs.	44
6.3.5. Síntesis del Aptámero	45
6.3.6. Preparación de la conjugación DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero y caracterización fisicoquímica.	45
6.3.7. Radiomarcado del sistema AuNPs-Aptámero-NLS-RGD con la conjugación ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC	46
6.3.8. Evaluación de la pureza radioquímica del sistema Multifuncional ¹⁷⁷ Lu- AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF por radiocromatografía en capa fina y de exclusión molecular.	47
6.3.9. Afinidad del compuesto ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC -AuNP- NLS-RGD- Aptámero.....	47
6.3.10. Evaluación de la captación específica y afinidad in vitro del sistema ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en células C6.....	47
6.3.11. Ensayos de internalización y unión no específica del compuesto ¹⁷⁷ Lu- DOTA-GGC-AuNPs- NLS-RGD-Aptámero.....	49
6.3.12. Cinética de Internalización celular del compuesto ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC- AuNP- NLS-RGD-Aptámero	49
6.3.13. Evaluación in vitro del efecto térmico producido por el sistema ¹⁷⁷ Lu- DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en células U87MG	49
6.3.14. Obtención de imágenes del compuesto ¹⁷⁷ Lu-DOTA-GGC -AuNP- NLS- RGD-Aptámero internalizado en células C6 con microscopio de fluorescencia ...	53
6.3.15. Obtención de la biodistribución del radiofármaco en ratones atómicos con tumores inducidos con células U87MG	54
6.3.16. Evaluación de la eficacia terapéutica del nanosistema	56
 6.4. VARIABLES	 57
6.4.1. Independientes.....	57
6.4.2. Dependientes.....	57
6.4.3. Intervinientes.....	57
 6.5. IMPLICACIONES BIOÉTICAS	 59
6.6. RECOLECCIÓN DE DATOS	59
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	60
 7. RESULTADOS	 61

7.1. ARTÍCULO PUBLICADO	61
7.1.1. Synthesis and in vitro evaluation of an antiangiogenic cancer specific dual-targeting ¹⁷⁷ Lu-Au-nanoradiopharmaceutical	62
7.1.2. Apartados en el Artículo	63
7.2. SEGUNDO ARTÍCULO PUBLICADO	99
7.2.1. In vitro and in vivo synergistic effect of radiotherapy and plasmonic photothermal therapy on the viability of cancer cells using ¹⁷⁷ Lu-Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticles under laser irradiation	100
7.2.2. Apartados del artículo	101
8. DISCUSIÓN GENERAL	119
9. CONCLUSIONES GENERALES	125
10. BIBLIOHEMEROGRAFÍA	127

Índice de figuras

<i>Figura 1. Desarrollo del proceso de angiogénesis</i>	4
<i>Figura 2. Sobreexpresión del VEGF-A₁₆₅ durante el proceso de angiogénesis.</i>	6
<i>Figura 3. Estructura química del péptido RGDfK.</i>	11
<i>Figura 4. Estructura química del péptido NLS.</i>	13
<i>Figura 5. Estructura química del aptámero RNA Pegaptanib de sodio.</i>	14
<i>Figura 6. Propiedades radioactivas del ¹⁷⁷Lu.</i>	17
<i>Figura 7. Efecto cruzado del ¹⁷⁷Lu, inducción de apoptosis en células malignas no unidas directamente al radioconjugado.</i>	18
<i>Figura 8. Diagrama ilustrativo del fenómeno de resonancia de plasmón de superficie.</i>	23
<i>Figura 9. Dispersión de la energía resultante de la interacción de luz láser con AuNPs.</i>	26
<i>Figura 10. Mecanismos de reducción de las AuNPs al interaccionar luz láser.</i>	27
<i>Figura 11. Barreras de ingreso de las AuNPs en células tumorales</i>	29
<i>Figura 12. Arreglo láser para los experimentos.</i>	52

1. ANTECEDENTES

1.1. CÁNCER

La palabra cáncer es el nombre común que se le da a distintas enfermedades relacionadas, en las que se distingue un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células. Aunque existe mucha discrepancia acerca de los orígenes de este término, probablemente derivan del latín para cangrejo *cáncer*. Debido a que la enfermedad del cáncer al igual que como el cangrejo, se incrusta a cualquier parte, a la que se agarra de una manera testaruda y difícilmente la libera (Kumar, Cotran, & Robbins, 2010; OMS, 2017).

El cáncer se presenta en casi todos los casos cuando existe una mutación o alguna activación anormal de los genes celulares que controlan el crecimiento y la mitosis celular. Debido a la mutación génica presente en las células de cáncer su desarrollo y reproducción es más acelerado y proliferan a mayor velocidad que las células normales sin cumplir con la función con las que fueron creadas. Los genes anormales se denominan oncogenes y se ha descubierto hasta 100 tipos distintos (Hall & Guyton, 2012).

La reproducción acelerada de células de cáncer trae como consecuencia la formación de neoplasias. A pesar de que el término *neoplasia* es ampliamente empleado en el área médica ha sido sorprendentemente difícil llegar a una definición precisa. Una de las definiciones más aceptadas es la provista por el oncólogo británico Willis el cual menciona que “una neoplasia es una masa anormal del tejido cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales, así mismo persiste tras cesar el estímulo que suscitó el cambio” (Mountcastle, 1997).

El tejido canceroso compite con los tejidos normales para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento. Debido a que las células de cáncer demandan prácticamente toda la nutrición disponible, los tejidos normales sufren una muerte nutritiva gradual. La invasividad del cáncer le permite penetrar en los vasos sanguíneos linfáticos y en las cavidades corporales. A este proceso de diseminación de células de cáncer a otros órganos se denomina *metástasis*. Las metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (Hall & Guyton, 2012; Kumar *et al.*, 2010; OMS, 2017).

Uno de los principales procesos biológicos involucrados en el desarrollo del cáncer es el crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos sanguíneos previamente formados (angiogénesis). Debido a su metabolismo acelerado, las células cancerosas requieren una mayor cantidad de oxígeno y nutrientes que el resto de células del cuerpo. Para lo cual las células tumorales promueven el desarrollo del proceso de angiogénesis. Sin neovascularización suficiente que provea oxígeno y nutrientes a los tumores, éstos no pueden crecer más allá de 1-2 mm. Los vasos sanguíneos recién creados proveen una entrada al torrente sanguíneo para las células tumorales permitiéndoles diseminarse y formar metástasis en órganos distantes (Liekens, De Clercq, & Neyts, 2001; Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013).

A pesar de que el cáncer es un proceso estocástico, la probabilidad de mutaciones aumenta cuando una persona se expone a determinados factores químicos (plaguicidas, colorantes artificiales, contaminantes en los alimentos etc.), físicos (ej. Rayos X, γ , partículas α y β etc.) o biológicos (alteraciones genéticas hereditarias, virus) presentes de forma natural o artificial en el medio ambiente.

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, acorde a la organización mundial de la salud (OMS) en el 2018 se le atribuyeron 9.2 millones de muertes y se espera que los casos anuales diagnosticados aumentaran de 14 millones

en el 2012 a 22 millones por año en las próximas décadas (IARC, 2018; Plummer *et al.*, 2016). En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), cada año se suman más de 128,000 casos (60 % detectados en etapas avanzadas) (Taniguchi, 2013).

En México la incidencia de cáncer en hombres es de 66 000 casos al año afectando principalmente la próstata, pulmón, colon o recto y estómago; y en las mujeres se registran más de 82 000 casos al año afectando principalmente en mama, pulmón, colon o recto y cérvix o útero (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015; Taniguchi, 2013).

1.1.1. Angiogénesis en cáncer y metástasis

La correcta distribución del oxígeno por toda la sangre garantiza un adecuado crecimiento celular. De forma general las células deben estar localizadas entre 100 a 200 μm de un vaso sanguíneo para poder sobrevivir. Durante el crecimiento tumoral se liberan diversos factores de crecimiento endotelial y se sobreexpresan múltiples receptores celulares que propician la creación de nueva neovascularización. La producción y secreción de dichos factores se originan en las células del tumor los cuales son capturados por el tejido conector desencadenando el proceso de angiogénesis (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003).

El proceso de angiogénesis se caracteriza por la proliferación de células endoteliales que conlleva a la formación de nuevos capilares por crecimiento celular y esta encuentra caracterizado por la respuesta quimiotáctica y mitogénica de las células endoteliales (Li *et al.*, 2007).

Actualmente se reconoce que el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos incluye varias fases: a) migración y proliferación de células endoteliales. b) la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares, que eventualmente se

unirán en un primitivo laberinto de pequeños capilares. c) expansión del plexo vascular. d) remodelación de la red vascular en vasos grandes que se ramifican en vasos pequeños. e) recubrimiento de los vasos recién formados mediante pericitos y células de músculo liso (Figura 1).

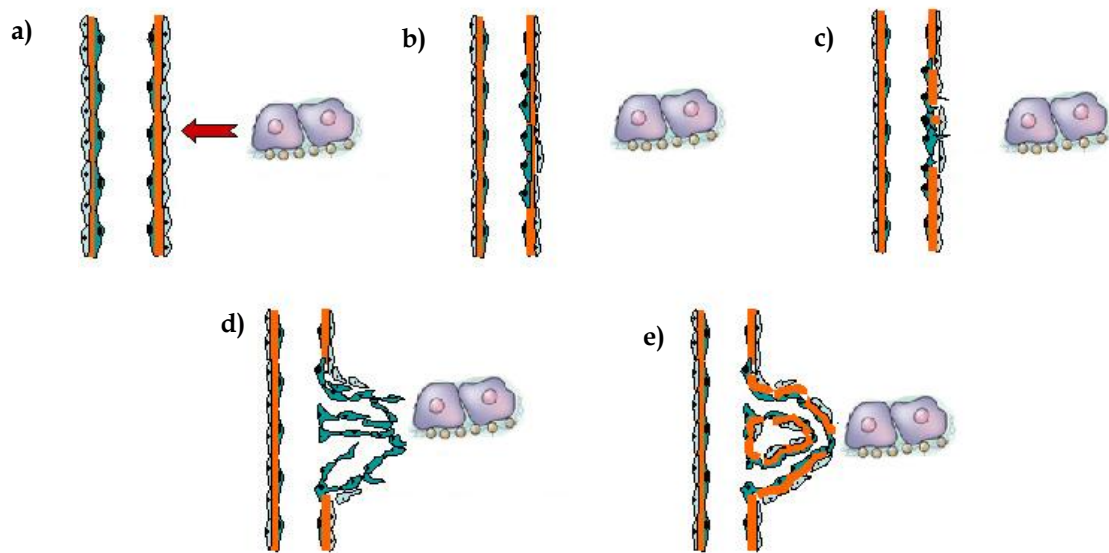


Figura 1. Desarrollo del proceso de angiogénesis. a) Liberación de factores proangiogénicos provenientes de células cancerosas hipóxicas, b) Los factores proangiogénicos se enlazan con sus análogos receptores de células vasculares endoteliales y activan la matriz de metaloproteinasas, c) comienzo de la permeabilidad de la membrana celular de los vasos sanguíneos, d) proceso de proliferación, invasión, adhesión y migración de células vasculares endoteliales, e) formación de túbulos, reordenamiento estructural, migración de pericitos y estabilización del vaso sanguíneo.

Es importante resaltar que el recubrimiento por pericitos y células de músculo liso de los canales formados por las células endoteliales permitirá la regulación de la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos proporcionando resistencia y la perfusión de dichos vasos.

El término metástasis se refiere a la transferencia de células cancerosas de una parte del cuerpo a otra. La propagación de células cancerosas de órgano a órgano es relativamente ineficiente (solo el 0.01% de las células primarias crean una metástasis)

(Fidler, 1970). Sin embargo, un tumor de 1 g de peso puede introducir en el torrente sanguíneo de 1-4 millones de células diarias. Los vasos creados por el proceso de angiogénesis proveen una ruta de escape para que las células tumorales entren en la circulación. Cuanto mayor es el tamaño del tumor y la densidad vascular, aumenta la probabilidad de que las células escapen. Las células tumorales que se dependen de la matriz celular migran a través de la membrana capilar y la barrera endotelial para finalmente entrar al torrente sanguíneo.

Existen diversos procesos relacionados que implican el desarrollo de la angiogénesis, sin embargo, el sistema dominante implicado en dicho proceso incluye al factor de crecimiento endotelial vascular y a sus receptores (VEGF/VEGFR). El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales; es miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E. El VEGF también se conoce como factor de permeabilidad vascular, basado en su capacidad de inducir fugas vasculares y promover la creación de nuevos vasos sanguíneos (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2005).

1.1.2. Sobreexpresión de VEGF durante el crecimiento tumoral

Durante el desarrollo y crecimiento tumoral, las células cancerosas sobreexpresan el VEGF, particularmente el VEGF-A; el cual ha sido reportado como uno de los principales promotores del proceso de angiogénesis. El VEGF-A es el miembro principal de esta familia, codificado por un solo gen organizado en ocho exones separados siete intrones. Es una glicoproteína homodimérica de 45 KDa. El VEGF-A emplea sitios de unión simétricos en cada polo del dímero para unirse al VEGFR-1 como VEGFR-2 y pueden inducir heterodímeros entre estos dos receptores. Hasta el momento se conocen seis isoformas del VEGF en seres humanos las cuales contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos.

El VEGF-A₁₆₅ es la isoforma predominante del VEGF-A durante el proceso de angiogénesis (Figura 2). Es una molécula cargada positivamente que se une a la heparina de sus receptores, con mayor afinidad al VEGFR-2. La activación de este receptor es suficiente para la activación de transductores de señales involucrados en la mitogénesis y migración celular, así como en la maquinaria angiogénica y la permeabilidad vascular. A lo largo de este trabajo se hará referencia a la isoforma VEGF-A₁₆₅ como VEGF. Dicha isoforma tiene efectos en las células derivadas de médula ósea, promueve la quimiotaxis de monocitos e induce la formación de colonias por subconjuntos maduros de células progenitoras de granulocitos-macrófagos entre otras.

La ausencia de oxígeno o alta demanda de oxígeno en células tumorales tiene un papel clave en la regulación de la expresión de una variedad de genes entre los que destaca la sobreexpresión del ARNm de VEGF.

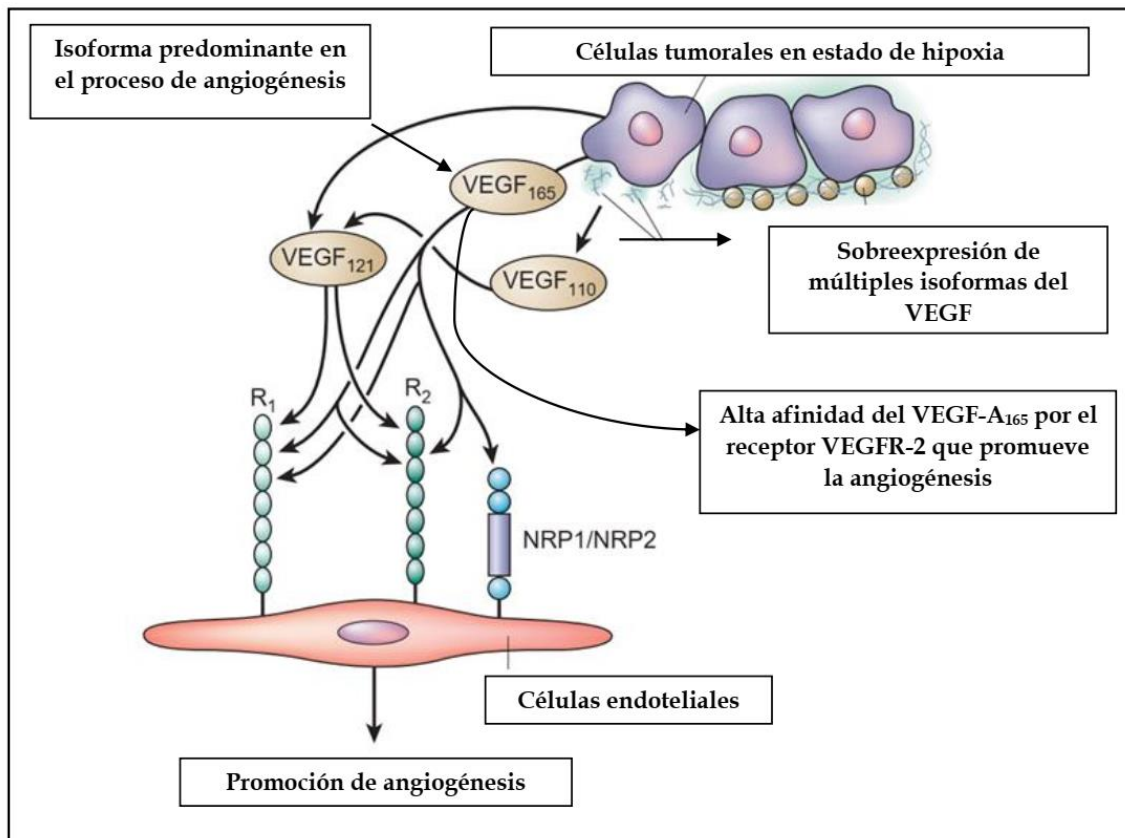


Figura 2. Sobreexpresión del VEGF-A₁₆₅ durante el proceso de angiogénesis.

Asimismo, durante la angiogénesis se encuentran sobreexpresados en las células tumorales múltiples receptores proangiogénicos. Particularmente las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$ han sido reportadas como factores clave para el desarrollo de la angiogénesis y excelentes blancos moleculares para distintos fármacos (Bhattacharya & Mukherjee, 2008; Ferrara *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007).

1.1.3. Sobreexpresión de las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$ en células tumorales

Las integrinas son una superfamilia de receptores celulares, formadas por dos cadenas de glucoproteínas, α , β . La asociación de dichas cadenas forma heterodímeros que se unen de forma covalente y tiene funciones de señalar respuestas celulares diversas y específicas. Las integrinas regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de células (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Krammer, Lu, Isralewitz, Schulten, & Vogel, 1999).

Las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$, se expresan en células endoteliales en proliferación y se sobre expresan en varios tipos de células tumorales (osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, mama, próstata entre otras). Dichas integrinas han demostrado tener un importante papel en la regulación del crecimiento del tumor con la posibilidad de invasión localizada y potencial metastásico. Se ha reportado que al inhibir las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$ es posible disminuir el proceso de angiogénesis lo que produce una disminución en el crecimiento tumoral en osteosarcomas y melanomas inducidos en ratones (Luna-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Su expresión no se restringe a las células del tumor o a las células endoteliales activadas, puesto que son expresadas por otro tipo de células de forma natural (ej. plaquetas). Sin embargo, debido a su sobreexpresión en las células tumorales resultan un blanco molecular para distintos fármacos útiles en áreas de diagnóstico y terapia del cáncer.

1.2. MEDICINA NUCLEAR

La medicina nuclear constituye una subespecialidad del campo de las imágenes médicas que involucra la administración de compuestos radiomarcados con pequeñas cantidades de material radioactivo (radiofármacos) con propósitos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades (ej. cáncer).

Un radiofármaco se puede definir como toda sustancia que contiene un radionúclido (ej. ^{99m}Tc , ^{177}Lu , ^{131}I) dentro de su estructura molecular y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrada en los seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos (Berry, de la Fuente, Mullin, Chu, & Curtis, 2007). Los radiofármacos deben cumplir con normas estrictas de seguridad y desempeño para poder ser aplicados en humanos. En México existen normas que regula la fabricación, distribución y disposición de los radiofármacos (NOM-040-NUCL-2016, NOM-035-NUCL-2013, NOM-013-NUCL-2009 entre otras).

Se le denomina núclido a cada especie nuclear y es caracterizado por sus constituyentes nucleares (número de protones/neutrones). Los núclidos pueden ser estables e inestables. Los inestables presentan una transformación por medio de un decaimiento radiactivo, durante este proceso emiten fotones (útiles para imagen) y/o radiación de partículas que pueden tener una aplicación terapéutica.

Debido a que los procedimientos de medicina nuclear permiten detectar actividades moleculares dentro del cuerpo humano (Biodistribución del radiofármaco), permiten la posibilidad de identificar enfermedades en etapas de desarrollo temprano. Además, permiten evaluar la respuesta inmediatas de los pacientes a las intervenciones terapéuticas (Cherry, Sorenson, & Phelps, 2012).

Dentro de su estructura, el radiofármaco está ligado fuertemente a moléculas con alta afinidad específica por blancos moleculares (ej. receptores celulares sobreexpresados,

glucosa entre otros). Un radiofármaco puede ser administrado por inhalación, por ingestión oral, por inyección directa en un órgano o bien administrado a un paciente por vía intravenosa (Saha, 2010).

Los radionúclidos empleados en medicina nuclear varían en función de la aplicación médica del radiofármaco (diagnóstico, terapia). Para funciones diagnóstico se emplean radionúclidos emisores de rayos γ con la suficiente energía para abandonar el cuerpo y ser detectados para formar una imagen digital (^{99m}Tc , ^{177}Lu). Por otro lado, para el caso de terapia se suelen emplear radionúclidos emisores de partículas α , β que depositen su energía en las inmediaciones del blanco molecular (Cherry *et al.*, 2012; Saha, 2010).

Dentro de la medicina nuclear existen dos principales técnicas imagenológicas: la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET). La imagen obtenida de emisión monofotónica emplea radionúclidos que decaen por emisión de rayos gamma (^{99m}Tc) y la imagen por emisión de positrones emplea radionúclidos que decaen mediante la emisión de positrones con un tiempo de vida medio corto. El positrón emitido es aniquilado con un electrón, produciendo dos fotones de alta energía (511 keV) que son detectados mediante una cámara imagenológica. Tanto en la técnica SPECT y PET las imágenes tomográficas son formadas, colectando datos desde diferentes ángulos del paciente (Ballester & Udías, 2008; Cervino, Burei, Mansi, & Evangelista, 2013; Y. Zhou, Shao, & Liu, 2012).

El poder de la medicina nuclear recae en su habilidad para proveer mediciones sensibles de los procesos biológicos del cuerpo. Otras técnicas imagenológicas como la tomografía computarizada proveen imágenes con información anatómica, pero están limitadas en cuanto a la información dinámica de los procesos moleculares del cuerpo (Cervino *et al.*, 2013; Y. Zhou *et al.*, 2012).

Por otra parte, en el área de medicina nuclear el sistema MIRD (Medical Internal Radiation Dose) es una metodología que permite realizar una estimación de la dosis absorbida de radiación en órganos y tejidos debido a la incorporación de material radioactivo. Establecido por la Sociedad de Medicina Nuclear de USA en 1960, la metodología MIRD ha sido ampliamente empleada en los servicios de medicina nuclear en pacientes que han sido expuestos a radiofármacos con fines diagnóstico y terapéuticos. Durante la última década la metodología MIRD ha sido ampliamente usada en dosimetría de radiofármacos en etapa experimental en ratones átmicos.

1.2.1. Péptidos de reconocimiento específico

Los péptidos son moléculas que están formadas por la unión de varios aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos. Un enlace peptídico es un enlace covalente entre el grupo amino ($-NH_2$) de un aminoácido y el grupo carboxilo ($-COOH$) de otro aminoácido. El tamaño de los péptidos varía desde moléculas que contienen dos aminoácidos hasta cincuenta. Los péptidos no poseen una estructura lineal a diferencia de la estructura tridimensional que presentan las proteínas. En el área de la detección de cáncer los péptidos reguladores (sobreexpresados en numerosas células de cáncer) adquieren una gran importancia como blancos moleculares (G Ferro-Flores, Ramírez, Meléndez-Alafort, & Santos-Cuevas, 2010; Guillermina Ferro-Flores, Arteaga de Murphy, & Melendez-Alafort, 2006).

Las proteínas o los péptidos que están presentes en una célula de cáncer, sirven para diferenciar cada tipo de célula cancerosa, por lo que estas proteínas o péptidos expresadas en las células de cáncer puede ser utilizadas como blancos moleculares para el reconocimiento específico (Moros, Mitchell, Grazú, & de la Fuente, 2013).

Los análogos de péptidos reguladores representan una clase de moléculas desarrolladas para marcar específicamente células de cáncer. Estos péptidos controlan y modulan la función de casi todos los órganos vitales y procesos metabólicos,

incluyendo los neuropéptidos que están presentes en el cerebro, péptidos de hormonas intestinales, así como péptidos presentes en el sistema vascular y sistema endócrino (Varvarigou, Bouziotis, Zikos, Scopinaro, & De Vincentis, 2004).

La funcionalización de radionúclidos con péptidos análogos a receptores sobreexpresados por células tumorales, permite obtener imágenes clínicas específicas y terapia para diferentes tumores (ej. mama, próstata, pulmón, intestino entre otros). Por lo tanto, la orientación específica a través de péptidos selectivos para fines diagnósticos y terapéuticos es ampliamente utilizada en el área de oncología (Morales-Avila *et al.*, 2011).

Secuencia peptídica RGD

Los péptidos basados en la secuencia cíclica Arg-Gly-Asp (RGD) se han reportado como agentes antiangiogénicos con alta afinidad para las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(v)$. La molécula del RGDfK se encuentra formada por Arginina, Glicina, Ácido aspártico, Fenilalanina y Lisina; la cual puede unirse a otras moléculas a través del grupo funcional amino de la Lisina (Figura 1).

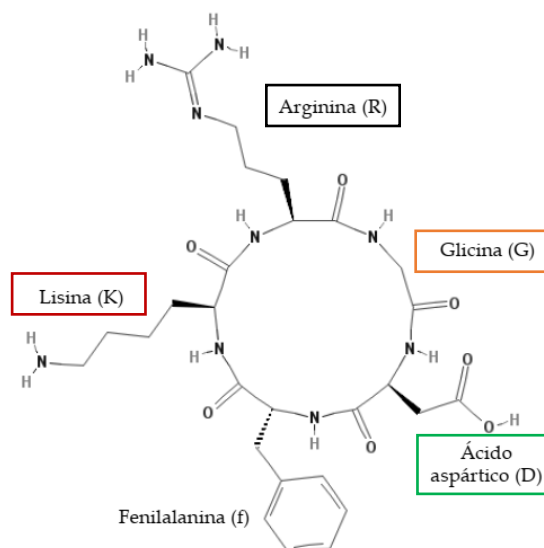


Figura 3. Estructura química del péptido RGDfK.

Dichas integrinas están expresadas en bajos niveles sobre las células epiteliales y las células endoteliales maduras, pero están sobre expresadas en las células endoteliales activadas en la neovasculatura de tumores y en las células tumorales (Schottelius & Wester, 2009). Asimismo, la secuencia RGD ha sido conjugada exitosamente en la estructura de diversos radiofármacos preservando una alta afinidad y reconocimiento específico por diversas células tumorales *in vitro e in vivo* (Morales-Avila *et al.*, 2011; Shi, Wang, & Liu, 2016; Y. Zhou *et al.*, 2012).

Péptidos de internalización nuclear

El reconocimiento específico de una célula, se lleva a cabo por la diferenciación de los receptores de membrana celular. Sin embargo, el blanco más sensible de una célula es el núcleo, por lo que el transporte eficiente del fármaco al núcleo de la célula (internalización) incrementaría de forma significativa su efecto terapéutico (Nitin, LaConte, Rhee, & Bao, 2009).

La membrana nuclear es fácilmente permeada por moléculas menores a 9 nm (es decir, proteínas de 40 a 60 kDa), para moléculas mayores, el transporte se realiza por medio de moléculas transportadoras (péptidos). Las secuencias de péptidos transportadores capaces de guiar moléculas a las inmediaciones del núcleo celular son llamadas secuencias de localización nuclear (NLS). Las NLS típicamente, se componen de una o más secuencias cortas de lisinas con carga positiva o argininas expuestas en la superficie de algunas proteínas; su entrada al núcleo se da por medio de los poros nucleares (Koi *et al.*, 2014).

Los péptidos con secuencia de internalización nuclear (NLS) RKKRRQRRR (Figura 4) son conocidos como “caballos de troya”, ya que conjugados a diferentes fármacos pueden llevar a éstos a la cercanía del ADN (Cornelissen, McLarty, Kersemans, Scollard, & Reilly, 2008; Costantini, Hu, & Reilly, 2008; Santos-Cuevas *et al.*, 2011). La

molécula NLS ha demostrado su potencial en experimentos *in vitro* e *in vivo* para promover e ingreso de diversos fármacos al núcleo celular con la finalidad de mejorar su eficiencia (Costantini *et al.*, 2008).

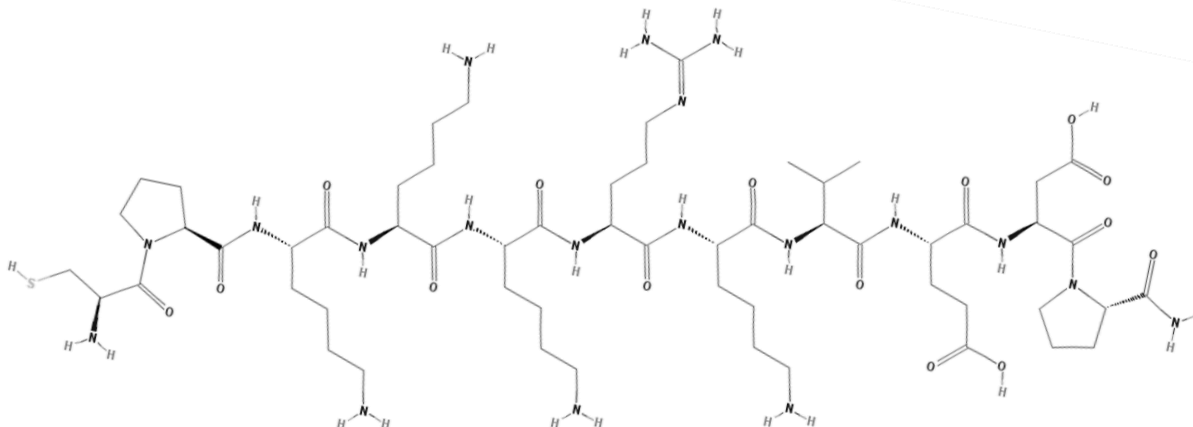


Figura 4. Estructura química del péptido NLS.

Aptámeros

Los aptámeros son secuencias lineales de oligonucleótidos de RNA o ADN. Su tamaño oscila entre los 20 y 100 nucleótidos y son capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a distintos blancos moleculares mediante un plegamiento tridimensional de su cadena (Wu, Chen, Wu, & Zhao, 2015).

El aptámero pegaptanib de sodio (nombre comercial) es un conjugado covalente de oligonucleótidos de RNA con una longitud de veintiocho nucleótidos que termina en una unión pentilamino, a la que dos unidades (PEG) 20-kilodalton monometoxipolietilenglicol están unidos covalentemente a través del grupo amino en un residuo de lisina (Ng *et al.*, 2006) (Figura 5). Este aptámero liga con una alta especificidad y afinidad al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF₁₆₅), inhibiendo su actividad, por tanto, ha demostrado tener potencial para inhibir el proceso de angiogénesis (Prakash & Rajamanickam, 2015).

Es importante mencionar que en general, los aptámeros presentan problemas de degradación nuclear debido a las interacciones entre los aptámeros y las endo/exo nucleasas. Para superar este problema y proveer mayor estabilidad química al aptámero, se sustituye el hidroxilo 2' de la ribosa de las pirimidinas con flúor (F) o con un grupo amino (NH_2) (Figura 5) lo que aumenta su resistencia varios órdenes de magnitud. Una modificación adicional que mejora la estabilidad del oligonucleótido de ARN frente a las nucleasas es la sustitución de 2'-O-metilo (2'-OMe) en la posición 2'-hidroxilo de las purinas (Figura 5) (Ng *et al.*, 2006).

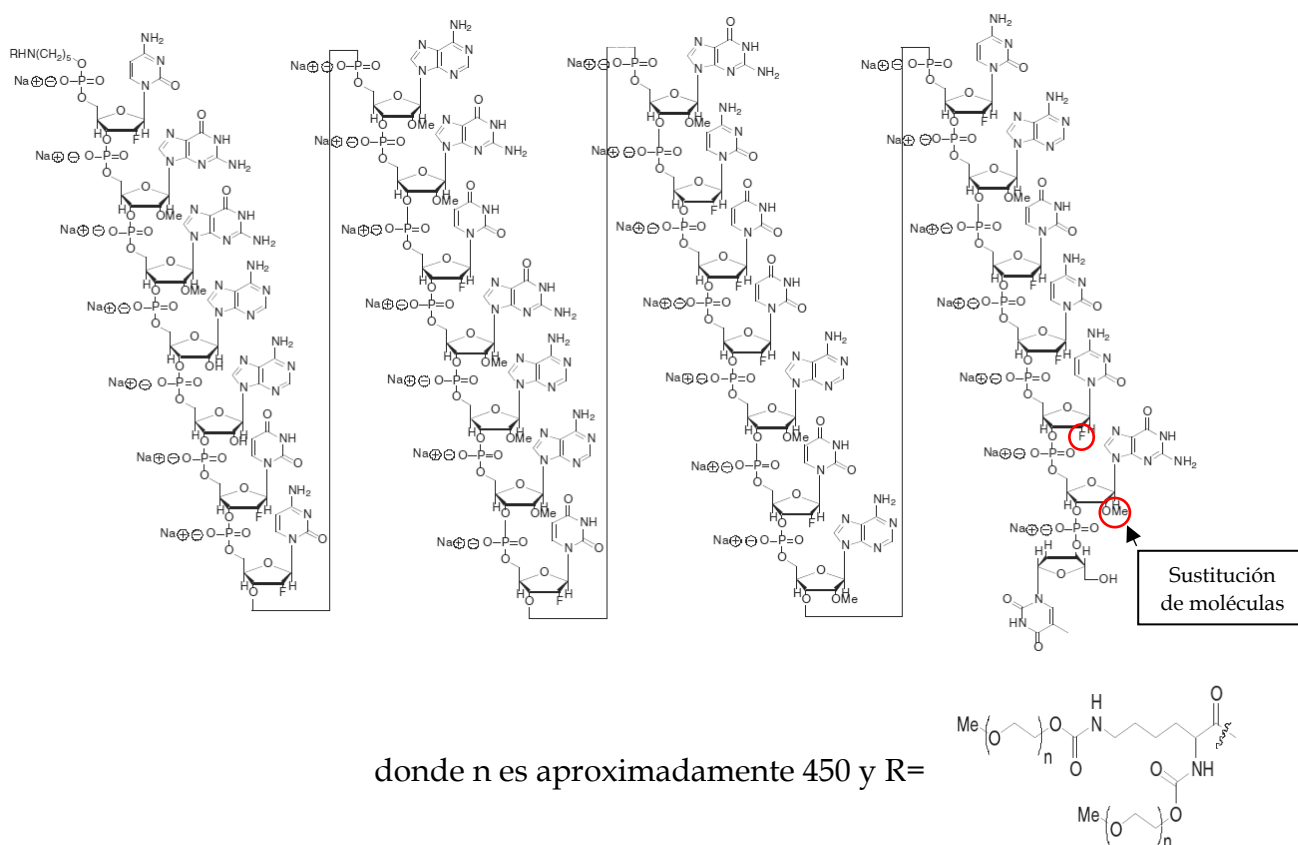


Figura 5. Estructura química del aptámero RNA Pegaptanib de sodio.

1.2.2. Radioterapia de blancos moleculares

El objetivo de la radioterapia de blancos moleculares en medicina nuclear contra el cáncer, es entregar una dosis máxima de radiación a los tumores mediante el empleo

de radiofármacos. Dicha entrega deberá ser de forma selectiva y localizada, para poder generar un efecto terapéutico a través del depósito de energía de las emisiones de partículas cargadas.

Con el propósito de implementar una radioterapia específica se han introducido metodologías que utilizan una gran cantidad de biomoléculas (anticuerpos monoclonales, péptidos bioactivos, agentes derivados de anticuerpos, unidades de reconocimiento molecular, entre otros) radiomarcadas para terapia de tumores y terapia paliativa ósea (tratamiento del dolor en metástasis óseas) (Cornelissen *et al.*, 2008; Costantini *et al.*, 2008; Santos-Cuevas *et al.*, 2011).

Es importante señalar que para que un radionúclido sea funcionalizado con otras moléculas para ser empleado en aplicaciones médicas, éste es químicamente estabilizado a través de un proceso de premarcado. En esta técnica se emplea un agente quelante bifuncional (AQB) que forma un complejo con el radionúclido y después se conjuga con la biomolécula marcadora. A una sustancia que tiene la propiedad de fijar iones metálicos a un determinado complejo molecular, se le denomina “quelante”. El proceso de quelación del radionúclido tiene por objetivo: minimizar la disociación del radionúclido en ambiente biológicos *in vivo*, formar un complejo con alta estabilidad termodinámica, evitar cambios en el estado de oxidación del radionúclido entre otros.

Se ha demostrado en diversos estudios que el agente quelante DOTA (ácido dodecanatetraacético) forma un compuesto de alta estabilidad química y termodinámica con distintos radionúclidos (^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu) con una liberación del radionúclido relativamente baja en ambientes biológicos (Iori *et al.*, 2017; Tsiou *et al.*, 2017). La molécula DOTA puede ser conjugada con otras biomoléculas a través de los siguientes métodos: 1) Activación de unos de los cuatro grupos carboxilos en la molécula para facilitar su reacción con aminas primarias en las biomoléculas y

formar un enlace amida estable y b) Unión covalente de la biomolécula a los derivados del DOTA con cadenas laterales.

Los radiofármacos empleados con fines terapéuticos, tienen la característica principal de que emplean en su estructura un isótopo radioactivo que presenta la emisión de partículas “ α , β ” y/o procesos de desexcitación como conversión electrónica y recombinación electrónica. La radiación induce una o varias rutas de muerte celular (Karagiannis, 2007; Sofou, 2008).

Esto permite la reducción, eliminación o detención del crecimiento de tumores cancerosos. La respuesta celular del tumor a la radiación depende de varios parámetros como la dosis absorbida, la tasa de dosis, el perfil de penetración del radionúclido al tumor o célula, la localización del radionúclido y la radiosensibilidad celular (Boswell & Brechbiel, 2005; Couturier *et al.*, 2005).

La elección de un radionúclido terapéutico o de diagnóstico para una aplicación en particular depende de sus características: físicas (tipo de radiación emitida, tiempo de vida media, energía entre otros) químicas (portadores, actividad específica, pureza etc), biológicas (estabilidad *in vivo*) y farmacocinética del portador marcado y del radionúclido libre entre otros (Boswell & Brechbiel, 2005; Couturier *et al.*, 2005; Karagiannis, 2007; Kassis & Adelstein, 2005; Levi de Cabrejas, 1999; Secretaría de Salud, 2016; Sofou, 2008; Verdera & Gomez De Castiglia, 2009).

En la última década se han desarrollado radiofármacos que conjuguen ambas características (diagnóstico y terapia) en una sola formulación farmacéutica, a estos compuestos se les conoce como teranósticos. Teranóstico es un acrónimo de terapéutico y diagnóstico. En este proyecto, el término se refiere a vectores moleculares/macromoleculares de reconocimiento específico y a nanoplataformas que incorporan ambas funciones, diagnóstico y terapia en una sola forma farmacéutica. Además de incorporar funciones diagnósticas y terapéuticas, estas

entidades pueden ser útiles en el seguimiento de la progresión de la enfermedad y en la evaluación de la respuesta a la terapia combinada (Koi *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014).

A través del uso de radiofármacos es posible registrar y detectar por imagen *in vivo*, la distribución espacio-temporal de procesos moleculares o celulares para aplicaciones diagnósticas y/o terapéuticas utilizando técnicas de medicina nuclear molecular (Gautier, Allard-Vannier, Hervé-Aubert, Soucé, & Chourpa, 2013).

1.2.3. Radiofármacos teranósticos marcados con Lutecio-177

El lutecio-177 (^{177}Lu) es un isótopo radiactivo del Lu que tiene como número atómico al 71 y masa atómica de 174.967 uma. Es un elemento sólido de color plateado y pertenece al grupo de los metales de transición. Es el metal más pesado, raro y caro de la serie de los lantánidos o tierras raras. El ^{177}Lu posee una vida media radiactiva de 6.71 días (Cruz *et al.*, 2012).

Es un emisor beta negativo con una $E_{\text{max}} = 497 \text{ keV}$ (abundancia 78 %) y una $E_{\text{prom}} = 134 \text{ keV}$ con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando. Además, emite un fotón gamma de 208 keV (11 % de abundancia) apropiado para la adquisición de imágenes *in vivo* en cámara gamma y SPECT, para la realización de estudios dosimétricos personalizados previos a la terapia radionuclídica (Figura 6) (Chemistry Explained, 2018).

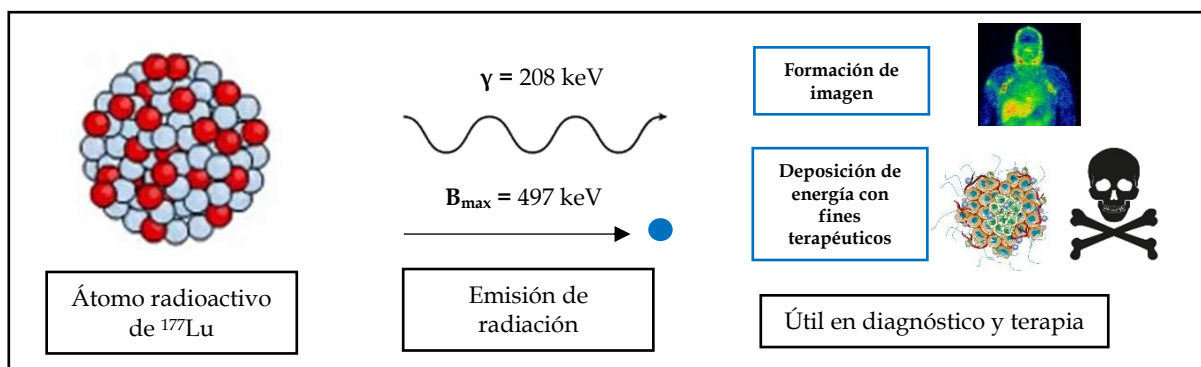


Figura 6. Propiedades radioactivas del ^{177}Lu .

El ^{177}Lu es un candidato ideal para el radiomarcado de fármacos y tiene características favorables para ser empleado en terapia radionuclídica usando blancos moleculares específicos. La ventaja que posee el ^{177}Lu respecto a los emisores alfa es el efecto de fuego cruzado dado por las partículas que permite la irradiación de tejido tumoral en forma homogénea (Figura 7), incluso en regiones donde el radiofármaco no se acumula (Kassis & Adelstein, 2005).

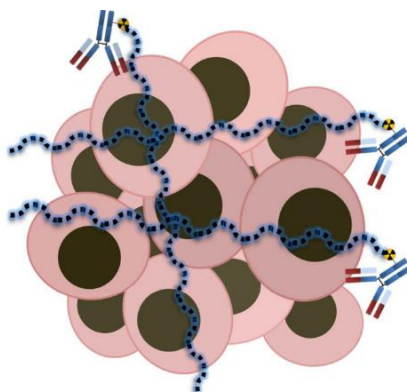


Figura 7. Efecto cruzado del ^{177}Lu , inducción de apoptosis en células malignas no unidas directamente al radioconjugado.

El ^{177}Lu puede ser obtenido por reacción de captura neutrónica (n, γ) en un reactor a partir de la irradiación con neutrones térmicos de un blanco natural o enriquecido de $^{176}\text{LuO}_3$ o por la irradiación de un blanco de ^{176}Yb y la posterior separación electroquímica del ^{177}Lu del blanco de Yb.

La investigación y diseño de nuevos radiofármacos basados en ^{177}Lu ha tenido un elevado crecimiento durante la última (Ferro-flores *et al.*, 2015). El ^{177}Lu , quelado con el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) ha demostrado formar un complejo de coordinación estable y ha sido exitosamente funcionalizado con múltiples moléculas (anticuerpos monoclonales, péptidos, esteroides, aptámeros etc.) con propósito radiofarmacéuticos. El compuesto ^{177}Lu -DOTA ha demostrado ser químicamente estable en sistemas *in vivo* y con alta actividad específica (Vilchis-Juárez *et al.*, 2014).

Siguiendo el enfoque antiangiogénico teranóstico en 2013, Luna-Gutiérrez y sus colegas desarrollaron un nuevo compuesto terapéutico radiofarmacéutico basado en la formulación: ^{177}Lu -AuNP-RGD con el potencial para tratar el cáncer. El compuesto de Luna presentó en experimentos *in vitro*: afinidad por la integrina α (V) β (3), efecto terapéutico para el resultado de la radiación concomitante ($\beta_{\text{Max}} = 176 \text{ keV}$) y el efecto del plasmón superficial (SRP) producido irradiando el compuesto por luz láser. Es importante señalar que el compuesto DOTA-GGC, permitió la funcionalización del ^{177}Lu con las nanopartículas de Au (AuNP) y presentó estabilidad química en ambientes biológicos.

Por otro lado, el ^{177}Lu ha sido exitosamente conjugado a dendrímeros para el diseño de un nuevo radiofármaco con potencial fototérmico-plasmónico, terapéutico y radioterapéutico (^{177}Lu -DenAuNP-folato-bombesina). El compuesto radiomarcado con lutecio demostró estabilidad química, alta afinidad *in vitro* en células cancerosas y reducción considerable de la viabilidad celular de las células tratadas. En la siguiente tabla (tabla 1) se muestran las aplicaciones potenciales del ^{177}Lu en medicina nuclear:

Tabla 1. Aplicaciones potenciales del ^{177}Lu en medicina nuclear (Banerjee, Pillai, & Knapp, 2015).

Producto	Blanco	Expresión biológica	Aplicación
^{177}Lu -CC-49	Tumores asociados a antígenos (TAG-72)	Anticuerpo monoclonal murino asociado a la glicoproteína 72 (TAG 72) MoAb	Adenocarcinoma de colon y ovario.
^{177}Lu -J591	Antígenos específicos de próstata	PSMA antígeno	Cáncer de próstata
^{177}Lu -Rituximab	CD 20-MoAb	Anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano	Linfoma no-Hodgkin's
^{177}Lu -DOTATATE	Receptores de somatostatina (Subtipo 1-5)	Péptido DOTATATE	Cáncer neuroendocrino
^{177}Lu -EDTMP	Metástasis óseas	Ácido etilendiaminotetrametilenfosfónico	Tratamiento de metástasis óseas.

Finalmente es importante señalar que la inducción de muerte por radiación en un organismo o tejido está en función del tipo de célula irradiada, tipo y energía de

radiación, tasa de dosis entre otros. La radiación daña distintos componentes estructurales de la célula de forma no selectiva. Sin embargo, el material más vulnerable de la célula es el ADN, el cual puede ser dañado de forma directa (ruptura simple o doble de la cadena de ADN) o indirecta (producción de radicales libre por hidrólisis del agua) por efecto de la radiación.

Cuando el daño al ADN no puede ser reparado o tolerado se pueden manifestar aberraciones cromosómicas, mutaciones genéticas y transformaciones malignas. La muerte celular no es simplemente una consecuencia de la inactivación del genoma, se basa en reacciones enzimáticas complejas que desencadenan apoptosis, necrosis, autofagia y otras formas de muerte celular. Además, por medio del efecto (bystander), las células con daño radiobiológico pueden inducir muerte celular en células vecinas, no irradiadas a través de la liberación de citosinas y elementos altamente reactivos químicamente llamados radicales libres.

1.2.4. Radiofármacos Teranósticos basados en Nanopartículas de Au

Las nanopartículas de Au (AuNPs) tienen un gran potencial para aplicaciones biomédicas, y han sido ampliamente utilizadas como nanoplataformas en aplicaciones biomédicas como: agentes terapéuticos y diagnóstico entre otras. Las AuNPs presentan una gran estabilidad química, métodos de síntesis ampliamente investigados, habilidad para incorporarse selectivamente a blancos moleculares específicos con alto reconocimiento molecular entre otras características (Carrillo-Cazares, Jiménez-Mancilla, Luna-Gutiérrez, Isaac-Olivé, & Camacho-López, 2017; Hector Mendoza-Nava *et al.*, 2016).

Las AuNPs, cuando son expuestas a luz laser con una determinada longitud de onda presentan el fenómeno resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés). Durante este proceso las AuNPs absorben parte de la luz con las que

interactúan y es liberada en forma de calor al medio circundante. El fenómeno de SPR ha sido implementado con éxito para proporcionar terapia fototérmica plasmónica en sistemas *in vitro* e *in vivo* para inducir destrucción celular térmica irreversible (Zong, Cobb, & Cameron, 2017).

Por otra parte las AuNPs se han utilizado como nanoplataformas y han sido exitosamente radiomarcados para el diseño de radiofármacos teranósticos (Yook *et al.*, 2015). Uno de los mecanismos de conjugación más empleado en la síntesis de radiofármacos es la reacción espontánea de la superficie de AuNP con un tiol (cisteína) o una amina primaria N-terminal de la biomolécula con la que se busca conjugar (Jimenez-Mancilla *et al.*, 2012). Se considera que el grupo tiol es el tipo de molécula más importante para estabilizar AuNPs de cualquier tamaño mediante la formación de un modelo de "grapa" de dos grupos tiol que interactúan con tres átomos de oro en una conformación de puente (Bürgi, 2015; Tlahuice-Flores, Whetten, & Jose-Yacaman, 2013). Las AuNPs funcionalizadas con péptidos exhiben mayor estabilidad y biocompatibilidad, lo que les permite dirigirse hacia el objetivo deseado (Zong *et al.*, 2017).

Síntesis de Nanopartículas de Au

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas de Au que han sido reportados desde la década de los 50s. Uno de los métodos más ampliamente reportado es el presentado por Turkevitch en 1951 el cual consiste en la reducción de derivados de Au(III) mediante citratos de sodio en soluciones acuosas, el cual permite obtener nanopartículas de aproximadamente 20 nm (Frens, 1973).

EL proceso de reducción descrito por Turkevitch en 1951 inicia con la oxidación del citrato, formándose una dicaborxicetona y la liberación de electrones. Posteriormente la sal áurica se reduce a sal aurosa por los electrones liberados. Finalmente, la

dismutación/reducción de las especies aurosas conduce a la formación de las AuNPs. La síntesis de AuNPs por el método de reducción antes descrito es dependiente de la concentración de los precursores, de la tasa de adición, velocidad de mezclado, formación dicarboxicetona y la relación de las concentraciones (J. Kimling *et al.*, 2006; Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

Para evitar la aglutinación progresiva y la precipitación de macro moléculas en el proceso de síntesis de las AuNPs se agrega una solución estabilizadora que limita el crecimiento excesivo de las nanopartículas y de esta forma obtener una solución coloidal estable. Como se mencionó anteriormente los compuestos orgánicos como los grupos tiol (-SH) han sido ampliamente reportados para emplearse como solución estabilizadora debido a su gran afinidad que tienen por los metales nobles (Ferro-flores *et al.*, 2015).

Interacción de la luz con AuNPs

Sí una nanopartícula de oro (AuNPs) interactúa con la radiación electromagnética en la región visible y la frecuencia del campo electromagnético es resonante con el movimiento coherente de los electrones, se obtiene la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de los átomos de Au. A este fenómeno se le conoce como resonancia de plasmón de superficie (SPR). Los átomos de Au durante el SPR pasan de un estado estable a un estado excitado, dicha oscilación colectiva genera bandas de resonancia que reciben el nombre de plasmones localizado (Amendola, Pilot, Frasconi, Maragò, & Iatì, 2017).

El campo eléctrico oscilante de la luz incidente induce físicamente en las AuNPs un dipolo eléctrico, el cuál desplaza parte de los electrones libres (electrones de la banda de conducción del Au) en una dirección lejos del resto de la partícula metálica (Figura 8). Al estar alejados los electrones exteriores de la nanopartícula se generan una carga

neta negativa en un lado de la partícula y el resto de los núcleos en conjunto con los electrones internos que no se desplazan constituyen una carga opuesta positiva. La separación de cargas actúa como una fuerza restauradora de equilibrio para las AuNPs (Cruz *et al.*, 2012; Huang, Jain, El-Sayed, & El-Sayed, 2008).

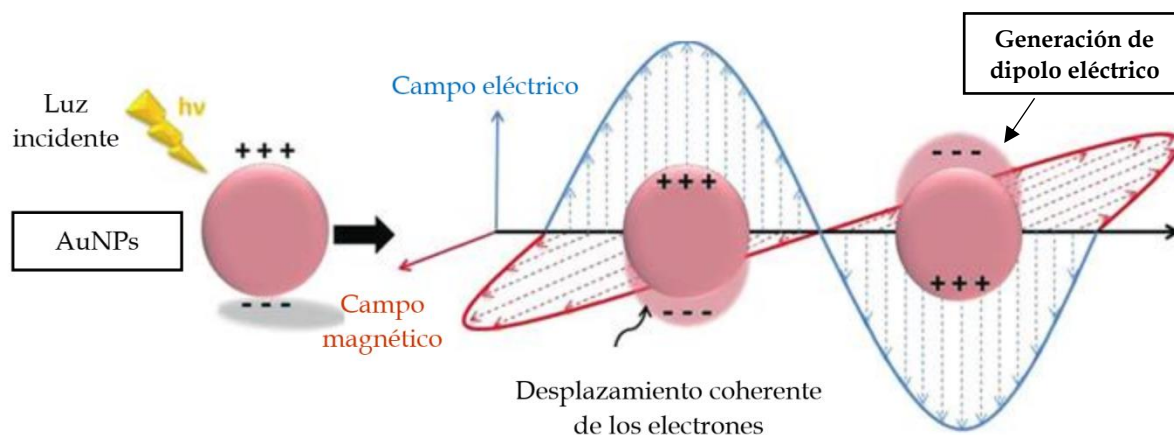


Figura 8. Diagrama ilustrativo del fenómeno de resonancia de plasmón de superficie.

La interacción de las AuNPs con la luz y las propiedades ópticas resultantes se pueden describir acorde al modelo de *Drude* mediante la función dieléctrica ε (1). La función dieléctrica del Au está definida como la suma del término $\varepsilon_B(\omega)$ la cuál considera la respuesta de los electrones de la banda de conducción 5d-6sp (parte de la ecuación) y el término $\varepsilon_D(\omega)$ (parte imaginaria de la ecuación) la cuál considera a los electrones libres de conducción. Donde $\omega = 2\pi c/\lambda$ la frecuencia angular de la luz. (λ = Longitud de onda, c = velocidad de la luz) (Gobin, Watkins, Quevedo, Colvin, & West, 2010).

$$\varepsilon = \varepsilon_B(\omega) + \varepsilon_D(\omega) \quad (1)$$

En 1908 Gustav Mie describió la interacción de una onda plana con un dieléctrico esférico partiendo de la solución analítica de las ecuaciones de Maxwell. Dicha teoría se basa en la hipótesis de que mientras el campo electromagnético de la onda

interactúa con la partícula existe una separación de cargas (electrones) en la superficie de la partícula. Mie desarrollo una solución analítica exacta para esferas con distintos diámetros (Hashimoto, Werner, & Uwada, 2012).

La probabilidad de absorción y de dispersión son representadas con la sección transversal de absorción (C_{abs}), la sección transversal de dispersión (C_{sca}) y la sección transversal de extinción ($C_{ext} = C_{abs} + C_{sca}$). El valor de cada una de las fracciones de luz (dispersada, absorbida, extinta) será dependiente de la longitud de onda de radiación incidente, del material, forma/ tamaño de la nanopartícula, y del medio circundante.

A través del modelo de Drude que considera la expresión de la función dieléctrica y tomando en cuenta que las AuNPs esféricas se encuentran envueltas en un medio no absorbente isotópico con una constante dieléctrica ϵ_m Mie cálculo la sección transversal de extinción dada por la siguiente ecuación:

$$C_{ext}(w) = 9 \frac{w}{c} (\epsilon_m)^{2/3} V_0 \frac{\epsilon''(w)}{[\epsilon''(w) + 2(\epsilon_m)]^2 + \epsilon''(w)^2} \quad (2)$$

Donde c es la velocidad de la luz al vacío, V_0 es el volumen de la nanopartícula esférica denotado como: $V_0 = (\frac{4\pi}{3})R^3$ y ϵ_m la constante dieléctrica del medio. De la ecuación (2) se puede deducir que la resonancia de plasmón de superficie depende en gran medida de la constante dieléctrica del medio. La absorbancia máxima por nanopartícula se presenta cuando $C_{ext}(w)$ es $\epsilon'(w) = \sim 2\epsilon_m$

La teoría completa de Mie para partículas esféricas suspendidas en un medio excede los objetivos de este trabajo dado su complejidad y área de aplicación por lo que solo se exponen de forma general los principales fundamentos teóricos que permiten explicar el fenómeno de SPR para el desarrollo de esta investigación.

El fenómeno SPR se manifiesta como una banda de absorción en la región visible. La longitud de onda (λ) a la que se obtiene dicha resonancia se le conoce como banda de absorción del plasmón de superficie. Durante este fenómeno el medio circundante en el que se encuentran suspendidas las AuNPs intensifica varios procesos ópticos como: absorción, dispersión y extinción. Los electrones superficiales de las nanopartículas interactúan con la radiación electromagnética mediante la interface nanopartícula-medio circundante lo que produce un campo eléctrico intensificado (Gobin *et al.*, 2010).

Diversos grupos de investigación han reportado que las AuNPs de 20 nm presentan fenómenos de SPR (con una banda de absorción en 520 nm) e incluso fenómenos de fluorescencia con altos rendimientos cuánticos cuando son preparadas por procedimientos de termo-reducción, por lo tanto, las AuNPs también pueden funcionar como agentes para la obtención de imágenes ópticas. Asimismo se ha reportado que cuando las AuNPs son expuestas a un campo de radiofrecuencia determinado, también liberan el calor suficiente para destruir a las células malignas (Dolamic, Varnholt, & Bürgi, 2013; Peeters *et al.*, 2012; Vilchis-Juárez *et al.*, 2014).

La deposición de energía resultante de la interacción de luz láser de AuNPs se puede describir en cuatro etapas: 1) La luz láser es absorbida por la matriz de electrones, creando electrones térmicos nacientes, 2) después de 100 fs el sistema alcanza un equilibrio térmico debido a las interacciones de dispersión electrón-electrón con electrones fríos de la banda de conducción, 3) la energía del electrón es transferida a la red del átomo a través de interacciones electrón-fonón, un fonón es una cuasipartícula o modo cuantizado vibratorio por el cual se transfiere el calor y el sonido 4) finalmente la energía de la red del átomo se transfiere al medio circundante mediante interacciones fonón-medio lo que conlleva un aumento de temperatura en el medio a través de un proceso de difusión de calor (Figura 9) (Amendola *et al.*, 2017).

La temperatura electrónica resultante de la termalización de la nube de electrones varía en cientos de grados en función de la energía del láser con la que son irradiados y la duración del pulso. Es importante señalar que la temperatura de fundición del Au es de 1065°C , sin embargo, cuando el material irradiado (AuNPs) se encuentran en escala nanométrica (1-100 nm) el punto de fundición disminuye en cientos de grados centígrados. Por ejemplo, se ha reportado que el punto de fundición para nanopartículas de 38 nm de diámetro es de 830°C , $\sim 200^{\circ}\text{C}$ menos que la temperatura de fundición de un volumen de Au (Inasawa, Sugiyama, & Yamaguchi, 2005; Petrova *et al.*, 2006). El cambio de temperatura requerido para alcanzar el punto de fusión varía en función del tamaño de la partícula debido al efecto “proporción volumen-superficie” (Jiang, Smith, & Pinchuk, 2013; Qiao, Feng, & Zhou, 2014; Wang *et al.*, 2016).

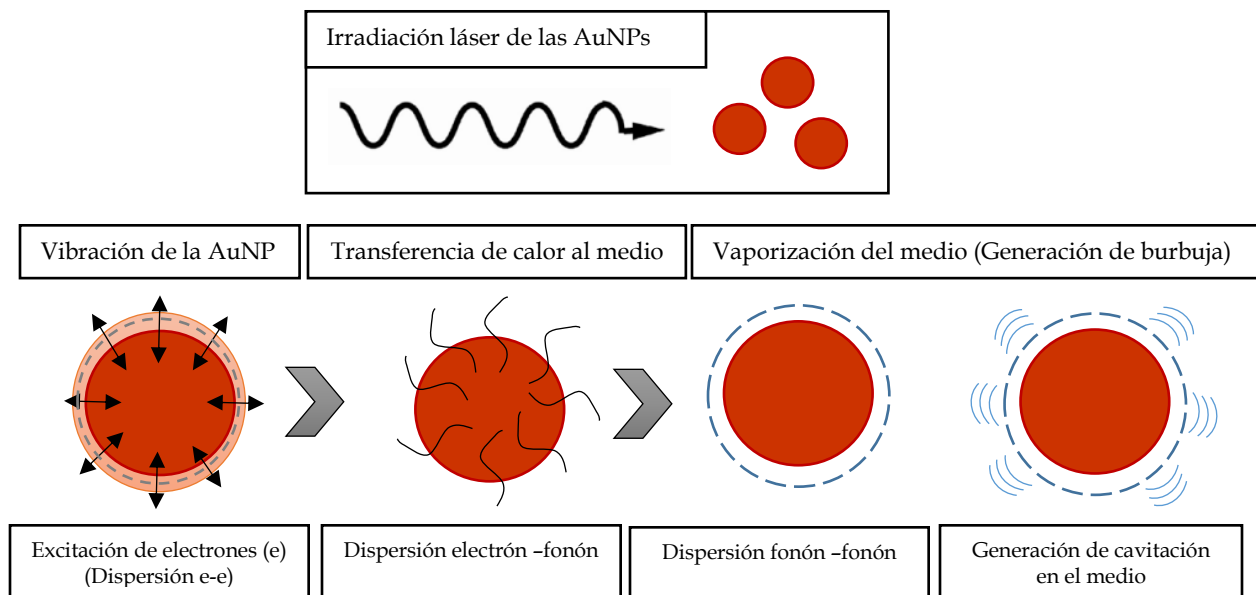


Figura 9. Dispersión de la energía resultante de la interacción de luz láser con AuNPs.

Producto del calentamiento de las AuNPs y de la transferencia de calor entre AuNP con el medio, las AuNPs pueden sufrir cambios en su estructura (diámetro, forma, entre otros) (Figura 10). Brevemente, la reducción de tamaño puede presentarse a

través de los siguientes procesos: 1) *Evaporación de superficie*: ocurre cuando la temperatura de las AuNP excede el punto de ebullición del Au y se tiene baja transferencia de calor al medio, 2) *Explosión columbiana*: en este modelo se presume la eyección de una gran cantidad de electrones que generan múltiples AuNPs ionizadas que sufren modificaciones en sus estructura debido a repulsión de cargas, 3) *Mecanismo de ablación* en el campo-cercano, el cual se presenta cuando las AuNPs son irradiadas con un láser de alta intensidad en femtosegundos (Fales, Vogt, Pfefer, & Ilev, 2017; González-Rubio, Guerrero-Martínez, & Liz-Marzán, 2016; Werner, Furube, Okamoto, & Hashimoto, 2011).

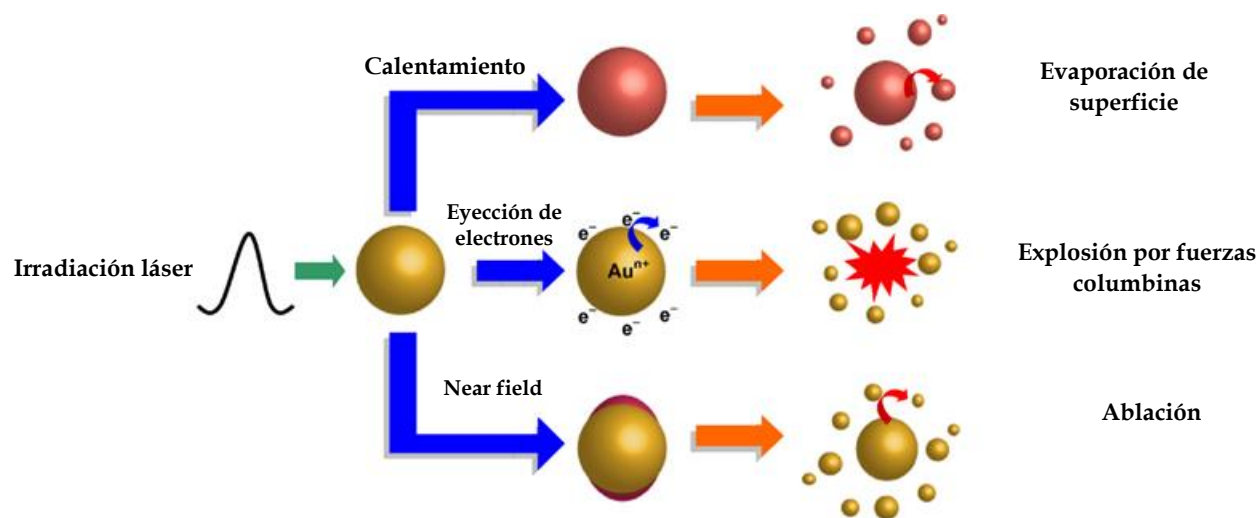


Figura 10. Mecanismos de reducción de las AuNPs al interactuar luz láser.

AuNPs y células tumorales

El valor terapéutico de las AuNPs se basa en sus propiedades físicas como el SPR y en su capacidad para interactuar con células tumorales. Se facilita la infiltración de AuNPs en el tumor debido a que muchos tumores presentan características de permeabilidad y retención incrementadas. La distribución subcelular de las AuNPs en las células tumorales depende de múltiples factores como: su tamaño, la morfología, los grupos funcionales en la superficie de la AuNP y el tipo de célula con el que interactúan. Las AuNPs pueden causar la muerte de células tumorales por ablación fototérmica, daño mecánico y aumento de la concentración localizada del

radiofármaco. Estos eventos se pueden combinar para mejorar la eficiencia del tratamiento, como es el caso de AuNPs marcadas con distintos radionúclidos (Zong *et al.*, 2017).

Una vez que las AuNPs se encuentran en el tejido tumoral (matriz extracelular del tumor) se deben superar múltiples obstáculos antes de que éstas se concentren en el blanco deseado (ej. Núcleo celular). Las AuNPs funcionalizadas con agentes para reconocimiento molecular deben pasar por procesos de: unión a la superficie celular, captación celular, internalización por vías endocitóticas y el subsecuente escape de los lisosomas/endosomas o internalización por vías no endocitóticas y finalmente la asociación con la ubicación subcelular blanco (ej. núcleo, mitocondrias) (Figura 11) (Zong *et al.*, 2017).

Una vez que los AuNPs están en la matriz extracelular del tumor (ECM, barrera 1), deben unirse a la superficie de la célula cancerosa. La captación celular requiere la translocación a través de la membrana plasmática (barrera 2), por endocitosis u otros mecanismos. Dentro de la célula, las AuNPs tienen que escapar de los endosomas o lisosomas (barrera 3) para posteriormente asociarse con el orgánulo o compartimiento celular deseado (barrera 4). Los posibles destinos finales son el núcleo (azul) o las mitocondrias (amarillo) (Kodiha, Wang, Hutter, Maysinger, & Stochaj, 2015).

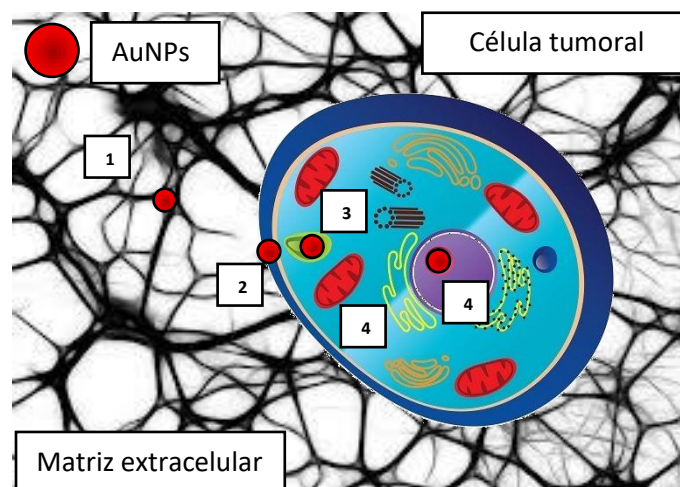


Figura 11. Barreras de ingreso de las AuNPs en células tumorales. 1) Las AuNPs deben ingresar a la matriz extracelular tumoral y unirse a las células, 2) Captación celular que requiere translocación a través de la membrana plasmática por endocitosis u otros mecanismos, 3) Dentro de la célula las AuNPs deben escapar de los endosomas o lisosomas y 4) Asociación con el orgánulo o compartimiento intracelular celular blanco como el núcleo (morado) o las mitocondrias (rojo).

De forma general las AuNPs presentan carga positiva lo cual estimula la captación celular debido a interacciones electrostáticas con la superficie celular. Se ha demostrado que la captación e internalización de las AuNPs mejora cuando son funcionalizadas con péptidos de internalización nuclear (NLS), los cuales están enriquecidos por residuos de aminoácidos básicos (Dykman & Khlebtsov, 2014; Gao *et al.*, 2013).

Hipertermia con AuNPs

La aplicación de calor al tratamiento del cáncer no es nueva y ha sido empleada desde principios del siglo XX. En la hipertermia tradicional, la región del cuerpo que contiene el tumor se calienta a $\sim 40\text{--}45$ ° C, varios grados por encima de la temperatura fisiológica (37 °C). El calor se genera externamente usando instrumentos que producen campos electromagnéticos (microondas u ondas de radio) o ultrasonido. Se ha utilizado la hipertermia tradicional, en combinación con quimioterapia y / o radioterapia, para tratamiento del cáncer (Abadeer & Murphy, 2016).

El calor generado por el efecto de SPR que presentan las AuNPs al ser irradiadas con luz láser, puede ser empleado como terapia para dañar/destruir células y tejidos cancerosos. La transferencia de calor de las AuNPs al medio en el que se encuentran suspendidas, conduce a la formación de una burbuja fototérmica en líquidos, provocando una evaporación explosiva del líquido circundante con la subsecuente disipación de calor. La diferencia entre la hipertermia tradicional y la terapia

fototérmica es que el calentamiento fototérmico solo se produce en el área directamente alrededor de las AuNPs, y las temperaturas locales pueden elevarse a decenas o cientos de grados por encima de la temperatura fisiológica (en escalas de tiempo muy cortas) (Vilchis-Juárez *et al.*, 2014). Esto implica que el calentamiento fototérmico estaría dirigido a los tumores en lugar de tejido sano, reduciendo así el potencial lado negativo de las terapias contra el cáncer (Abadeer & Murphy, 2016).

La muerte celular del cáncer puede resultar del daño ocasionado a la membrana celular, la desnaturalización de las proteínas intracelulares, el daño/deterioro del ARN/ADN, cambios en la expresión génica e inducción de la muerte celular a través de la apoptosis. Asimismo, el calentamiento también puede aumentar la susceptibilidad o sensibilizar las células cancerosas a otros tratamientos para el cáncer, como la radiación y la quimioterapia (Amendola *et al.*, 2017; Finkel *et al.*, 2016; Héctor Mendoza-Nava *et al.*, 2017).

Radiofármacos basados en ^{177}Lu -AuNPs

Los radiofármacos marcados con ^{177}Lu y conjugados con AuNPs como nanoestructura han sido ampliamente estudiados y se encuentran a la vanguardia de la innovación teranóstica (Ferro-flores *et al.*, 2015). Debido a sus propiedades ópticas, su naturaleza no tóxica, síntesis y funcionalización relativamente simple, las AuNPs han sido radiomarcadas exitosamente con ^{177}Lu con propósitos terapéuticos (emisión de β_{max}^- de 0.497 MeV) y diagnósticos (emisión γ de 0.208 MeV). Asimismo, las AuNPs han sido covalentemente conjugadas con péptidos de reconocimiento específico por blancos moleculares como las integrinas sobreexpresadas por células tumorales (Cai *et al.*, 2017).

Siguiendo el enfoque antiangiogénico teranóstico en 2013, Luna-Gutiérrez y sus colegas desarrollaron un nuevo compuesto radiofarmacéutico basado en la

formulación: ^{177}Lu -AuNP-RGD (empleando DOTA-GGC como agente quelante) con el potencial para tratar el cáncer. El compuesto de Luna presentó en experimentos *in vitro*: afinidad por la integrina $\alpha(V) \beta(3)$ sobreexpresada en la población celular de estudio y efecto terapéutico concomitante producido por el ^{177}Lu ($\beta_{\text{Max}} = 208 \text{ keV}$) en conjunto con el SPR de las AuNPs irradiadas por luz láser. En 2014 Vilchis y colaboradores desarrollaron experimentos con el sistema ^{177}Lu -AuNP-RGD en ratones átmicos para comprobar su eficiencia *in vivo* en el tratamiento de tumores inducidos y su potencial para la obtención de imágenes moleculares. En su trabajo Vilchis demostró el potencial antiangiogénico, terapéutico y diagnóstico de la formulación ^{177}Lu -AuNP-RGD.

La efectividad de la radioterapia dirigida con radiofármacos basados en ^{177}Lu -AuNP depende principalmente de la tasa de dosis absorbida y de la dosis absorbida total administrada al tumor y los tejidos normales. La dosis y su velocidad dependen de las propiedades físicas del radionúclido, la actividad inyectada y la cinética de captación y eliminación de la radioactividad dentro del tumor y de los tejidos/células normales ((Aranda-Lara et al., 2016; Héctor Mendoza-Nava et al., 2017)).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es la tercera causa de muerte en México y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 casos de mexicanos. Desde el 2008, es la principal causa de muerte en el mundo. Existen 100 tipos de cáncer, la mayoría son curables si se detectan en etapas tempranas. En México, acorde al Institucional del Instituto Nacional de Cancerología el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015; OMS, 2017; Taniguchi, 2013).

Lo cual indica que los actuales métodos de detección de cáncer se han visto superados o evadidos, por lo que surge la necesidad de proponer nuevos métodos de detección y tratamiento más confiables y veraces que propicien la detección del cáncer en una temprana etapa (OMS, 2017).

Una de las principales herramientas que ha surgido en el campo de la medicina nuclear, para la detección y tratamiento del cáncer es el diseño de radiofármacos denominados *teranósticos*, los cuales en diversos estudios preclínicos han demostrado su potencial aplicación como biomarcadores para la detección y tratamiento del cáncer (Ferrara *et al.*, 2003; Haubner & Decristoforo, 2009; Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013).

El proceso de angiogénesis es uno de los principales procesos involucrados en el desarrollo, crecimiento y metástasis del cáncer. Por lo que el estudio de la inhibición de los factores de crecimiento endotelial involucrados en la angiogénesis resulta de gran importancia en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas contra dicha enfermedad (Prakash & Rajamanickam, 2015).

Durante la última década, los radiofármacos de tercera de generación que involucran un radionúclido en su estructura, un agente bioactivo y un agente quelante han sido

expuestos como una eficiente alternativa en el tratamiento y diagnóstico del cáncer. Así mismo el uso de la radioterapia plasmónica empleando nanopartículas de Oro para el tratamiento del cáncer ha demostrado tener resultados favorables (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013; Luna-Gutiérrez *et al.*, 2012; Héctor Mendoza-Nava *et al.*, 2013). Por lo que surgen las siguientes preguntas de investigación.

1. ¿Es posible preparar una nueva molécula heterobivalente basada en aptámeros anti-VEGF, péptidos NLS-RGD conjugada con nanopartículas de Au y radiomarcada con Lu-177 que presente propiedades tanto antiangiogénicas, capacidad de internalización nuclear en células de cáncer, útil en terapia fototérmica plasmónica y para la obtención de imágenes moleculares?
2. ¿Será suficiente la captación específica del sistema multifuncional ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-RGD-NLS-Aptámero en tumores que sobreexpresan las integrinas α (v) β (3) y α (v) β (5) y factores VEGF, para producir una dosis de radiación terapéutica (>100 mGy por MBq administrado), así como para producir muerte celular por causas térmicas producto de la terapia plasmónica?

3. HIPÓTESIS

Por sus propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento molecular específico, el radiofármaco ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF hetero-multivalente que interactúa de forma concomitante con diferentes receptores asociados al proceso de angiogénesis de las células tumorales, hacen posible la obtención de imágenes específicas, sensibles y no invasivas del tumor. Asimismo, dicha formulación farmacéutica permite la termoterapia y radioterapia conjunta de blancos moleculares.

Hipótesis Alterna

El reconocimiento específico del radiofármaco teranóstico multifuncional ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF por células de cáncer que sobre expresen el factor VEGF₁₆₅ y las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$, produce un efecto antiangiogénico significativo.

Hipótesis Alterna 2

La unión específica de ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero al factor VEGF y a las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$, produce una captación suficiente en el tumor para producir ya sea una dosis de radiación terapéutica o un efecto termoterapéutico y la obtención de imágenes mediante las desintegraciones Gamma del ^{177}Lu o por fenómenos de fluorescencia de las AuNPs.

Hipótesis nula 1

La unión específica de ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF al factor VEGF y a las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$, no produce una captación suficiente en el tumor para producir ya sea una dosis de radiación terapéutica o un efecto termoterapéutico.

Hipótesis nula 2

La unión específica de ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF al factor VEGF y a las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$, no produce una captación suficiente en el tumor para producir la obtención de imágenes mediante las desintegraciones Gamma del ^{177}Lu .

Hipótesis nula 3

La unión específica de ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF al factor VEGF y a las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$, no produce un efecto antiangiogénico significativo.

4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, caracterizar y evaluar un radiofármaco teranóstico basado en nanopartículas de oro, radiomarcadas con ^{177}Lu , funcionalizadas con un aptámero (Anti-VEGF₁₆₅) y péptidos NLS-RGD con actividad antitumoral (antiangiogénica) útil en terapia fototérmica plasmónica, radioterapia dirigida y para la obtención de imágenes moleculares (ópticas y nucleares) en el seguimiento de la eficacia del tratamiento.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar químicamente el péptido heterobivalente NLS-RGD.
2. Sintetizar y caracterizar químicamente el agente quelante DOTA-GGC.
3. Sintetizar y caracterizar AuNPs de 20 nm funcionalizadas con el aptámero de RNA análogo al pegaptanib y con el péptido NLS-RGD.
4. Sintetizar y caracterizar AuNPs de 20 nm hetero-multivalentes conjugadas al aptámero de RNA, al péptido NLS-RGD y radiomarcadas con ^{177}Lu -DOTA-GGC.
5. Estudiar las propiedades fluorescentes y plasmónicas del sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero.
6. Evaluar la estabilidad en suero humano y la unión a proteínas séricas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia y ultrafiltración de ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero-.

7. Evaluar la captación específica y afinidad *in vitro* a la integrina humana $\alpha(v) \beta(3)$ y al VEGF.
8. Evaluar por microscopia epi-fluorescente la internalización del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-Aptámero-NLS-RGD de 20 nm al citoplasma y al núcleo de células C6 (Glioblastoma).
9. Obtener imagen Cerenkov (Xtreme) y nuclear (micro-SPECT/PET/CT) de los ratones atómicos con tumores inducidos (con células U87MG), inyectados con ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero para evaluar la captación del radiofármaco.
10. Evaluar la eficacia terapéutica del ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en modelos murinos con tumores inducidos y su posible correlación con factores involucrados en la angiogénesis.

5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México. Es un problema de salud que cada año va en aumento a nivel mundial. Su incidencia en hombres es de 66000 casos al año afectando a este género principalmente en próstata, pulmón, colon o recto y estómago; y en las mujeres se registran más de 82000 casos al año afectando principalmente a dicho género en la mama, pulmón, colon o recto y cérvix o útero (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015; Taniguchi, 2013).

Por lo que resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y métodos que permitan la detección del cáncer en etapas más tempranas. Así mismo es necesario diseñar nuevas alternativas en cuanto al tratamiento de dicha enfermedad, que sean más específicas y efectivas que los tratamientos actuales.

El desarrollo de radiofármacos teranósticos es una de las áreas de mayor crecimiento e interés en el estudio de la medicina nuclear. La síntesis de nuevos radiofármacos que integren propiedades multiméricas, multivalentes, teranósticas, antiangiogénicas y multimodales ha sido expuesta como una gran promesa para su potencial aplicación en diagnóstico y terapia de cáncer.

La inhibición del proceso de angiogénesis durante el desarrollo de una masa tumoral es uno de los enfoques de más reciente investigación debido a que sin la neovascularización necesaria para que el tumor obtenga todos los nutrientes necesarios para su desarrollo, este no puede crecer más allá de 1-2 mm.

Finalmente, esta propuesta promueve la investigación de sistemas que pueden actuar a nivel molecular y que en un futuro sirvan para el diagnóstico y terapia de enfermedades como el cáncer.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DE ESTUDIO

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo estructurado, longitudinal, observacional, descriptivo y de seguimiento de medidas experimentales con asignación aleatoria y grupo control.

6.1.1. Universo

- Línea celular C6 de glioblastoma.
- Línea celular U87MG de glioblastoma de rata.
- Ratones atómicos de 20 a 22 g con tumores inducidos con células U87MG.

6.1.2. Método de muestreo

Muestras no probabilísticas.

6.1.3. Tamaño de Muestra

- 62,000,000 de células para estudios de afinidad de receptores, aplicación de estudios de dosimetría de radiación y aplicación de casos experimentales de fototerapia térmica.
- 15-20 ratones atómicos de 20 a 30 g con tumores inducidos.

6.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

6.2.1. Criterios de Inclusión

- Pureza radioquímica del sistema ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF mayor a 90 %.
- Línea celular C6 y U87MG obtenidas libres de bacterias, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 100 % de humedad, en medio RPMI con suplemento de suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina).
- Ratones atímicos machos con un peso de 20 a 22 gramos, con tumores inducidos.

6.2.2. Criterios de Exclusión

- Pureza radioquímica del sistema ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF menor al 90 %.
- Líneas celulares sin proliferación.
- Ratones con sospecha de inexistencia de tumor.

6.2.3. Criterios de Eliminación

- Líneas celulares contaminadas y/o inestables en crecimiento durante los procesos de medición.
- Ratones que mueran durante la administración del radiofármaco, ratones con presencia de más de un tumor inducido.

•

6.3. PROCEDIMIENTOS

6.3.1. Síntesis de los péptidos NLS-RGD, DOTA-GGC.

La síntesis de los péptidos se realizó en fase sólida en colaboración con la Universidad de Guanajuato con el Dr. De León como se ha hecho en trabajos previos. Se sintetizó el NH₂-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys (Acm)-Gly-Cys (Acm)-CONH₂(NLS-CGCGC) y se acopló a través de la Cys⁹ al c(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys)-3-maleimidepropionilamida (c(RGDyK)-3MP).

Síntesis del c(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys)-3-maleimidepropionilamida (c(RGDyK)-3MP)

1. La síntesis del péptido lineal se inició con la incorporación de glicina en la resina de cloruro de o-clorotritil (Advanced ChemTec, con carga 0.93 mmol/g) a una escala de 1.29 mmol mezclando la resina con Fmoc-Gly-OH (975 mg, 2.5 equiv) y DIPEA (492 μ L, 1.15 equiv) en diclorometano seco (DCM). Después se agitó la mezcla y se dejó reaccionar por 2.5 h y se removió la resina lavando primero con DMF seguido de DCM.

2. La carga de la resina se determinó por HPLC, vía cuantificación del Fmoc removido con piperidina. A la resina se le adicionó 730 μ L de DIPEA en 4 mL de metanol cubriendo los sitios de la resina sin reaccionar. Después de 1 h, la resina se lavó con DMF seguido DCM. El grupo protector Fmoc se removió con una solución al 20% de piperidina en DMF.

3. Los aminoácidos se conjugaron usando un acoplamiento de un solo paso de 3.5 equiv. de Fmoc- amino ácido, 3,4 equiv HBTU y HOBT, 5 equiv DIPEA en DMF en el siguiente orden: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Tyr-OH y Fmoc-

Asp(OtBu)-OH por 2 h cada uno. El péptido lineal RGDyK se obtuvo de la resina sin afectar los grupos protectores por tratamiento con 10 ml de una mezcla de ácido acético, 2,2,2-trifluoroetano (TFE) y DCM (1:1:3) por 1.7 h a temperatura ambiente.

4. La solución resultante se filtró y la resina se lavó dos veces con 5 ml de la misma solución y posteriormente con DMC tres veces. Los filtrados se combinaron y se concentraron. El exceso de ácido acético se removió con repetidas adiciones de hexano y evaporó en un rotovapor. La ciclización del péptido se realizó por adición lenta de una solución conteniendo 612 mg del péptido lineal en 6.4 mL de DMC a una solución 50% ácido 1-propanofosfónico anhídrido cíclico (T3P) en EtOAc (2.73 mL), DIPEA (2.3 mL), y DMAP (5 mg) en 250 mL de DCM.

5. La solución se agitó durante toda la noche, la mezcla se concentró y se purificó por cromatografía de silica gel (metanol: acetato de etilo, 1:10 seguido de metanol: acetato de etilo, 1:5). Se colectaron las fracciones conteniendo el producto y el solvente se removió en un rotovapor. El residuo obtenido en DCM se lavó con agua, así mismo se colectó la fase orgánica y el solvente se removió. Los remanentes de los grupos protectores se removieron agitando la solución del péptido por 2 h con una mezcla de 95% TFA y 5% agua; el exceso de TFA se removió bajo un flujo de N₂.

6. Se adicionó éter etílico frío para producir un precipitado blanco, el éter etílico se decantó y el sólido se lavó 3 veces más con éter. La purificación se hizo por HPLC con gradiente agua/acetonitrilo conteniendo 0.1 TFA de 90/10 a 30/70 en 25 minutos a 1 mL/min.

Síntesis del péptido NLS-CGCGC

El péptido NLS-CGCGC tuvo la siguiente estructura: NH₂-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys (Acm)-Gly-Cys (Acm)-CONH₂, y se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

La síntesis comenzó con la incorporación del Fmoc-Cys (Acm) a la resina NovaSynTGR (Novabiochem, a 0.2 mmol/g) a escala 0.3 mmol. El proceso continuó hasta la Arg siguiendo el protocolo estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). Los grupos protectores se removieron de la resina con TFA/triisopropilsilano/H₂O (95/2.5/2.5) durante tres horas. La caracterización del compuesto se realizó por HPLC.

Síntesis del péptido conjugado NLS-RGD

El péptido ciclo(Arg-Gly-Asp-Tyr-Lys)(cRGDyK) se conjugó mediante el grupo maleidopropionil (MP) a través de la Lys, el grupo MP es utilizado para formar un enlace tioéter con la cadena lateral de la Cys⁹ de la secuencia del péptido de localización nuclear (NLS): NH₂-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-espaciador(=Gly)-N₂S₂(=Cys(Acm)-Gly-Cys(Acm)-CONH₂). La caracterización del péptido conjugado se realizó mediante la técnica HPLC y MALDI-TOF.

Síntesis del agente quelante DOTA-GGC

Ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético-Gly-Gly-Cys

La secuencia GGC sintetizada en fase sólida se conjugó al agente quelante DOTA activando los grupos carboxílicos con HATU/DIPEA, a temperatura ambiente. Se caracterizó por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (FAB).

6.3.2. Preparación de la conjugación ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC

El ¹⁷⁷Lu se obtuvo de ITG (Isotope Technologies Garching GmbH) con número de lote Lu-12-016-02/120185, calibrado el 17/02/2016, con actividad específica de 0.8

GBq/mg, pureza radioquímica $\geq 99\%$, pureza química $\geq 99\%$, pureza radionúclidica $\geq 99.9\%$. Para obtener $^{177}\text{LuCl}_3$ se adicionó HCl 0.12M.

El lutecio-177 se obtuvo en la forma química de $^{177}\text{LuCl}_3$ por irradiación durante 20 h de 2 mg de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ enriquecido al 64% en el dedal central del reactor Triga-Mark III del ININ (flujo $3\text{E}13 \text{ n/cm}^2\text{s}$) con posterior disolución en ácido clorhídrico 0.12M.

El radiomarcado del DOTA-GGC-AuNP se optimizó evaluando el efecto de la temperatura, relación molar ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP, tiempo de reacción, pH, y soluciones amortiguadoras utilizadas, aplicando un diseño factorial de niveles mixtos para su análisis por ANOVA.

6.3.3. Síntesis de las AuNPs

Se sintetizaron nanopartículas de 20 por termoreducción por el método reportado por Turkevitch en 1951 que consiste en la reducción de ácido cloroáurico (HAuCl_4) por citrato de sodio [$\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$]. Se sintetizaron nanopartículas de oro estabilizadas con citrato que posteriormente se sustituyó con el péptido NLS-RGD a través de los grupos cisteína (Acm) que se desprotegen al contacto con el oro.

6.3.4. Preparación de los péptidos a las AuNPs.

La conjugación DOTA-GGC-AuNPs o NLS-RGD-AuNPs se realizó por la reacción espontánea de grupos tiol (de la Cys) de cada uno de los péptidos con la superficie de las AuNPs. De forma general se mezclaron los péptidos y las AuNPs en una relación molar 5000:1 (péptido: nanopartícula), mezclando a temperatura ambiente de 5 min a 1 h para completar el reemplazo del citrato estabilizador de las AuNPs por los grupos tiol- de los péptidos. El conjugado DOTA-GGC-AuNPs se purificó por cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación.

6.3.5. Síntesis del Aptámero

El aptámero anti angiogénico se sintetizó con el apoyo de la empresa Iba-Solutions en Alemania bajo las siguientes características:

Estable en fluidos biológicos, análogo al pegaptanib pero tiolado, con secuencia RNA, (2'-deoxy-2'-fluoro)C-Gm-Gm-A-A-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Am-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-Gm-Am-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)-U-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Gm-(3'→3')-dT, 5-(phosphoonoxy)pentyl

6.3.6. Preparación de la conjugación DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero y caracterización fisicoquímica.

Se sintetizaron nanopartículas de 20 por termoreducción y se utilizó como agente estabilizante el aptámero pegaptanib obtenido comercialmente (Macugen, Pfizer) para quedar funcionalizado a través del grupo tiol a la superficie de la nanopartícula. El conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación. La caracterización química se hizo por TEM, XPS, UV-Vis, IR y se determinó la distribución del tamaño de nanopartícula y potencial Z por DLS.

Se establecieron las condiciones de reacción necesarias para la funcionalización estequiometrica del aptámero y el péptido a la nanopartícula, se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas, en particular las propiedades plasmónico-fluorescentes del conjugado DOTA-GGC -AuNPs- NLS-RGD-Aptámero

Espectroscopia UV-vis.

- Se identificó la estabilidad de la suspensión: DOTA-GGC-AuNPs-NLS-RGD-Aptámero por medio de espectroscopia UV-vis.
- Se determinaron el número de moléculas de péptidos por nanopartícula utilizando técnicas UV-vis.

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-FT).

- Se identificó la sustitución del citrato en la superficie de las AuNPs por el DOTA-GGC, NLS-RGD y Aptámero usando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Microscópica de transmisión electrónica (TEM).

- Se evaluó el tamaño y distribución de las nanopartículas formadas, por medio de microscópica de transmisión electrónica (TEM).

6.3.7. Radiomarcado del sistema AuNPs-Aptámero-NLS-RGD con la conjugación ^{177}Lu -DOTA-GGC

La adición de ^{177}Lu -DOTA-GGC permitió obtener el conjugado radiomarcado a través de los grupos tiol—previamente sintetizado y caracterizado en nuestro laboratorio—utilizando un diseño factorial experimental ANOVA y la pureza radioquímica como variable dependiente.

- Se optimizaron las condiciones de radiomarcado, pH de reacción, temperatura, relaciones molares de reactantes, efecto de la concentración de soluciones amortiguadoras usadas.

- Se purificó el sistema, por medio de cromatografía de exclusión de tamaño.
- 6.3.8. Evaluación de la pureza radioquímica del sistema Multifuncional ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero-anti-VEGF por radiocromatografía en capa fina y de exclusión molecular.**
- Se determinó la pureza radioquímica del complejo utilizando cromatografía de capa fina (ITLC-SG).
 - Se purificó el sistema, por medio de cromatografía de exclusión molecular (radio-HPLC).
 - Se determinó la estabilidad del conjugado ^{177}Lu -DOTA-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en suero humano a diferentes tiempos mediante un análisis por HPLC de exclusión molecular.

6.3.9. Afinidad del compuesto ^{177}Lu -DOTA-GGC -AuNP- NLS-RGD-Aptámero

Se determinó la afinidad por ensayos de competencia en microplaca del ^{177}Lu -DOTA-AuNPs-RGD-Aptámero a las proteínas VEGF e integrina $\alpha(\text{V})\beta(3)$.

6.3.10. Evaluación de la captación específica y afinidad *in vitro* del sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en células C6

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares C6 y U87MG, obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection) por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Instituto Nacional de Cancerología cumpliendo con todas las

normas vigentes de bioseguridad para su adquisición. Las células fueron rutinariamente cultivadas a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y 100 % de humedad, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Adrich Co) suplementado al 10 % con suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina) y levantadas de la caja de cultivo con 0.025 % de tripsina y 0.01 % de HANK's. El medio fue sustituido cada tercer día con 10 mL por caja de cultivo.

Conteo Celular

Para poder cuantificar el número de células por mililitro, las células fueron despegadas de la caja de cultivo utilizando 20 µL de tripsina y 2 mL de HANK's y se dejaron incubar en la caja de cultivo por tres minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El botón obtenido se resuspendió y se realizó un conteo de células utilizando una cámara de Neubauer.

Para realizar el conteo celular se tomaron 50 µl de la suspensión celular y se mezclaron con solución de azul de tripano (50 µl), posteriormente se colocó la mezcla en la cámara Neubauer, las células vivas se visualizaron en la cámara con un color brillante, mientras que las células muertas se visualizaron de color azul oscuro. La cámara está dividida en cuatro cuadrantes C₁, C₂, C₃, y C₄ se contó la cantidad de células vivas en cada cuadrante:

El cálculo de células vivas por mililitro de solución se realizó usando la siguiente ecuación:

$$Densidad_{celular} = \frac{C_1 C_2 C_3 C_4}{0.4} \frac{cel}{mm^3}$$

Donde 1 mm³ = 1 µL y 100 µL = 1mL, por lo que el número de células por mL está determinado por la siguiente relación:

$$No Cel = Densidad_{celular} * 1000 \frac{cel}{mL}$$

6.3.11. Ensayos de internalización y unión no específica del compuesto ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNPs- NLS-RGD-Aptámero

Los estudios de unión a receptores son hechos para determinar la afinidad del radiofármaco por su molécula blanco. Estos ensayos son llevados a cabo en membranas celulares, membranas de tejido o en células intactas de tejido. Los dos principales tipos de experimentos de unión son los estudios de saturación y de competencia. Las células C6 provistas en medio fresco, fueron incubadas con el radiofármaco. Después de la preincubación, las células se lavaron 3 veces con medio de cultivo frío (4 °C). Entonces se adicionó a las cajas más medio de cultivo a temperatura ambiente y se incubaron por triplicado a 37 °C durante 2, 4, 6 y 24 h. El radioligante se eliminó de la superficie de las células con dos lavados ácidos (glicina 50 mM HCl/100 mM NaCl, pH 2.8) a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la actividad total captada.

6.3.12. Cinética de Internalización celular del compuesto ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP- NLS-RGD-Aptámero

La cinética de internalización celular *in vitro* del sistema multifuncional ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en células C6 fue realizado cuantificando la actividad retenida en citoplasma y núcleo a diferentes tiempos, a fin de obtener las curvas del coeficiente de actividad integrada en el tiempo ($\tilde{A}h$) y determinar el número total de desintegraciones en la superficie y citoplasma de célula utilizando el código OLINDA/EXM (Stabin MG, 2005).

6.3.13. Evaluación *in vitro* del efecto térmico producido por el sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero en células U87MG

El efecto térmico se produjo a partir de la irradiación de las AuNP con láser para causar el efecto SPR de las nanopartículas.

Preparación de las células para Irradiación Láser

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo fresco a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y 100% de humedad, se removieron las células y se realizó el conteo celular en cámara Neubauer. Se sembraron 1x10³ células en cada pozo de una placa de 96 pozos y se colocó la cantidad necesaria de medio de cultivo para que el volumen final en el pozo sea 200 µL.

La placa se mantuvo a 37 °C, en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO₂) y 100 % de humedad durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y la placa se colocó en un baño seco a 37 °C.

Las células fueron expuestas a uno de los siguientes tratamientos (n = 6):

- a) 100 µL de AuNPs y 100 µL de PBS a pH 7
- b) 100 µL de DOTA-GGC-AuNPs-NLS-RGD y 100 µL de PBS a pH 7
- c) 100 µL de agua destilada (sin nanopartículas) y 100 µL de PBS a pH 7
- d) Grupo control (sin tratamiento)

Por motivos de comparación entre los tratamientos se realizó un experimento de calentamiento en placa, en donde la placa de 96 pozos fue calentada a 46 °C durante 6 minutos, este último experimento es considerado como el tratamiento e).

Se utilizó un láser pulsado Nd: YAG, llamado así por su acrónimo en inglés neodymium-doped yttrium aluminium garnet (Minilite, Continuum, Photonic Solutions, Edinburgh, U.K.). Con las siguientes características:

- Duración de pulso: 5 ns.

- Longitud de onda usada: 532 nm.
- Energía por pulso: 25 mJ.
- Tasa de repetición del pulso: 10 Hz.

Arreglo Experimental de la Irradiación con Láser

Se usó un arreglo de lente divergente para dirigir la trayectoria del haz de tal manera que el fondo circular del pozo de cultivo sea cubierto completamente por el haz (diámetro = 7 mm, área = 0.38 cm²) (Figura 12). La irradiancia en cada pozo se calculó como la potencia de láser por pulso dividido en el área 0.65 W/cm² de irradiancia promedio. Los tratamientos siguientes fueron irradiados durante 6 minutos:

- a) 100 μL de AuNPs y 100 μL de PBS a pH 7
- b) 100 μL de DOTA-GGC-AuNPs-NLS-RGD y 100 μL de PBS a pH 7
- c) 100 μL de agua destilada (sin nanopartículas) y 100 μL de PBS a pH 7

Después de la irradiación con el láser se retiraron los tratamientos y se colocó 200 μL de medio fresco de cultivo.

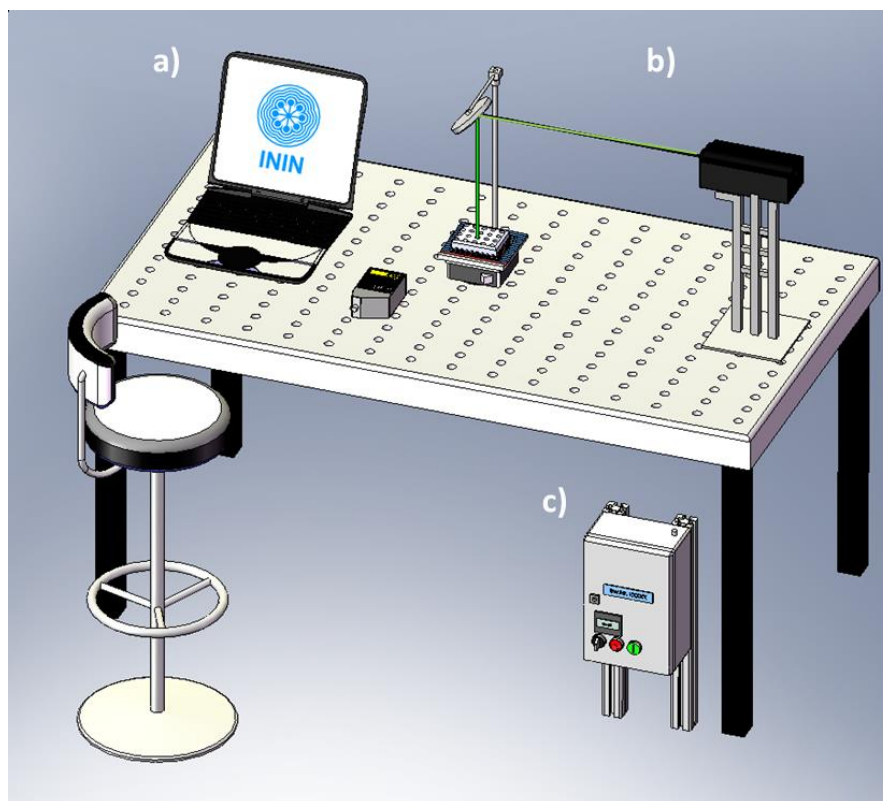


Figura 12. Arreglo láser para los experimentos.

Cuantificación del aumento de temperatura durante la irradiación

Durante la irradiación láser se colocó un termopar tipo K (modelo TP-01) de reacción inmediata y previamente calibrado (diámetro de la sonda=0.8 mm rango de temperatura -40 °C a +204 °C) dentro del pozo irradiando.

Un termopar es un sensor de temperatura que consiste en dos conductores metálicos diferentes, unidos en un extremo, denominado junta caliente-frío que produce un voltaje que es función de la diferencia de temperatura entre uno de los extremos denominado "punto caliente" y el otro denominado "punto frío". El voltaje producido en el termopar es transducido a temperatura por medio de una tarjeta Arduino que es un microcontrolador codificado para obtener la temperatura cada segundo y con salida USB que permite el registro y análisis de la temperatura cada

segundo en la computadora. La temperatura también se monitoreo en la placa calentada a 37 °C.

Medición de viabilidad después de la irradiación láser

El porcentaje de sobrevivencia celular se evaluó mediante la medición espectrofotométrica de la viabilidad celular en función de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial por la ruptura del anillo de tetrazolium (sodium 3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-nitro]benzene sulfonic acid hydrate), con el uso de un Kit de viabilidad celular XTT, en células viables para producir cristales de formazán de color naranja que es acidificado con isopropanol.

Con este método se tiene una relación directa entre la señal colorimétrica y el número de células vivas y representa una técnica de cuantificación de viabilidad por la actividad metabólica. La absorbancia resultante de la solución de color naranja con este método es medida a 480 nm en un lector de microplacas.

6.3.14. Obtención de imágenes del compuesto ^{177}Lu -DOTA-GGC -AuNP-NLS-RGD-Aptámero internalizado en células C6 con microscopio de fluorescencia

Las células C6 fueron incubadas con 100 μl de ^{177}Lu -DOTA-AuNPs-RGD-Aptámero y 100 μl de PBS bajo un pH 7 durante 2 horas. Después del tratamiento, las células fueron lavadas con 100 μl de PBS, fijadas con acetona y posteriormente lavadas con PBS. Posteriormente se les adicionó 250 μl (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de Hoechst (Pigmento de DNA) y se incubaron durante un minuto, subsecuentemente se lavaron con PBS y se montaron para ser observadas en un microscopio de fluorescencia. Con un filtro de excitación de 330-385 nm y un filtro de emisión de 420 nm para visualizar el

pigmento Hoechst dentro de las células y un filtro de excitación de 530-550 nm y un filtro de 590 nm para detectar la fluorescencia de las AuNPs.

6.3.15. Obtención de la biodistribución del radiofármaco en ratones atímicos con tumores inducidos con células U87MG

La inducción de tumores y la biodistribución se realizaron de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los desechos biológicos tanto animales como de las células de cáncer, se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Bioseguridad NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Modelo Animal

Los ratones atímicos (20-22g) fueron colocados en cajas estériles con camas de aserrín estéril, con temperatura, humedad y ruido constantes y periodos de luz de 12:12. El agua y la comida estándares fueron suministrados ad libitum (Comida estándar PMI 5001).

Inducción del tumor en ratones Atímicos

Los tumores fueron inducidos en el lomo de ratones atímicos de entre 6 y 7 semanas de edad mediante inyección subcutánea de células U87MG resuspendidas en 0.2 mL de buffer de fosfato-salina. Los sitios de inyección se revisaron a intervalos regulares a fin de evaluar la formación del tumor y su progresión.

Radiofarmacéutica y Biodistribución

El radiofármaco se administró intratumoralmente. Los ratones (n = 4) se analizaron a los 30 min, 1, 3 24, 48, 72 y 96 h post-inyección. Al final del análisis los ratones se

sacrificaron y por disección se extirparon el corazón, bazo, páncreas y los riñones, así como muestras de tumor, pulmones, hígado, sangre, intestinos y músculo. Los tejidos se enjuagaron en solución salina y se colocaron en tubos de plástico previamente pesados. La actividad en los tejidos extraídos se cuantificó en un detector de centelleo sólido (Canberra) junto con seis alícuotas de 0.5 mL que representan la dilución de un estándar correspondiente al 100 % de la actividad inyectada. Las actividades promedio fueron usadas para obtener el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% IA/g.)

Para evaluar la captación no específica en los tumores u órganos positivos a los receptores se realizaron estudios de biodistribución en paralelo, pero utilizando animales a los que previamente (30 min) se les había administrado vía intraperitoneal el grupo de receptores bloqueadores (n=4). Se determinó el tiempo de residencia promedio en el tumor y órganos fuente, así como la cinética de eliminación.

Obtención de los modelos biocinéticos y cálculo de la dosis absorbida de radiación en los tumores inducidos con células U87MG y órganos de interés en los ratones atómicos.

La dosis absorbida por unidad de coeficiente integrado en el tiempo (S) dado por el nanoconjugado en las regiones blanco (corazón, pulmón, hígado, páncreas, bazo, riñón, intestino, musculo, hueso y tumor) fue calculada a partir de una simulación teórica-computacional donde el modelo geométrico simulado fue el sistema biológico de un ratón. Matemáticamente S se expresa como se muestra en la ecuación 3:

$$S = \sum \frac{\delta_i \cdot \varphi_i}{m} \quad (3)$$

Donde δ_i es la energía promedio emitida de la región fuente, φ_i es la fracción de energía emitida de la región fuente que es absorbida en la región blanco y m es la masa de la región blanco.

Con el uso de los modelos biocinéticos (curvas de actividad vs tiempo) se determinó el número total de desintegraciones en las regiones y órganos blanco obtenidos en el objetivo anterior y se calculó el coeficiente de actividad integrado en el tiempo (\tilde{A}_h) en los órganos blanco y tumor. Mediante la metodología MIRD se calculó teóricamente la dosis absorbida ($D = \tilde{A}_h * S$ donde D , se define como la cantidad de energía depositada por la radiación en una unidad de masa, con unidades J/ kg) en las regiones blanco, usando la dosis absorbida por unidad de coeficiente de actividad integrado en el tiempo (S) calculado en cada región.

Obtención de imágenes moleculares in vivo, modelo biocinético y cálculo de dosis absorbida.

Se obtuvieron imágenes en ratones atómicos de tumores inducidos, a los 5 y 30 min, 1, 3, 24, 48 y 72 h después de la administración de ^{177}Lu -DOTA-AuNP-RGD-Aptámero utilizando el sistema de imagen preclínica óptica *in vivo* Xtreme y en un microSPECT/PET/CT (imagen nuclear) a fin de obtener los modelos biocinéticos en los diferentes órganos fuente necesarios para calcular la dosis de radiación absorbida utilizando la metodología MIRD.

6.3.16. Evaluación de la eficacia terapéutica del nanosistema

Se trataron ratones con tumores inducidos a diferentes actividades del radiofármaco utilizando grupos control (ej. sistema sin nanopartícula) y grupos sin tratamiento. Para la evaluación terapéutica del radiofármaco se determinó la inhibición del crecimiento tumoral mediante la medición de su volumen después de los tratamientos utilizando el equipo de imagen preclínica Xtreme (imagen de rayos X en 3D), y de manera teórica se calculó el tamaño del tumor con la fórmula: $V = \pi/6 * (L) * (a^2)$; (donde L = diámetro mayor y a = diámetro menor).

A otro grupo de ratones con los tumores inducidos antes mencionados, se les administró intratumoralmente el radiofármaco y se irradió la región del tumor con un láser (Nd:YAG, pulsado por 5 ns a 532 nm, 10 Hz, 6 min para producir 0.65W/cm²). Se les dio seguimiento evaluando la actividad tumoral por imagen Cerenkov con ¹⁸F-FDG a 1, 2, 3, 5 y 7 días después del tratamiento. La toxicidad sistémica del tratamiento se realizó mediante monitoreo semanal del peso corporal de los animales. La toxicidad renal se determinó midiendo la creatinina sérica, proteínas totales, BUN (nitrógeno ureico) y ácido úrico como pruebas de función renal después de los tratamientos.

6.4. VARIABLES

6.4.1. Independientes

- ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero

6.4.2. Dependientes

- Dosis de radiación.
- Efecto fototérmico producido.
- Efecto antiangiogénico.

6.4.3. Intervinientes

- Pureza radioquímica.
- Proliferación celular.
- Captación.
- Retención.
- Afinidad al VEGF₁₆₅
- Afinidad a los receptores de las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ y $\alpha(v)\beta(5)$
- Depuración biológica del nanosistema.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadísticos
Radiofármaco	Toda aquella sustancia que contiene un átomo radiactivo en su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrada en humanos para fines de diagnóstico y terapia.	a) HPLC b) ITLC c) Ultrafiltración	Cuantitativa	Razón = $R_f/Total$	Anova
Dosis absorbida en comportamiento celulares	Es la energía depositada por las PI en una región blanco con masa conocida.	Metodología MIRD celular	Cuantitativa	[Gy]	Anova de tres vías
Dosis absorbida en ratón	Es la energía depositada por las PI en una región blanco con masa conocida.	Metodología MIRD celular	Cuantitativa	[Gy]	Anova de tres vías
Efecto térmico producido	Cantidad de calor producido por la nanopartícula de oro al ser irradiada con un láser de longitud de onda cercana a la resonancia del plasmón de superficie.	Termopar	Cuantitativa	[°C]	Anova de tres vías
Efecto Antiangiogénico del radiofármaco	Creación de nuevos vasos sanguíneos	Neovasculatura	Cuantitativa	-----	T de student

6.5. IMPLICACIONES BIOÉTICAS

Este estudio no involucra seres humanos ya que es una investigación del área de ciencias básicas.

En lo referente a la producción, manejo, almacenamiento o transporte de fuentes de radiación, se sigue la norma de seguridad e higiene vigente: NOM-012-STPS-1999. La clasificación de los desechos radioactivos se realiza bajo la norma: NOM-004-NUCL-1994 y se acatan todas las indicaciones y requerimientos para instalaciones de tratamiento y acondicionamiento de desechos radiactivos que se encuentran estipulados en la NOM-36-NUCL-2001. Por otro lado, los estudios de inducción de tumores y de biodistribución en los ratones atómicos se realizaron de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los desechos biológicos provenientes de los ratones y de las células de cáncer C6 y U87MG, se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de Bioseguridad NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

6.6. RECOLECCIÓN DE DATOS

La recolección de los datos para la caracterización de los péptidos por sí solos y los conjugados a las nanopartículas de oro se realizó con 20 barridos aproximadamente de cada una de las técnicas espectroscópicas.

Para los estudios de captación específica y afinidad *in vitro* del sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-RGD-NLS-Aptámero en células de cáncer glioblastoma (C6) que sobreexpresan las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$, $\alpha(v)\beta(5)$, y el factor VEGF, la recolección de los datos se realizó de forma directa cuantificando la actividad de las muestras en un detector de centelleo tipo-pozo.

La recolección de datos del aumento de la temperatura en las células C6 se obtuvo de forma indirecta mediante la medición del voltaje producido por un termopar, ya que el voltaje es función directa de la temperatura.

En el caso de la cuantificación de la viabilidad celular la recolección de los datos se realizó mediante la medición espectrofotométrica de la viabilidad celular en función de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, con el uso del Kit de viabilidad celular XTT, en donde se cuantifica la absorbancia producida por las muestras, y está directamente relacionada con la cantidad de células vivas.

En los estudios de biodistribución en los ratones la recolección de datos se realizó de forma directa mediante la medición de la actividad en los órganos de interés en un detector de centelleo tipo-pozo. Para la obtención de los modelos biocinéticos y la dosis absorbida de radiación en los ratones la recolección de los datos se realizó mediante una aproximación teórica a partir de los datos de biodistribución. La adquisición de imágenes se realizó mediante el equipo preclínico multimodal Xtreme.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

- En los estudios de pureza radioquímica se aplicó un análisis por ANOVA.
- El análisis aplicado para la comparación entre grupos control y tratamientos en los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se empleó un análisis estadístico de t-student o ANOVA de tres vías según sea el caso con un grado de significancia $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. ARTÍCULO PUBLICADO

J Radioanal Nucl Chem
DOI 10.1007/s10967-017-5465-x



Synthesis and in vitro evaluation of an antiangiogenic cancer-specific dual-targeting ^{177}Lu -Au-nanoradiopharmaceutical

Abraham González-Ruiz^{1,2} · Guillermina Ferro-Flores¹ · Erika Azorín-Vega¹ · Blanca Ocampo-García¹ · Flor de María Ramírez¹ · Clara Santos-Cuevas¹ · Luis De León-Rodríguez³ · Keila Isaac-Olivé² · Myrna Luna-Gutiérrez¹ · Enrique Morales-Ávila²

Received: 9 August 2017
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2017

Abstract The aim of this research was to synthesize and chemically characterize a cancer-specific ^{177}Lu -Au-nanoradiopharmaceutical based on gold nanoparticles (NPs), the nuclear localization sequence (NLS)-Arg-Gly-Asp peptide and an aptamer (HS-pentyl-pegaptanib) to target both the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and the vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpressed in the tumor neovasculature, as well as to evaluate by the tube formation assay, the nanosystem capability to inhibit angiogenesis. ^{177}Lu -NP-RGD-NLS-Aptamer was obtained with a radiochemical purity of $99 \pm 1\%$. Complete inhibition of tube formation (angiogenesis) was demonstrated when endothelial cells (EA.hy926), cultured in a 3D-extracellular matrix support, were treated with the developed nanosystem.

Keywords Lutetium-177 · ^{177}Lu -gold nanoparticles · Antiangiogenic agent · RGD · HS-pentyl-pegaptanib · VEGF inhibition · $\alpha(v)\beta(3)$ integrin

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10967-017-5465-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Guillermina Ferro-Flores
ferro_flores@yahoo.com.mx;
guillermina.ferro@inin.gob.mx

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

² Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, 50180 Toluca, Estado de México, Mexico

³ The University of Auckland, 23 Symonds St, Auckland, New Zealand

Published online: 08 September 2017



Introduction

^{177}Lu -nanoradiopharmaceuticals based on gold nanoparticles (NPs) are in the spotlight of theranostic innovation. Due to their optical properties, nontoxic nature, relatively simple preparation and functionalization, NPs have been successfully labeled with ^{177}Lu (therapeutic β_{max}^- emission of 0.497 MeV and γ radiation of 0.208 MeV for diagnostic imaging) and covalently bound to molecules with target-specific recognition to obtain nanosystems with properties suitable for optical and nuclear imaging, plasmonic-photothermal therapy and targeted radiotherapy on a single platform [1–3].

Solid tumors require the formation of new blood vessels (angiogenesis) for growth, and many new cancer therapies are directed against the tumor vasculature [4, 5]. Multiple angiogenesis inhibitors have been therapeutically validated in preclinical and clinical trials [6].

The $\alpha(v)\beta(3)$ integrin is a specific marker of the neovasculature, which is overexpressed in the tumor vessels during angiogenesis. The Arg-Gly-Asp (RGD) peptide motifs have been identified as high-affinity $\alpha(v)\beta(3)$ selective ligands and therefore as antiangiogenic agents [7]. Furthermore, RGD conjugated to radiolabeled peptides with a nuclear localization peptide sequence (NLS) promote the radionuclide internalization in cancer cells overexpressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins, increasing the effectiveness of targeted radiotherapy [8, 9].

Aptamers are single-stranded deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid oligonucleotides, which can bind their target with high selectivity and affinity [10]. Pegaptanib is an aptamer that inhibits angiogenesis by targeting the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway [11].

7.1.1. Synthesis and in vitro evaluation of an antiangiogenic cancer specific dual-targeting ^{177}Lu -Au-nanoradiopharmaceutical

Abraham González-Ruíz^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores^{1*}, Erika Azorín-Vega¹, Blanca Ocampo-García¹, Clara Santos-Cuevas¹, Flor de María Ramírez³, Luis De León-Rodríguez⁴, Enrique Morales-Ávila⁵, Keila Isaac-Olivé⁶

¹Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Department of Radioactive Materials, Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.

²Universidad Autónoma del Estado de México, Faculty of Nursing, Toluca, Estado de México 50180, MEXICO.

³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Department of Chemistry, Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.

⁴The University of Auckland, School of Chemical Sciences, 23 Symonds St, Auckland, NEW ZEALAND.

⁵Universidad Autónoma del Estado de México, Faculty of Chemistry, Toluca, Estado de México 50180, MEXICO.

⁶Universidad Autónoma del Estado de México, Faculty of Medicine, Toluca, Estado de México 50180, MEXICO.

**Corresponding author*

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.

(ORCID ID : 0000-0003-0296-7605)

Departamento de Materiales Radiactivos

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca S/N

La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México,

52750 MEXICO

Tel. + (52) (55)-53297200

guillermina.ferro@inin.gob.mx

7.1.2. Apartados en el Artículo

19 **Synthesis and *in vitro* evaluation of an antiangiogenic**
20 **cancer-specific dual-targeting**
21 ¹⁷⁷**Lu-Au-nanoradiopharmaceutical**

22 A. González-Ruiz^{1,2}, G. Ferro-Flores^{1*}, E. Azorín-Vega¹, B. Ocampo-García¹, F. de M.
23 Ramírez¹, C. Santos-Cuevas¹, L. De León-Rodríguez³, K. Isaac-Olivé², M. Luna-
24 Gutiérrez¹ and E. Morales-Ávila²

25 ¹*Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N,*
26 *Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.*

27 ²*Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, Toluca, Estado de*
28 *México 50180, MEXICO.*

29 ³*The University of Auckland, 23 Symonds St, Auckland 1061, NEW ZEALAND*

30 **Abstract**

31 The aim of this research was to synthesize and chemically characterize a cancer-specific
32 ¹⁷⁷Lu-Au-nanoradiopharmaceutical based on gold nanoparticles (NPs), the nuclear
33 localization sequence (NLS)-Arg-Gly-Asp peptide and an aptamer (HS-pentyl-
34 pegaptanib) to target both the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and the vascular endothelial growth factor
35 (VEGF) overexpressed in the tumor neovasculature, as well as to evaluate by the tube
36 formation assay, the nanosystem capability to inhibit angiogenesis. ¹⁷⁷Lu-NP-RGD-NLS-
37 Aptamer was obtained with a radiochemical purity of $99 \pm 1\%$. Complete inhibition of
38 tube formation (angiogenesis) was demonstrated when endothelial cells (EA.hy926),
39 cultured in an 3D-extracellular matrix support, were treated with the developed
40 nanosystem.

41 **Keywords**

42 lutetium-177; ¹⁷⁷Lu-gold nanoparticles; antiangiogenic agent; RGD; HS-pentyl-
43 pegaptanib; VEGF inhibition; $\alpha(v)\beta(3)$ integrin.

44 **Introduction**

45 ^{177}Lu -nanoradiopharmaceuticals based on gold nanoparticles (NPs) are in the spotlight of
46 theranostic innovation. Due to their optical properties, non-toxic nature, relatively simple
47 preparation and functionalization, NPs have been successfully labeled with Lutetium-177
48 (therapeutic β_{max} emission of 0.497 MeV and γ radiation of 0.208 MeV for diagnostic
49 imaging) and covalently bound to molecules with target-specific recognition to obtain
50 nanosystems with properties suitable for optical and nuclear imaging, plasmonic-
51 photothermal therapy and targeted radiotherapy on a single platform [1-3].

52 Solid tumors require the formation of new blood vessels (angiogenesis) for growth, and
53 many new cancer therapies are directed against the tumor vasculature [4,5]. Multiple
54 angiogenesis inhibitors have been therapeutically validated in preclinical and clinical
55 trials [6].

56 The $\alpha(v)\beta(3)$ integrin is a specific marker of the neo-vasculature, which is overexpressed
57 in the tumor vessels during angiogenesis. The Arg-Gly-Asp (RGD) peptide motifs have
58 been identified as high-affinity $\alpha(v)\beta(3)$ selective ligands and therefore as antiangiogenic
59 agents [7]. Furthermore, RGD conjugated to radiolabeled peptides with a nuclear
60 localization peptide sequence (NLS) promote the radionuclide internalization in cancer
61 cells overexpressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins, increasing the effectiveness of targeted
62 radiotherapy [8, 9].

63 Aptamers are single-stranded deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid oligonucleotides,
64 which can bind their target with high selectivity and affinity [10]. Pegaptanib is an
65 aptamer that inhibits angiogenesis by targeting the vascular endothelial growth factor
66 (VEGF) pathway [11].

67 One of the most widely used *in vitro* assays to model the reorganization stage of
68 angiogenesis is the tube formation assay. This assay measures the ability of endothelial
69 cells to form capillary structures (tubes). The study focuses on how specific signaling
70 molecules are involved in the three-dimensional formation of vascular networks.

71 Compounds which inhibit the formation of tubes could be useful as specific
72 antiangiogenic agents [12].

73 The use of heterobivalent molecules interacting concomitantly with different receptors in
74 tumor cells is an approach for drug enhancement for specific and sensitive tumor imaging
75 [13-15].

76 The aim of this study was to synthesize and chemically characterize a cancer-specific
77 ¹⁷⁷Lu-Au-nanoradiopharmaceutical based on NPs, NLS-RGD and aptamer able to target
78 both the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and the VEGF, as well as evaluate by the tube formation
79 assay, the nanosystem capability to inhibit angiogenesis.

80 **Experimental**

81 1. Synthesis of the NLS-RGD peptide

82 The synthesis procedure is described in detail in the Supplementary information section.
83 Briefly, the cyclo(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys)-3-maleimidepropionylamide (c(RGDyK)-
84 3MP) and NH₂-Gly¹-Arg²-Lys³-Lys⁴-Arg⁵-Arg⁶-Gly⁷-Gly⁸-Cys⁹-Gly¹⁰-Cys¹¹(Acm)-
85 Gly¹²-Cys¹³(Acm)-CONH₂ (NLS-CGCGC) peptides were first synthesized and bound
86 through the -3MP and Cys⁹ to produce the NH₂-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-
87 [c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)-3-succinimidepropionylamide]-Gly-Cys(Acm)-Gly-
88 Cys(Acm)-CONH₂ (NLS-RGD) peptide; m/z (MALDI+) m/z = 2248.18 [M+H]⁺ (calcd.
89 2250.46).

90 2. Synthesis of the Aptamer-SH (Pegaptanib derivative)

91 The aptamer analogue to pegaptanib was designed to interact covalently with gold atoms
92 on the nanoparticle surface by adding a HS-pentyl (-SH terminal group) and it was
93 synthesized with support of the Iba Solutions Company (Germany). The RNA sequence
94 of the aptamer is as follows: ((2'-deoxy-2'-fluoro)C-Gm-Gm-A-A-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-
95 (2'-deoxy-2'-fluoro)C-Am-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-Gm-Am-Am-(2'-deoxy-2'-
96 fluoro)U-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-(2'-deoxy-2'fluoro)U-Am-(2'-

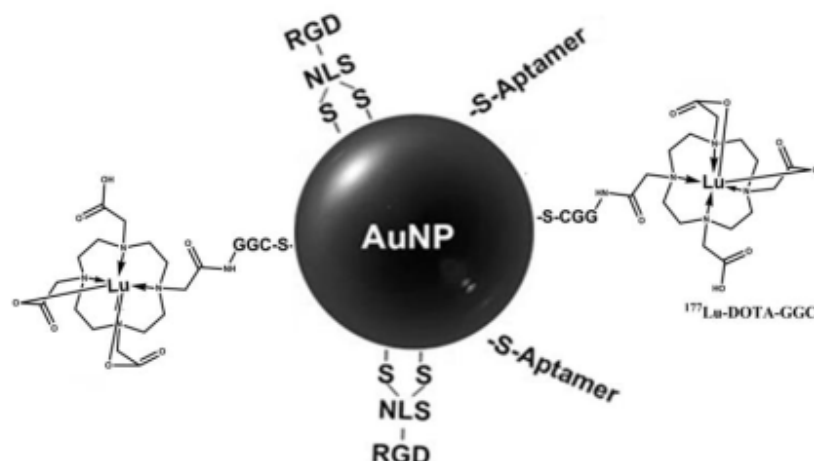
97 deoxy-2'-fluoro)U-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)U-(2'-deoxy-2'-
98 fluoro)C-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Gm-(3'→3')-dT),5-(phosphoony)pentyl]thiol]. The
99 methodology of the synthesis included: 1) standard linkage of 28 RNA bases; 2) the
100 attachment of 2'-fluoro to every U and C, 3) the attachment of 2'-O-Methyl at 2,3,8,9,11-
101 13,15,19,21,23 and 27; 4) inverse modification dT, 5 5'-thiol; and 6) HPLC purification
102 of the RNA. PM=9197.25 g/mol. The final product was lyophilized on a scale of 29
103 nmol.

104 3. Conjugation of NLS-RGD and aptamer to the NPs

105 A NP solution stabilized with PBS (1 mL, 20 nm, 6.54×10^{11} particles/mL, Sigma
106 Aldrich) was added to 10 μ L of a NLS-RGD solution (1 mg/10 mL; 2.68×10^{14} molecules;
107 16 molecules per 20 nm nanoparticle) followed by 10 μ L of an aptamer solution (29
108 nmol/10 mL; 1.767×10^{13} molecules; 27 molecules per 20 nm nanoparticle). The
109 conjugation of the aptamer and NLS-RGD molecules to the NP was performed by
110 reactions of the -SH with NP surface. Since up to 1701 peptides or molecules can be
111 attached to one NP (20 nm, surface area=1260 nm²) [16], no further purification was
112 necessary.

113 4. Preparation of the ¹⁷⁷Lu-Au-nanoradiopharmaceutical (¹⁷⁷Lu-NP-RGD-NLS-Aptamer)

114 The 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-Gly-Gly-Cys
115 (DOTA-GGC) peptide to be used as chelator for Lu-177 (DOTA), was synthesized
116 according to the method described by Luna-Gutiérrez et al. [17]. The detail methods to
117 prepare ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-NP and to evaluate its radiochemical purity have been shown
118 elsewhere [17,19]. To 1 mL of the NP-NLS-RGD-Aptamer solution, 3 μ L (18-20 MBq)
119 of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC was added (0.25 μ g of peptide; 1.89×10^{14} molecules; 270
120 molecules per 20 nm NP) to form the ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer
121 nanosystem (¹⁷⁷Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer) (Fig. 1). For chemical characterization and
122 comparative purposes, the radioactive and non-radioactive systems of DOTA-GGC-NP,
123 DOTA-GGC-NP-NLS-RGD, DOTA-GGC-NP-Aptamer and DOTA-GGC-NP-NLS-
124 RGD-Aptamer were also prepared using the same procedure.



125

126 **Fig. 1** Overall scheme of the ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer nanoradiopharmaceutical

127 5. Chemical characterization

128 The DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer was characterized in size and shape by
 129 transmission electron microscopy (JEOL JEM2010 HT microscope operated at 200 kV).
 130 The hydrodynamic diameter and Zeta potential were obtained by dynamic light scattering
 131 (DLS) (Nanotracs Wave, Model MN401, Microtract, FL, USA). The IR spectra were
 132 acquired on a PerkinElmer System 2000 spectrometer with an ATR platform (Pike
 133 Technologies ATR-FTIR) from 4400 to 570 cm^{-1} and 700-30 cm^{-1} . The nanoconjugate
 134 was measured by UV-Vis spectroscopy, monitoring the shift in the surface plasmon band
 135 with a Perkin-Elmer Lambda-Bio spectrometer. Raman spectra were acquired on a
 136 MicroRaman (JOBIN-Yvon-Horiba, LABRAM-HR800) spectrometer with optical
 137 microscope (OLYMPUS BX 41) and He-Ne Laser (632.8 nm) as excitation source.

138 Detail methods to evaluate the radiochemical purity by size-exclusion chromatography
 139 and ultrafiltration have been shown elsewhere [17,19].

140 6. Biochemical characterization

141 6.1 Cell cultures

142 The permanent human umbilical vein cell line (EA.hy926) was purchased from Gibco-
143 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and cultured (37°C, 5% CO₂) in F12 medium
144 200 (Gibco-Life Technologies). The C6 rat glioma cell line were obtained from
145 American Type Culture Collection (Atlanta, GA, USA) and cultured (37°C, 5% CO₂) in
146 Roswell Park Memorial Institute Medium (Sigma-Aldrich Co.). In both cases fetal bovine
147 serum (10%), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100µg/mL) were used

148 6.2 Human serum stability

149 Radiolabeled NP (¹⁷⁷Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer, 200 µL) were diluted in fresh human
150 serum and incubated at 37°C. The stability was determined by UV-Vis analysis to
151 monitor the NP surface plasmon at 60 min and 24 h after dilution. Radiochemical
152 stability was determined by taking samples at 60 min and 24 h for ultrafiltration and size-
153 exclusion evaluation (PD-10 column) as reported elsewhere [17,19].

154 6.3 *In vitro* affinity

155 The method to evaluate the ¹⁷⁷Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer affinity to $\alpha(v)\beta(3)$ integrins
156 was carried out using the by solid-phase binding assay as previously reported [17]. The
157 IC₅₀ value of the ¹⁷⁷Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer peptide was determined by nonlinear
158 regression analysis (n=5) [17].

159 6.4 *In vitro* angiogenesis assay

160 An endothelial cell tube formation assay was performed using the ECMatrix™ kit (BD
161 Biosciences, Bedford, MA, USA). Briefly, EA.hy926 cells (10,000 cells) were seeded
162 onto polymerized ECMatrix and incubated at 37°C, 5% CO₂. Cells were cultured with
163 (CTL+) or without (CTL-) endothelial growth factor (ECGF, Sigma, Aldrich, USA,
164 20µg/mL) in fetal bovine serum (FBS) and treated with DOTA-GGC-NP (10 µL,
165 1 x 10⁹ nanoparticles), DOTA-GGC-NP-NLS-RGD (10 µL, 1 x 10⁷ nanoparticles),
166 DOTA-GGC-NP-Aptamer (10µL, 1 x 10⁷ nanoparticles) and DOTA-GGC-NP-NLS-
167 RGD-Aptamer (10 µL, 1 x 10⁷ nanoparticles). After 18 h, tube formation was analyzed
168 under an inverted light microscope (Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan) at 40X
169 magnification. The semi-quantitative measurement of the angiogenic potential was

170 calculated by direct visual analysis of at least six microscopic fields for each
171 experimental condition allowed the assignation of a numerical value to angiogenic
172 potential that reflects the degree of remodeling by using the formula proposed by Aranda
173 and Owen [18]. This also allowed the establishment of statistical differences in
174 angiogenic potential between two conditions or compounds.

175 6.5 Internalization assay

176 C6 cells (1×10^6 cells/tube) were incubated (0.5 mL) with 1 kBq (1×10^7 nanoparticles)
177 of the following treatments: a) $^{177}\text{Lu-NP}$, b) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD}$, c) $^{177}\text{Lu-NP-Aptamer}$
178 and d) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer}$, in triplicate at 37°C for 2 h. The detailed method
179 has been shown elsewhere [16,17]. Differences between the *in vitro* cell data of ^{177}Lu -
180 NP-NLS-RGD-Aptamer and each treatment were evaluated with Student's t-test
181 (grouped analysis, significance was defined as $p < 0.05$).

182 6.6 Fluorescence microscopy images

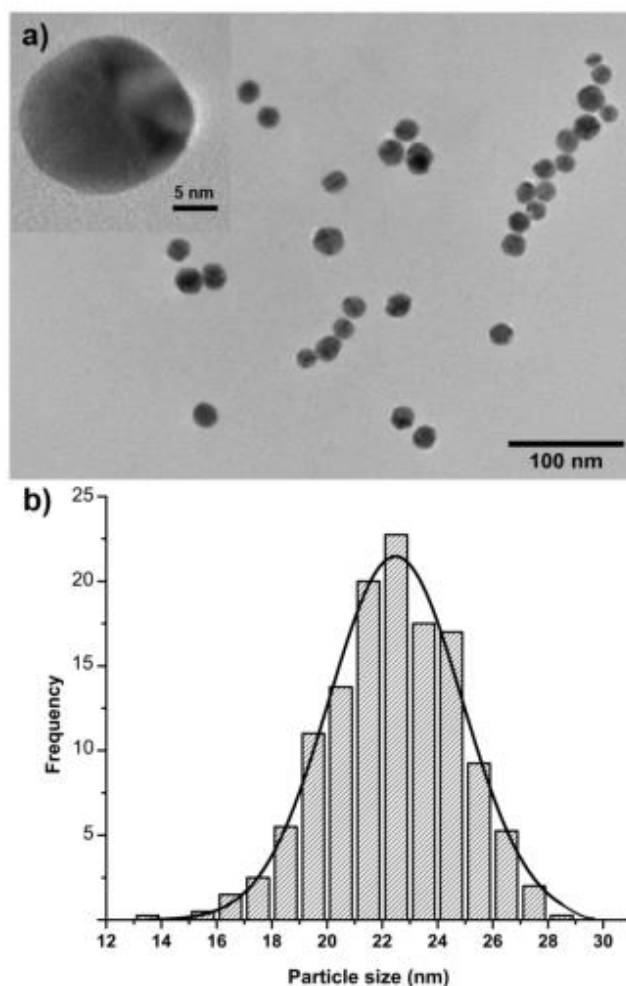
183 C6 cells (0.2 mL) were incubated with the followings treatments (5×10^4 cells): a) ^{177}Lu -
184 NP b) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD}$, $^{177}\text{Lu-NP-Aptamer}$ and d) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer}$
185 and. In all cases 1 kBq with 1×10^7 nanoparticles was used. The detailed procedures of
186 staining of the nuclei with Hoechst dye (blue) and the acquisition of images of fluorescent
187 NPs internalized in the C6 cells have been shown elsewhere [21].

188 **Results and discussion**

189 *TEM images, hydrodynamic particle size and Z potential*

190 Images of DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer (NP-nanosystem) are shown in figure 2.
191 The a "halo" around the NPs was observed as consequence of the poor interaction of the
192 electron beam with the NLS-RGD and aptamer molecules (low electron density). The
193 average particle hydrodynamic diameter of the NP-nanosystem determined by DLS was
194 29.99 ± 1.90 nm, which was higher than that of NP (24.70 ± 0.07 nm). The increase in
195 the diameter also indicated the conjugation of the aptamer and NLS-RGD to the NP

196 surface (Fig. 2) [19]. The Z potential for the NP and NP-nanosystem was -59 ± 2.7 mV
 197 and -74 ± 4.8 mV respectively, showing an increase in the colloidal stability.



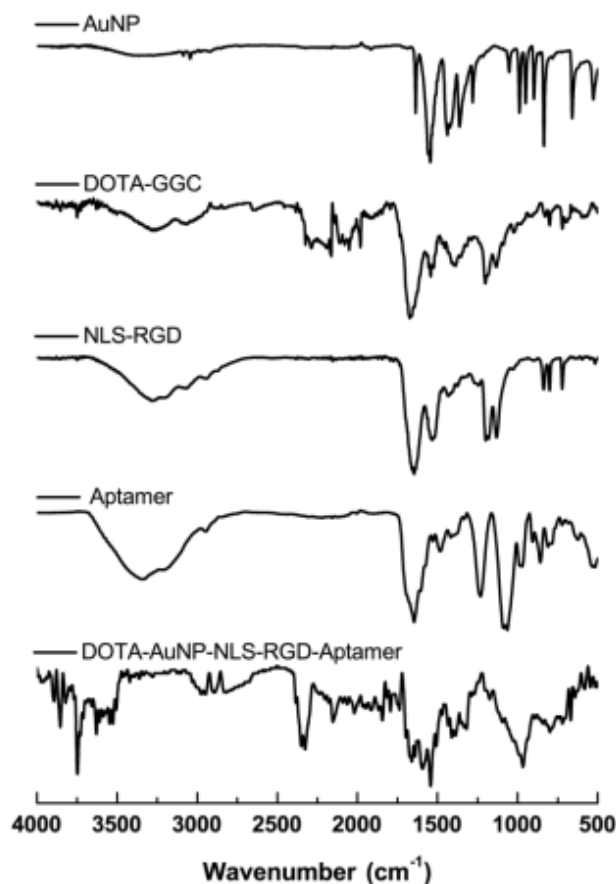
198

199 **Fig. 2** a) Transmission electron microscopy (TEM) images and b) size distribution
 200 determined by dynamic light scattering (DLS) of the DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-
 201 Aptamer nanosystem.

202 *Infrared and Raman Spectroscopy*

203 The MIR spectrum of the NP-nanosystem is given in figure 3. The spectrum is highly
 204 structured with fine bands not observed in the spectra of aptamer, NLS-RGD, DOTA-
 205 GGC nor the gold nanoparticles prior to their interaction (Fig. 3). Of interest are the
 206 multiple bands observed in the NP-nanosystem spectrum in the region from 2350 to 1700
 207 cm^{-1} assigned to $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$, $\text{R}_2\text{-NH}_2^+$, $\text{R}_3\text{-NH}^+$, R-C=NH^+ , protonated amidines ($\text{R}_2\text{-N}$

208 C=N(-N)-R2) from the arginine, guanine and adenine, as well as vibrations in the regions
209 of amides I, II and III, [20]. The bands up to 3500 cm^{-1} are assigned to the unassociated –
210 OH from the tyrosine and asparagine of the NLS-RGD and the carboxylic acid from
211 DOTA-GGC (Fig. 3). The asymmetric vibrations (1234 cm^{-1}) in the phosphates -O-P(O)-
212 O- bridged to the terminal pentyl mercaptan ((CH_2)₅-SH) and to the riboside (both
213 through -CH₂-) observed in the aptamer spectrum disappear in the NP-nanosystem
214 spectrum, which indicate that the aptamer is bonded to NP through the HS-pentyl moiety.
215 In Raman spectra, the bands with good intensity confirmed the assignments in MIR. A
216 detail analysis of the Raman, MIR and FIR spectra as evidence of the NP
217 functionalization with the aptamer and the NLS-RGD peptide are included in the
218 Supplementary information section.

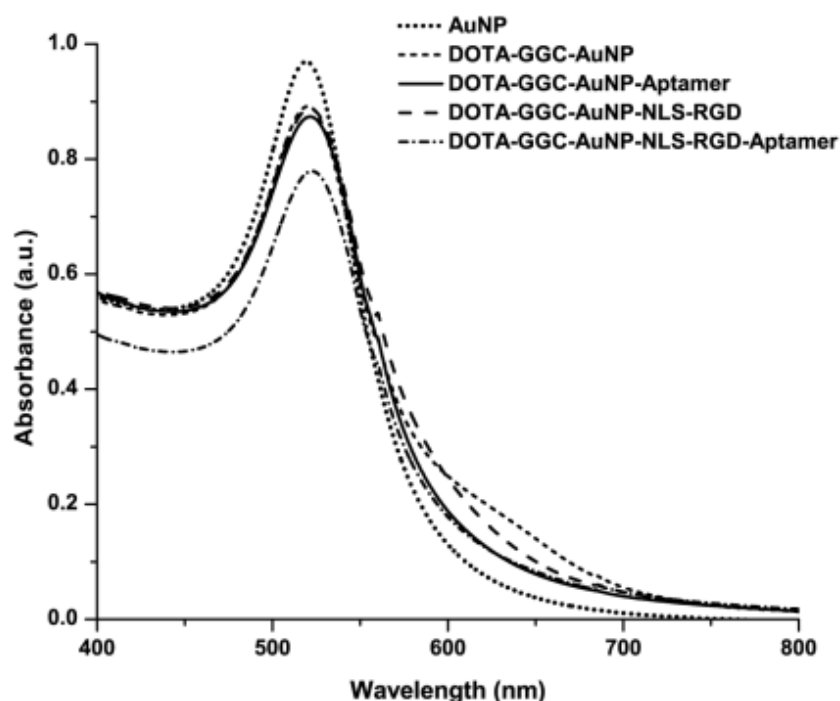


219

220 **Fig. 3** MIR-Infrared spectra of NP, DOTA-GGC, NLS-RGD, Aptamer and DOTA-GGC-
221 NP-NLS-RGD-Aptamer nanosystems.

222 *UV-Vis Spectroscopy*

223 The NP spectrum showed a characteristic surface plasmon resonance at 519.2 nm. A red-
224 shift to 519.5, 519.8, 521.3 and 522.3 nm was observed in the DOTA-NP, DOTA-GGC-
225 NP-Aptamer, DOTA-GGC-NP-NLS-RGD, DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer
226 spectra, respectively (Fig. 4). A decrease can be noticed in the intensity of the surface
227 plasmon resonance peak of the NP conjugates due to changes in the refraction index and
228 dielectric medium because of the interaction between the GGC, NLS-RGD and the NP
229 surface [21].



230

231 **Fig. 4** UV-Vis spectra of the NP, DOTA-GGC-NP, DOTA-GGC-NP-NLS-RGD and
232 DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer nanosystems.

233 *Radiochemical purity*

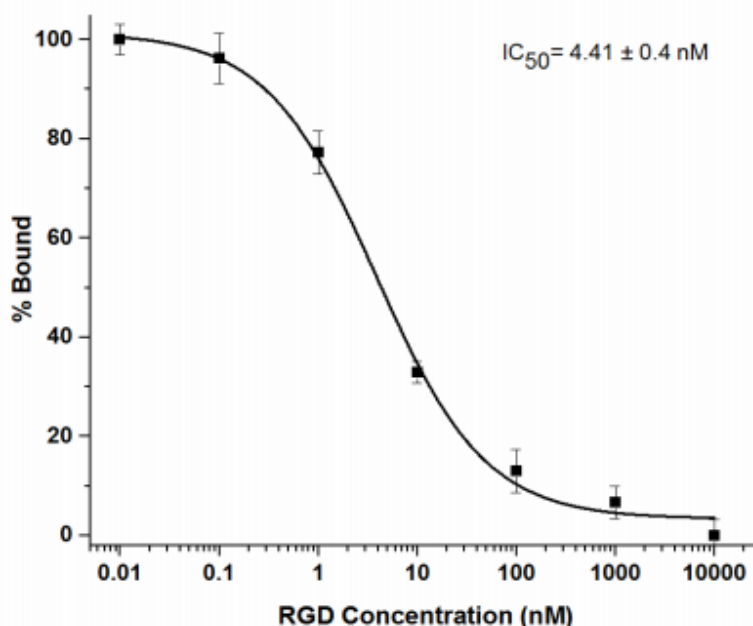
234 Radiochemical purity of the ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer nanoradiopharmaceutical
235 determined by ultracentrifugation and PD10 size-exclusion chromatography was
236 $99 \pm 1\%$.

237 *Human serum stability*

238 ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer was stable in human serum for 24 h, since at this time
239 the radiochemical purity continues as high as $99 \pm 1\%$. The 522.3 nm surface plasmon
240 resonance characteristic of NP, remained stable but slightly shifted to shorter energy
241 (521.9 nm) as consequence of the protein interactions [16].

242 *Solid-phase $\alpha(v)\beta(3)$ binding assay: in vitro affinity*

243 The *in vitro* competitive binding assay of the colloidal system ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-
244 Aptamer to determine the $\alpha(v)\beta(3)$ affinity showed that the concentration of the RGD
245 peptide to displace 50% of the ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer from the receptor was
246 $4.41 \text{ nM} \pm 0.4 \text{ nM}$ (IC_{50}) (Fig. 5). The ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer affinity is
247 congruent with similar affinity results reported for colloidal systems based on NP-RGD
248 and radiolabeled with ^{177}Lu [17].



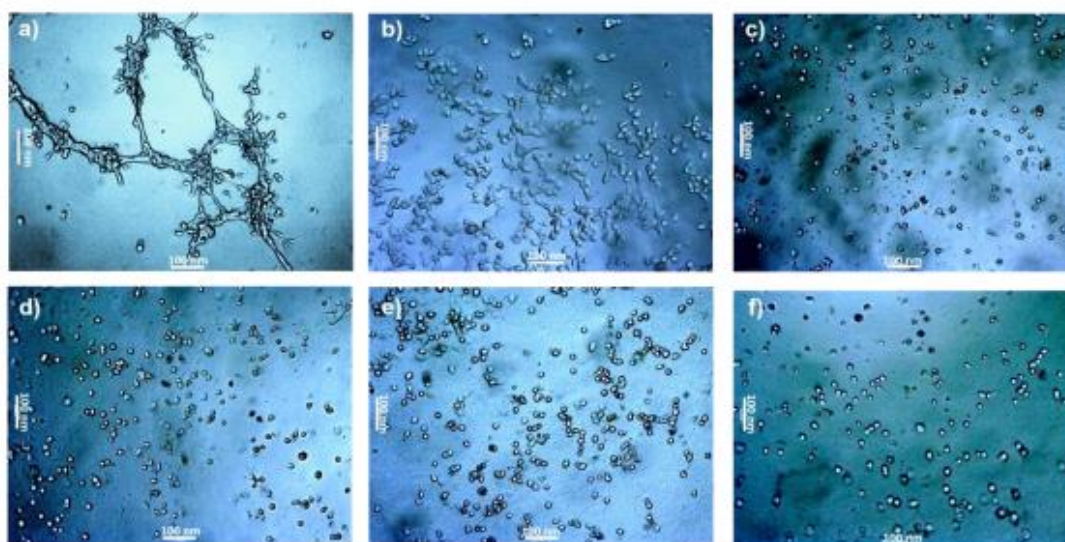
249

250 **Fig. 5** Competition assay of ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer for specific binding to the
251 $\alpha(v)\beta(3)$ integrin.

252 *Endothelial cell tube formation assay*

253 As shown in figure 6, cells cultured in Matrigel with proangiogenic factors (FBS and
254 ECGF) effectively induced flattening and cell migration (positive control, Fig. 6a), where
255 cells reorganized and formed tubes and complex-multicellular polygonal structures,
256 which are from two to three cells thick. Cells over Matrigel without any kind of
257 proangiogenic factors (negative control, Fig. 6d) remained adhered to the matrix and
258 maintained a rounded shape.

259 Each of the nanosystem components (DOTA-GGC-NP (Fig. 6b); DOTA-GGC-NPs-
260 NLS-RGD (Fig. 6c); or DOTA-GGC-NP-Aptamer (Fig. 6e)) regulated in a negative
261 manner and with different intensity the key steps of the angiogenic process (adhesion,
262 protrusion, cell-cell contact or cell migration). EA.hy926 cells cultured over Matrigel and
263 stimulated with FBS and ECGF were quickly adhered and formed projections increasing
264 cell-cell contact to migrate until forming polygonal structures that gain complexity over
265 time (Fig. 6a).



266

267 **Fig. 6** Endothelial cell tube formation assay a) without any additional treatment (positive
268 control), and treated with b) DOTA-GGC-NP, c) DOTA-GGC-NP-NLS-RGD, e) DOTA-
269 GGC-NP-Aptamer or f) DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer; d) without proangiogenic
270 factors (negative control).

271 The treatment with DOTA-GGC-NP precludes migration and reorganization of the cells,
272 stopping the tube formation progress (Fig. 6b); furthermore, cells appear in close
273 proximity and firmly adhere to the matrix, but polygonal structures were not formed. It
274 has been reported that gold nanoparticles have antiangiogenic properties because they
275 selectively interact with cell mitogens and mediators of angiogenesis, particularly
276 blocking the VEGF165/VEGFR2 interaction [22]. The observed cell adhesion is likely to
277 be triggered and maintained by the signaling transduction mediated by cell adhesion
278 molecules such as integrins and its transactivation via the other growth factors present in
279 the FBS such as EGF, which is not affected by NPs.

280 Exposure of cells to gold nanoparticles conjugated with the NLS-RGD peptide
281 significantly reduced cell adhesion properties and abolished the ability of endothelial
282 cells to form tubes even in the presence of proangiogenic stimulation (Fig. 6c). Cells
283 exposed to DOTA-GGC-NP-NLS-RGD acquired a rounded shape and some of them
284 made contact, forming groups of maximum four cells (Fig. 6c). This response is certainly
285 due to the known blocking that RGD exerts on $\alpha(v)\beta(3)$ integrin [7]. It is well known that
286 this integrin plays key roles in cell-cell and cell-ECM interaction, this explains the lack
287 of cell adhesion and the reduced intercellular contact. Some authors have validated that
288 organelle-specific damage can be amplified by targeting molecules to the nucleus, and
289 Kang et al. [23] have demonstrated that the DNA damage, cell division arrest and
290 apoptosis produced by NPs could be increased by modifying NPs with the NLS sequence.

291 The conjugation to DOTA-GGC-NP of the RNA aptamer directed against VEGF slightly
292 increased the antiangiogenic effect produced by the nanoparticles (Fig. 6e). Cells treated
293 with DOTA-GGC-NP-Aptamer remained firmly attached to the matrix and
294 approximately one-third of the population sprouted and maintained their ability to
295 associate and form branched clusters without achieving complete formation of polygonal
296 structures (Fig. 6e). The maintenance of cell adhesion and chemotaxis properties are due
297 to the angiogenic signaling mediated by other growth factors, cytokines, chemokines and
298 hormones present in the FBS.

299 The DOTA-GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer nanosystem here reported, inhibits tube
300 formation (Fig. 6f). In these culture conditions, the loss of cell adhesion, migration and
301 protrusion was observed and very few cells could maintain contact with others.

302 Semi-quantitative measurement of the angiogenic potential (AP) of the tested
303 compounds, in terms of their kinetics to bring about EA.hy926 cell line remodeling into
304 tube structures, evidenced that a greater AP was reached by the DOTA-GGC-NP-NLS-
305 RGD-Aptamer nanosystem with a score of 0.33 ± 0.05 , which is significantly lower than
306 that of the 2.04 ± 0.19 score obtained for the positive control, in which the maximum
307 reorganization was observed, obtaining the formation of a complex mesh. DOTA-GGC-
308 NP and DOTA-GGC-NP-Aptamer reduced the AP score to 0.99 ± 0.10 and 0.78 ± 0.06 ,
309 respectively, while in DOTA-GGC-NP-NLS-RGD, the AP was 0.54 ± 0.08 . In this study,
310 the synergic antiangiogenic properties of a nanosystem able to simultaneously target
311 VEGF and integrins with a remarkable ability to inhibit signals through VEGFR and
312 interfering with its transactivation via integrins, was demonstrated.

313 *Internalization assay*

314 As shown in table 1, the molecules $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD}$, $^{177}\text{Lu-NP-Aptamer}$ and $^{177}\text{Lu-}$
315 $\text{NP-NLS-RGD-Aptamer}$ have greater uptake and internalization than that of the
316 unspecific molecule $^{177}\text{Lu-NP}$ ($p < 0.05$). Furthermore, the colloidal $^{177}\text{Lu-NP-NLS-}$
317 RGD-Aptamer system shows the largest uptake and internalization. The $^{177}\text{Lu-NP}$ non-
318 specific accumulation in C6 glioblastoma cells is related to the NP passive uptake
319 mechanism [24]. However, with the conjugation to NPs of NLS-RGD and aptamer, the
320 specific tumor cell internalization was significantly higher (Table 1). $^{177}\text{Lu-NP-NLS-}$
321 RGD-Aptamer internalized in cell nuclei also demonstrated a specific nuclear entry
322 (Fig. 7).

323

324 **Table 1** Percentage of uptake and internalization of the different ^{177}Lu -nanosystems in
 325 C6 glioma cells

Treatment	Uptake (%)	Internalization (%)
^{177}Lu -NP	8.13 ± 0.72	4.04 ± 0.74
^{177}Lu -NP-NLS-RGD	15.18 ± 0.28	8.57 ± 0.26
^{177}Lu -Aptamer	14.72 ± 0.47	10.43 ± 0.06
^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer*	20.64 ± 0.18*	17.31 ± 0.96*

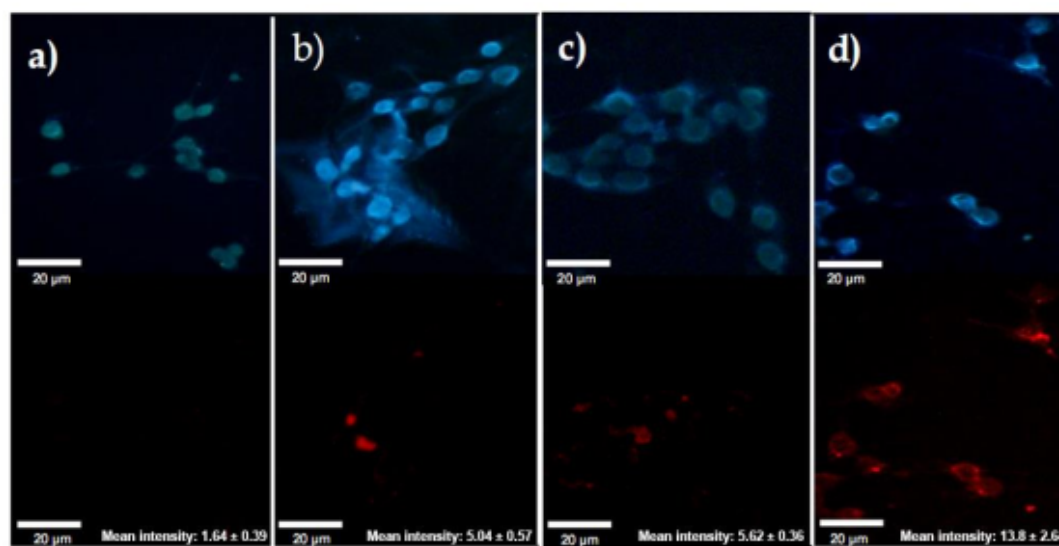
326 * Significant statistical difference ($p < 0.05$) between ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer and each treatment

327 Since the C6 cell line overexpress $\alpha(v)\beta(3)$ integrin, the uptake and internalization of
 328 NLS-RGD molecules was that expected. This is in agreement with previous works in
 329 which the affinity of RGD to the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and NLS internalization properties
 330 have been reported [8].

331 At the first glance, it is difficult to understand the aptamer uptake and internalization
 332 effect, because the aptamer molecule is negatively-charged and typically, the cell
 333 membrane has negative charge characteristics. Different endocytic pathways taken by
 334 aptamer-NPs have been reported [25]. Aptamer-NPs colloidal systems, however, exhibit
 335 good cell uptake properties. Furthermore, the cell uptake and internalization of NP-
 336 aptamer has been reported to be higher than that of NPs [26]. The internalization
 337 mechanisms and intracellular trafficking of nanoparticles require further studies,
 338 especially regarding the difference between targeted and non-targeted nanoparticles.

339 *Fluorescence microscopy images*

340 As shown in figure 7, ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer emits the highest fluorescence,
 341 which indicates a higher NP internalization in C6 cells due to the NLS-RGD and aptamer
 342 interactions with the membrane cell. This agrees with the result of the uptake and
 343 internalization described above (Table 1). Hoechst dye inside the nuclei was visualized
 344 with an excitation filter of 330–385 nm and an emission filter of 420 nm, and the NPs
 345 were detected by using an excitation filter of 530–550 and an emission filter of 590 nm.



346

347 **Fig. 7** Fluorescent images of a) $^{177}\text{Lu-NP}$, b) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD}$, c) $^{177}\text{Lu-NP-Aptamer}$
 348 and d) $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer}$ internalized in C6 cells. Observe the Hoechst dye
 349 (blue) inside the nuclei of cells (excitation filter of 330-385 nm, emission filter of 420
 350 nm) and the fluorescence of NPs (red) detected in the nuclei of the same cells (excitation
 351 filter of 530-550 nm emission filter of 590 nm).

352 The fluorescence present in the colloidal systems $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD}$, $^{177}\text{Lu-NP-}$
 353 Aptamer and $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer}$, once internalized in C6 cell, can be
 354 attributed to the aggregation-induced emission phenomenon [27]. $^{177}\text{Lu-NP-conjugates}$
 355 may undergo an aggregation phenomenon that modifies their physical properties and
 356 enhances the fluorescence present in NPs colloidal systems. $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-}$
 357 Aptamer showed larger mean intensity that the rest of the treatments (Fig. 7), which is
 358 correlated with a strong fluorescence phenomenon present inside the cells.

359 **Conclusions**

360 TEM, DLS and spectroscopy techniques demonstrated that NPs can be successfully
 361 conjugated to NLS-RGD and HS-pentyl-pegaptanib (aptamer) through interactions with
 362 the thiol groups of cysteine. $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptamer}$, with a radiochemical purity
 363 >98%, is highly stable in human serum and shows specific recognition for $\alpha(v)\beta(3)$
 364 integrin and VEGF (*in vitro* inhibition of vascular-tube formation). The cancer-specific
 365 $^{177}\text{Lu-Au-nanoradiopharmaceutical}$ shows suitable properties as a specific antiangiogenic

366 agent by targeting both the VEGF pathway and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin. The results obtained in
367 this study warrant further preclinical studies to determine the *in vivo* specificity and the
368 radiotherapeutic and antiangiogenic properties of the ^{177}Lu -NP-NLS-RGD-Aptamer
369 radiopharmaceutical.

370 Acknowledgements

371 This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology
372 (CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443). This research was carried out as part of the
373 activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos,
374 CONACyT”.

375 References

- 376 1. Yook S, Cai Z, Lu Y, Winnik MA, Pignol J, Reilly RM (2015) Radiation
377 nanomedicine for EGFR-positive breast cancer: panitumumab-modified gold
378 nanoparticles complexed to the β -particle-emitter, (^{177}Lu). *Mol Pharm.* 12: 3963-
379 3972
- 380 2. Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, Santos-Cuevas CL, De Maria Ramirez F,
381 Azorin-Vega EP, Meléndez-Alafort L (2015) Theranostic radiopharmaceuticals based
382 on gold nanoparticles labeled with ^{177}Lu and conjugated to peptides. *Curr*
383 *Radiopharm.* 8:150-159
- 384 3. Banerjee S, Pillai M, Knapp, F (2015) Lutetium-177 therapeutic
385 radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications.
386 *Chem Rev.* 115: 2934-2974
- 387 4. Lopes-Bastos BM, Jiang WG, Cai J (2016) Tumour-endothelial cell communications:
388 important and indispensable mediators of tumour angiogenesis. *Anticancer Res.*
389 36:1119-1126
- 390 5. Frezzetti D, Gallo M, Roma C, D'Alessio A, Maiello MR, Bevilacqua S, Normanno
391 N, De Luca A (2016) Vascular endothelial growth factor regulates the secretion of
392 different angiogenic factors in lung cancer cells. *J Cell Physiol.* 231:1514-1521

- 393 6. Lin Z, Zhang Q, Luo W (2016) Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in
394 cancer: Challenges and future directions. *Eur J Pharmacol.* 793:76-81
- 395 7. Hoffmann S, He S, Jin M, Ehren M, Wiedemann P, Ryan SJ, Hinton DR (2005) A
396 selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$
397 and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion. *BMC*
398 *Ophthalmol.* 5:16
- 399 8. Ellert-Miklaszewska A, Poleszak K, Kaminska B (2017) Short peptides interfering
400 with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. *Future Med*
401 *Chem.* 9:199-221
- 402 9. Ocampo-García BE, Santos-Cuevas CL, De León-Rodríguez LM, García-Becerra R,
403 Ordaz-Rosado D, Luna-Gutiérrez MA, Jiménez-Mancilla NP, Romero-Piña ME,
404 Ferro-Flores G (2013) Design and biological evaluation of $^{99m}\text{Tc-N} 2 \text{ S} 2\text{-Tat} (49\text{--}$
405 $57)\text{-c} (\text{RGDyK})$: A hybrid radiopharmaceutical for tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$
406 integrins. *Nucl Med Biol.* 40:481-487
- 407 10. Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF, Kong L, Li Y, Pu C,
408 Duan W (2015) Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: the
409 next generation of cancer medicine. *Theranostics.* 5:23
- 410 11. Zhou G, Wilson G, Hebbard L, Duan W, Liddle C, George J, Qiao L (2016)
411 Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy. *Oncotarget.* 7:13446
- 412 12. Davis GE, Senger DR (2005) Endothelial Extracellular Matrix, Biosynthesis,
413 Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel
414 Stabilization. *Circulation Research.* 97:1093-1107
- 415 13. Shallal HM, Minn I, Banerjee SR, Lisok A, Mease RC, Pomper MG (2014)
416 Heterobivalent agents targeting PSMA and integrin- $\alpha v \beta 3$. *Bioconjugate Chem.*
417 25:393-405
- 418 14. Zhang J, Niu G, Lang L, Li F, Fan X, Yan X, Yao S, Yan W, Huo L, Chen L (2017)
419 Clinical translation of a dual integrin $\alpha v \beta 3$ -and gastrin-releasing peptide receptor-
420 targeting PET radiotracer, ^{68}Ga -BBN-RGD. *J Nucl Med.* 58:228-234
- 421 15. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Eisenhut M, Kopka K (2014)
422 Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both

- 423 PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The*
424 *Prostate*. 74:659-668
- 425 16. Morales-Avila E, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, De León-Rodríguez LM,
426 Santos-Cuevas CL, García-Becerra R, Medina LA, Gómez-Oliván L (2011)
427 Multimeric system of ^{99m}Tc -labeled gold nanoparticles conjugated to c[RGDfK(C)]
428 for molecular imaging of tumor α (v) β (3) expression. *Bioconjugate Chem*. 22:913-
429 922
- 430 17. Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, Santos-Cuevas CL, Jiménez-
431 Mancilla N, León-Rodríguez D, Azorin-Vega E, Isaac-Olivé K (2013) A therapeutic
432 system of ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles-RGD internalized in breast cancer cells. *J*
433 *Mex Chem Soc*. 57:212-219
- 434 18. Aranda E, Owen GI (2009) A semi-quantitative assay to screen for angiogenic
435 compounds and compounds with angiogenic potential using the EA. hy926
436 endothelial cell line. *Biol Res*. 42:377-389
- 437 19. Vilchis-Juárez A, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Morales-Avila E, Ocampo-
438 García BE, Díaz-Nieto L, Luna-Gutiérrez M, Jiménez-Mancilla N, Pedraza-López M,
439 Gómez-Oliván L (2014) Molecular targeting radiotherapy with cyclo-RGDfK (C)
440 peptides conjugated to ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *J*
441 *Biomed Nanotechnol*. 10:393-404
- 442 20. Socrates G (2004) Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and
443 charts, John Wiley & Sons
- 444 21. Jiménez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Ocampo-García B, Luna-
445 Gutiérrez M, Azorin-Vega E, Isaac-Olivé K, Camacho-López M, Torres-García E.
446 (2013) Multifunctional targeted therapy system based on $^{99m}\text{Tc}/^{177}\text{Lu}$ -labeled gold
447 nanoparticles-Tat (49–57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer
448 cells. *J Labelled Compd Radiopharm*. 56: 663-671
- 449 22. Pan Y, Ding H, Qin L, Zhao X, Cai J, Du B (2013) Gold nanoparticles induce
450 nanostructural reorganization of VEGFR2 to repress angiogenesis. *J Biomed*
451 *Nanotechnol*. 9:1746-1756

- 452 23. Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA (2010) Nuclear targeting of gold nanoparticles
453 in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am*
454 *Chem Soc.* 132:1517-1519
- 455 24. Dykman LA, Khlebtsov NG (2013) Uptake of engineered gold nanoparticles into
456 mammalian cells. *Chem Rev.* 114:1258-1288
- 457 25. Zhang J, Liu B, Liu H, Zhang X, Tan W (2013) Aptamer-conjugated gold
458 nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine.* 8:983-993
- 459 26. Yeom JH, Joo M, Lee B, Kim KP, Ha NC, Park Y, Bae J, Lee K (2017) Intracellular
460 delivery of recombinant proteins via gold nanoparticle-DNA aptamer composites is
461 independent of the protein physicochemical properties and cell type. *J Ind Eng Chem.*
462 45:5-10
- 463 27. Goswami N, Yao Q, Luo Z, Li J, Chen T, Xie J (2016) Luminescent metal
464 nanoclusters with aggregation-induced emission. *J Phys Chem Lett.* 7:962-975
- 465

466

Supplementary information

467 1. Synthesis of the NLS-RGD peptide

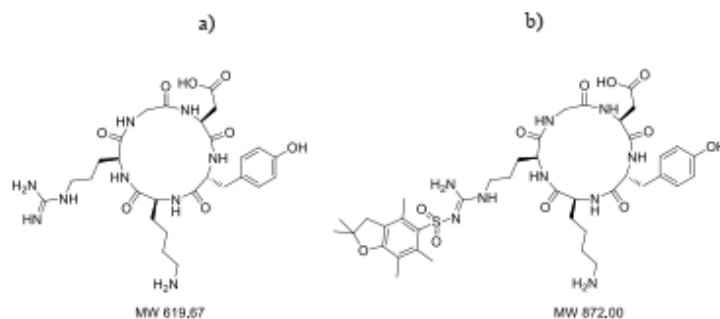
468 Mass spectra (MS) were measured on an Applied Biosystems Voyager-6115 [matrix-
469 assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF)] mass spectrometer in
470 positive linear mode using alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix. HPLC
471 purification was performed on a Agilent 1200 system using a semi-preparative Luna 10 μ
472 C18 300Å, 250 mm x 10 mm column from Phenomenex. Analytical HPLC were done in
473 a Luna 5 μ C18 300Å, 250 mm x 4.6 mm column. Compound elution was followed by
474 UV-Vis at 235 nm unless it is stated otherwise.

475 1.1 Synthesis of c(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys)-3-maleimidepropionylamide 476 (c(RGDyK)-3MP)

477 The synthesis of the linear peptide started with the incorporation of glycine onto o-
478 chlorotriyl chloride resin (Advanced ChemTech, with a 0.9 mmol/g load) at a 1.29 mmol
479 scale by mixing the resin with a solution of Fmoc-Gly-OH (975 mg, 2.5 equiv) and
480 DIPEA (492 μ L, 1.15 equiv) in dry dichloromethane (DCM) in a peptide synthesis
481 vessel. After shaking the reaction mixture for 2.5 h, reaction mixture was removed and
482 resin was washed with DMF and then DCM. The load of the resin was determined by
483 HPLC via quantification of Fmoc removed with piperidine from 4.1 mg of dry resin. The
484 load of the resin was 0.69 mmol (54%). 730 μ L of DIPEA in 4 mL of methanol were
485 added to the resin next to cap the unreacted sites of the resin. After 1 hour, the resin was
486 washed with DMF and then DCM. The Fmoc-protecting group was then removed (Fig 1.)
487 with a 20% solution of piperidine in DMF. Aminoacids were then attached by using
488 single-step couplings of 3.5 equiv. of Fmoc-amino acid, 3.4 equiv HBTU and HOBt, and
489 5 equiv DIPEA in DMF in the order Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-
490 Tyr-OH, and Fmoc-Asp(OtBu)-OH for 2 hours each. The linear RGDyK peptide was
491 cleaved from the resin without affecting other protecting groups by treating with 10 mL
492 of a mixture of acetic acid, 2,2,2-trifluoroethane (TFE), and DCM (1:1:3) for 1.7 h at

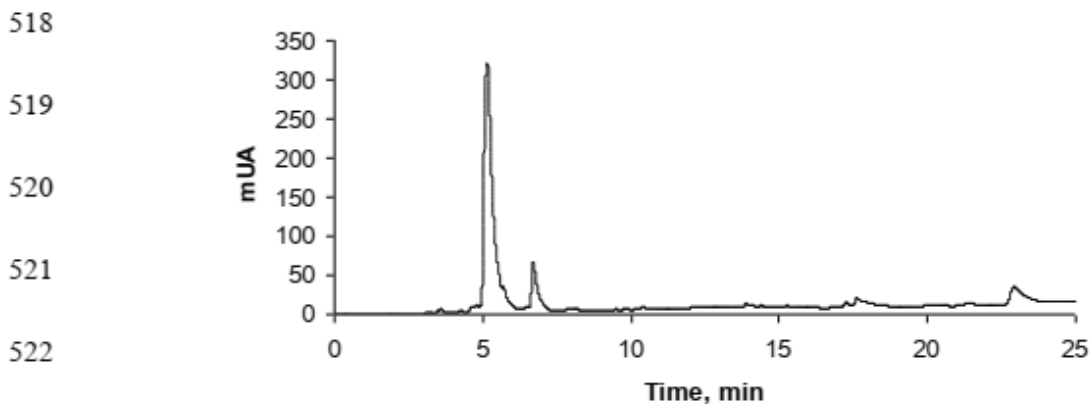
493 room temperature. The solution was filtered out and the resin was washed twice with 5
 494 mL of the same mixture and then with DCM three times. The filtrates were combined and
 495 concentrated. The excess acetic acid was removed by repeatedly adding hexanes to the
 496 residue and removing the mixture by rotary evaporation. The head-to-tail cyclization was
 497 performed by slowly adding a solution containing 612 mg of the linear peptide in 6.4 mL
 498 of DCM to a solution of 50% 1-propanephosphonic acid cyclic anhydride (T3P) in
 499 EtOAc (2.73 mL), DIPEA (2.3 mL), and DMAP (5 mg) in 250 mL of DCM.

500 After stirring overnight the reaction mixture was concentrated and purified by silica
 501 chromatography (methanol:ethyl acetate, 1:10 followed by methanol:ethyl acetate, 1:5).
 502 Fractions containing the product were collected and the solvent was removed by rotary
 503 evaporation. The residue was taken into DCM and washed with water. The organic phase
 504 was collected and the solvent removed. The remaining protecting groups of the above
 505 cyclic peptide were removed by stirring the peptide for 2 hours with a mixture a 95%
 506 TFA and 5% water mixture. TFA excess was removed under a gentle flow of N₂. Cold
 507 ethylic ether was added to the residue giving a white precipitate. Ether was decanted and
 508 the solid washed 3x with fresh cold ether. Solid was dried giving 480 mg of a white solid.
 509 HPLC of the synthesized peptide (Fig. 1) with a gradient of water/acetonitrile containing
 510 0.1 and 0.08% of TFA respectively from 90/10 to 30/70 in 25 min at 1 mL/min gave two
 511 peaks with R_t = 5.2 and 6.7 min respectively (Fig. 2). The major peak corresponded to the
 512 fully deprotected c(RGDyK) peptide [m/z (MALDI+) m/z = 620.41 [M+H]⁺ (calcd.
 513 620.67)], and the minor peak corresponded to the Pbf protected peptide [m/z (MALDI+)
 514 m/z = 872.53 [M+H]⁺ (calcd. 873.00)](Fig. 3).

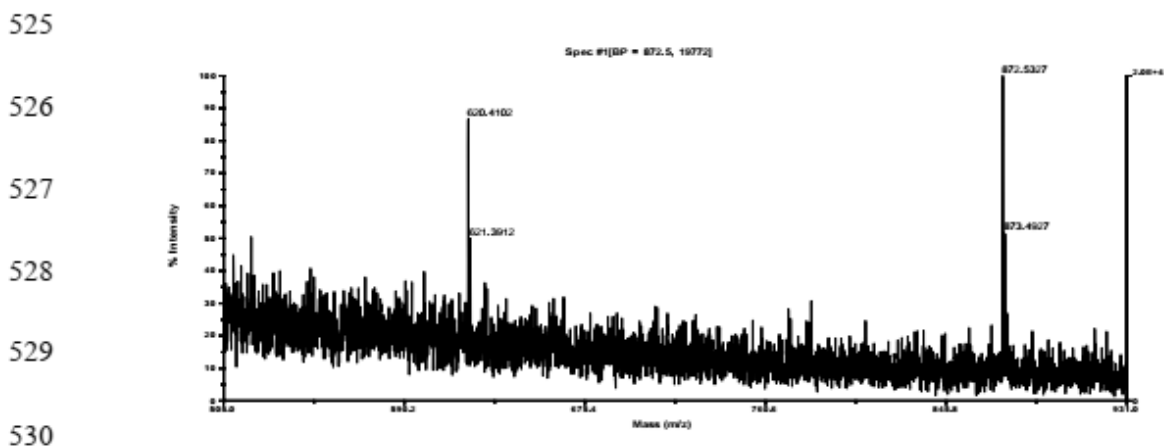


515

516 **Fig. 1** Schematic structure of a) deprotected c(RGDyK) peptide and b) protected
 517 c(RGDyK) peptide.



523 **Fig. 2.** Size-exclusion HPLC chromatogram, $R_t = 5.2$ for the deprotected c(RGDyK) and
524 $R_t = 6.7$ min for the protected c(RGDyK) peptide.

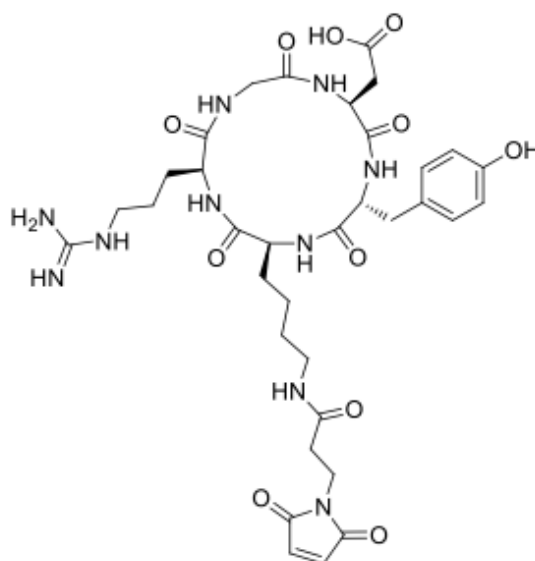


531 **Fig. 3** MALDI-TOF mass spectral of the deprotected c(RGDyK)-3MP peptide.

532 51.5 mg (0.95 equiv.) of 3-maleimidepropionic acid, 50.3 μ L of DIPEA (1 equiv.) and
533 115.5 mg HBTU were dissolved in 0.8 mL DMF. The mixture was stirred at room
534 temperature for 5 minutes with concomitant formation of a white precipitate. This
535 solution was added to another solution consisting of 270 mg (0.32 mmol) of the
536 ditrifluoroacetate salt of the c(RGDyK) peptide and 105 μ L DIPEA (2 equiv.) in 1 mL
537 DMF. The solution was stirred a room temperature and the precipitate observed above
538 dissappeared and the mixture turned into a yellowish transparent solution.

539 The reaction was completed after 5 minutes as assessed by HPLC analysis. Product was
540 purified via semi-preparative HPLC with a gradient of water/acetonitrile containing 0.1

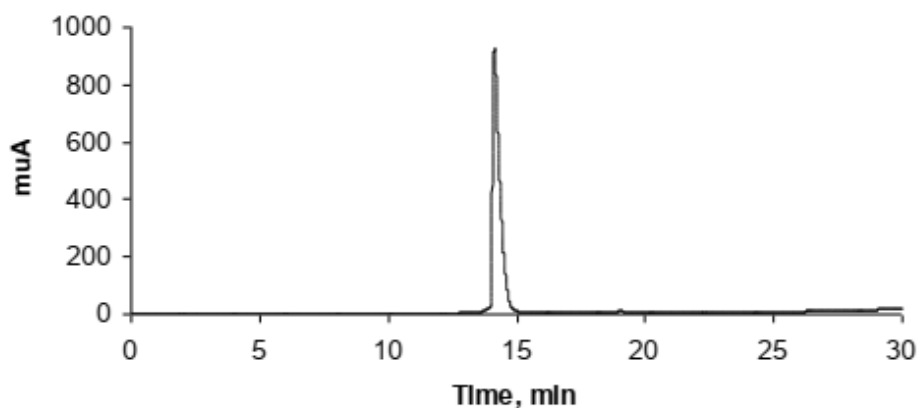
541 and 0.08% of TFA respectively from 90/10 to 30/70 in 30 min at a flow of 4.7 mL/min.
542 The (c(RGDyK)-3MP) peptide (Fig. 4) elutes with an $R_t = 14.1$ min in an analytical
543 HPLC (Fig. 5) column under a gradient of water/acetonitrile containing 0.1 and 0.08% of
544 TFA respectively from 95/5 to 10/90 in 30 min at a flow of 1 mL/min at room
545 temperature. m/z (MALDI+) $m/z = 771.54 [M+H]^+$ (calcd. 771.79) (Fig. 6).



546

547 **Fig. 4** General structure of the (c(RGDyK)-3MP) peptide.

548



549

550 **Fig. 5** Size-exclusion HPLC chromatogram of the (c(RGDyK) peptide with retention time
551 at $R_t = 14.1$ min.

552

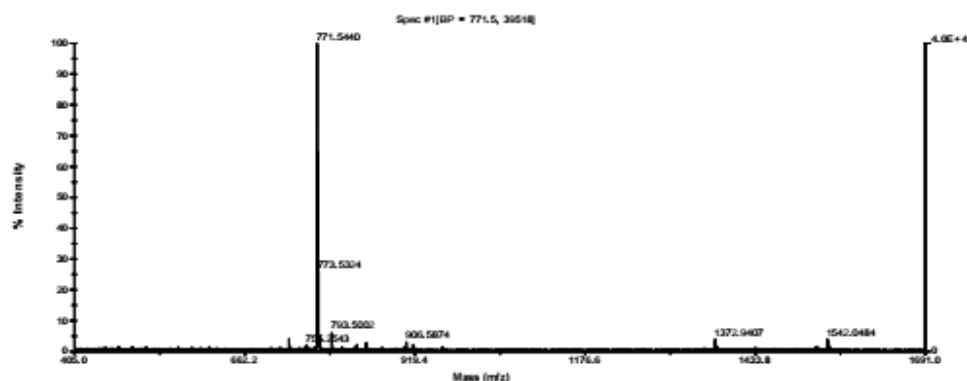
553

554

555

556

557



558

Fig. 6 MALDI-TOF mass spectral of the c(RGDyK) peptide

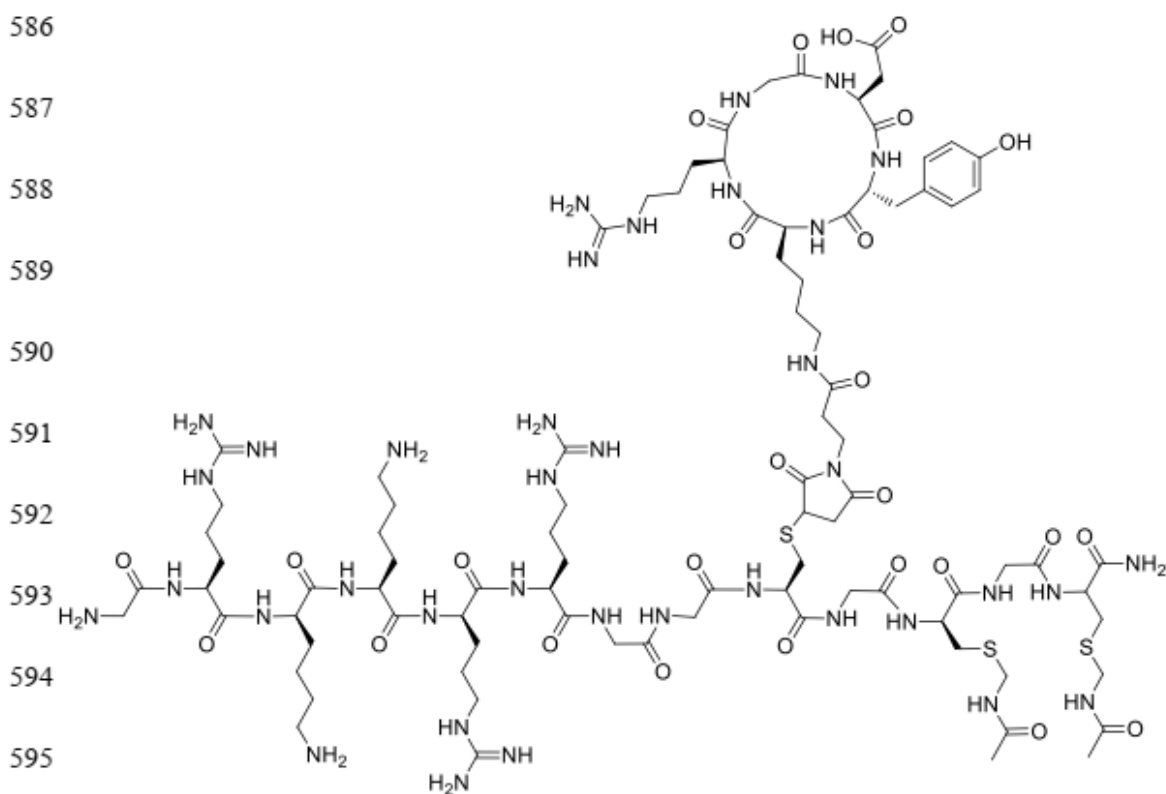
559 1.2 Synthesis of $\text{NH}_2\text{-Gly}^1\text{-Arg}^2\text{-Lys}^3\text{-Lys}^4\text{-Arg}^5\text{-Arg}^6\text{-Gly}^7\text{-Gly}^8\text{-Cys}^9\text{-Gly}^{10}\text{-}$
 560 $\text{Cys}^{11}(\text{Acm})\text{-Gly}^{12}\text{-Cys}^{13}(\text{Acm})\text{-CONH}_2$ (NLS-CGCGC)

561 The synthesis of the peptide started in one batch with the incorporation of Fmoc-
 562 Cys(Acm) into a NovaSynTGR resin (Novabiochem, with a 0.2 mmol/g load) at a 0.15
 563 mmol scale following standard Solid Phase Peptide Synthesis protocols (SPPS).
 564 Removal of the protecting groups and of the peptide from the resin was accomplished by
 565 stirring the resin in a mixture of TFA/trisopropylsilane/ H_2O (95/2.5/2.5) for 3 h (it is
 566 important not to use thiol containing scavengers since these remove the Acm protecting
 567 group). NLS-CGCGC elutes with $t_R = 12.1$ min in an analytical HPLC column under a
 568 gradient of water (0.1% TFA)/acetonitrile (0.08% TFA) from 95/5 to 10/90 in 30 min at a
 569 flow of 1 mL/min at room temperature. Peptides was purified giving 120 mg (54% yield,
 570 calculated based on salt free peptide MW) of NLS-CGCGC; m/z (MALDI+) $m/z =$
 571 1478.57 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. 1479.77).

572 1.3 Synthesis of $\text{NH}_2\text{-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-[C(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-}$
 573 $\text{Lys)-3-succinimidepropionylamide]}\text{-Gly-Cys(Acm)-Gly-Cys(Acm)-CONH}_2$ (NLS-
 574 RGD)

575 NLS-CGCGC peptide (120 mg, 0.055 mmol) was mixed with 34.4 mg (0.7 equiv.) of
 576 c(RGDyK)-3MP in 2.5 mL of 0.1 M degassed phosphate buffer pH 7.0 which contains 5

577 mM EDTA. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight and was
578 filtered through a PTFE 0.2 μm filter, purified by the semi-preparative HPLC isocratic
579 method from 0-6 min of water (0.1% TFA)/acetonitrile (0.08% TFA), 95/5, followed
580 with a gradient to reach 80/20 from 6 to 30 min. Fractions containing the product were
581 combined and freeze-dried, yielding 72 mg of a white solid. The peptide NLS-RGD (Fig.
582 7) elutes with a $t_{\text{R}}=13.6$ min (Fig. 8) in an analytical HPLC column under a gradient of
583 water (0.1% TFA)/acetonitrile (0.08% TFA) from 95/5 to 10/90 in 30 min at a flow rate
584 of 1 mL/min at room temperature. m/z (MALDI+) $m/z = 2248.18$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd.
585 2250.46) (Fig. 9).

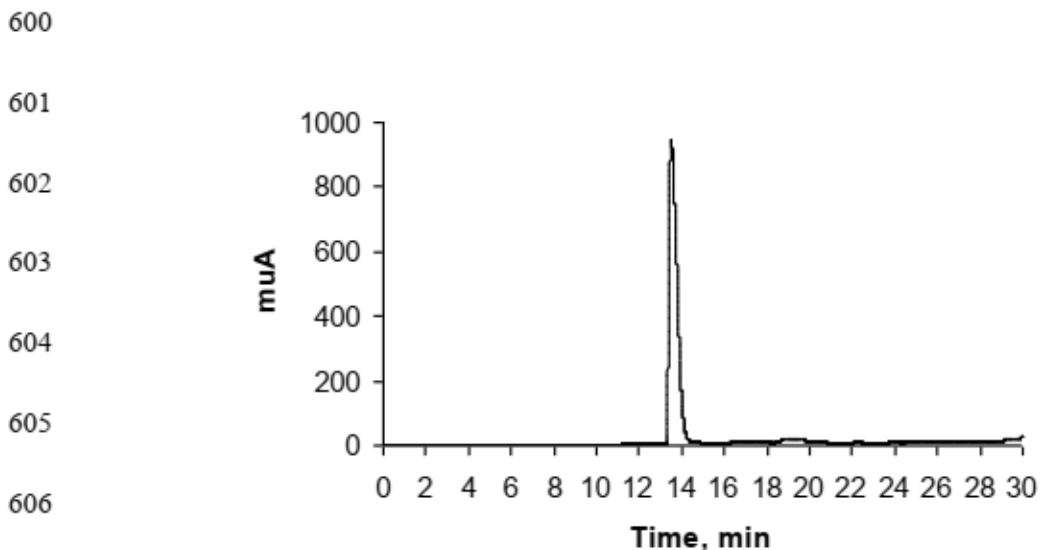


596

597 **Fig. 7** General structure of the peptide synthesized NLS-RGD.

598

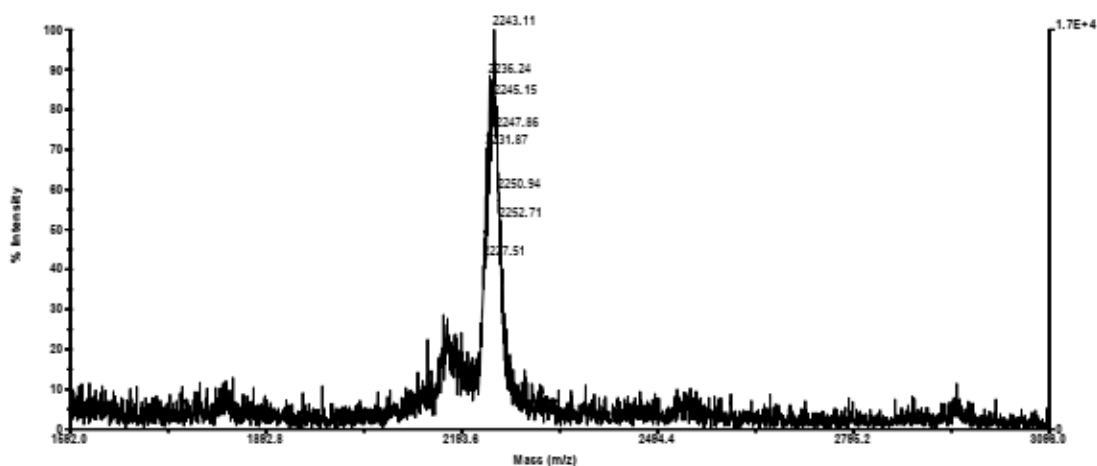
599



607 **Fig. 8** Size-exclusion HPLC chromatogram of the NLS-RGD peptide with retention time
608 at $t_R = 13.6$ min.

609

610



616

617 **Fig. 9** MALDI-TOF mass spectral of the synthesized peptide NLS-RGD.

618 2. Infrared spectroscopy

619 DOTA-NP-NLS-RGD-(Aptamer), the peptides, DOTA-GGC(DOTA) and NLS-RGD,
620 and the Aptamer with 28 RNA bases as well as 20 nm NP stabilized with PBS were

621 analyzed by MIR, FIR and RAMAN techniques as indicated in the experimental section.
622 MIR spectra were recorded from 4000 to 500 cm^{-1} , FIR spectra from 700 to 30 cm^{-1} and
623 RAMAN spectra from 230 to 2250 cm^{-1} . The NP and the NP conjugate system were
624 analyzed as lyophilized samples.

625 The MIR spectrum of the DOTA-NP-NLS-RGD-(Aptamer) conjugate system is given in
626 Fig. 10, the spectrum is highly structured with fine bands through the entire spectrum
627 which are not observed in the macromolecules nor the gold nanoparticles prior their
628 interaction. In the DOTA-GGC a medium broad structured bands are seen between 2374-
629 1800 cm^{-1} as result from the inter-, intra- hydrogen bonding promoted by the carboxylic
630 groups of the lyophilized DOTA-GGC with remaining water molecules in the compound.

631 The MIR spectrum of NP (Fig.10) reveals mainly the presence of three phosphates
632 species and those due to hydrogen bonding between them since the NP in solution was
633 stabilized with PBS. The MIR spectrum of NP reveals mainly the presence of three
634 phosphates species (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^1 [1,2] the stretching vibrations of PO_4^{3-} ions
635 are seen in the region from 1400 to 800 cm^{-1} and that at 659 and 527 to bending O-P-O
636 vibrations hydrogen bonded with water molecules (-P=O...HOH and(or (-O-
637 P(O)OH...OH₂)) are revealed up 1400 in particular those broad and intense bands at
638 1438 and 1545 cm^{-1} ; at 1637 cm^{-1} a sharp band is observed and corresponds to free
639 water in the solid sample. In fact, except the latter, the bands are blue or red shifted
640 because the interaction of the phosphate ions with the NP has to be stronger than the
641 sodium ions already present in the PBS solution of NP.

642 The MIR spectra of the peptides (Fig. 10) revealed the broad bands from stretching
643 vibrations (3500-3000 cm^{-1}) of Amide A (3450-3250 cm^{-1}) Amide B (3100-3000 cm^{-1})
644 and amines mainly since they are usually forming hydrogen bonding [3, 4]. Formally, the
645 RNA Aptamer is a polyanion (phosphates) neutralized with sodium ions also revealed a
646 broad band (3400-3100 cm^{-1}) since the bases form hydrogen bonds between cytosine and
647 guanine, between adenine and uracil and between guanine and uracil (Fig. 10) [5]. Those
648 broad band are not observed in the DOTA-NP-NLS-RGD-(Aptamer) conjugate spectrum,
649 apparently, the hydrogen bonding between the functional groups already mentioned is

650 broken by the new conformational arrangement of those molecules as result from the
651 formation of NP-S bonds with such molecules in the conjugate system. Each compound
652 was dissolved in water with a pH at 7 but the carboxylic groups of DOTA-GGC, sodium
653 ions which neutralized the polyanionic aptamer create the suitable medium for
654 transferring the proton/H-atom released by the reaction between the HS- from the DOTA-
655 GGC and Aptamer with NP in water to amines, imines and amidines of NLS-RGD and
656 the Aptamer, for this reason are observed multiple bands in the region from 2350 to 1700
657 cm^{-1} which are assigned to CH_2NH_3^+ , $\text{R}_2\text{-NH}_2^+$, $\text{R}_3\text{-NH}^+$, R-C=NH^+ , protonated amidines
658 ($\text{R}_2\text{-N-C=N(-N)-R}_2$ from the arginine, and the guanine and adenine from the nucleotides
659 as well as vibrations in the amides I, II and III regions [1, 6]. All those bands up 3500
660 cm^{-1} are assigned to the unassociated -OH from the tyrosine and of asparagine of the
661 NLS-RGD and carboxylic acid from DOTA-GGC. We may conclude that pronounced
662 anharmonicity, which gives unusual strength to combination bands, need not lead to very
663 broad bands; it can lead also to a great number of sharp bands which depends on the
664 frequencies of the vibrations combining with the NH^+ stretching vibrations but also on
665 the width of the individual bands [1,6].

666 The vibrations from amide I and II and III of the peptides at about 1650 cm^{-1} , 1540 and
667 $1480\text{-}1120 \text{ cm}^{-1}$, respectively, are semi-broad in the peptides spectra while in the NP-
668 conjugate system form part of the most intense structured band with a sharp band
669 centered at 1544 cm^{-1} from the NH vibrations of the amides II and a less intense semi-
670 broad at 1589 cm^{-1} from the carbonyl of the secondary amide (Amide II). The Aptamer
671 spectrum reveals the typical bands of nucleic acids ($1780\text{-}1530 \text{ cm}^{-1}$, $1550\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$,
672 $1250\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ and $1000\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ regions) but with particular characteristic for this
673 Aptamer with 28 RNA bases (Fig. 10). RNA aptamer spectrum presents a semibroad and
674 very intense band with a maximum at 1642 cm^{-1} ($1745\text{-}1510 \text{ cm}^{-1}$) due to the double
675 bond from the pyrimidine and purines bases (C=O and -C=N or -C=N in the cyclic
676 bases). From $1545\text{-}1312 \text{ cm}^{-1}$ base deformation vibrations with semi-weak absorbance
677 are observed and are due to its coupled through the glycosidic linkage to the vibration of
678 the saccharides (ribonucleosides in RNA). The band positions are greatly influenced by
679 the ribosidic torsion angle as it is the case in this aptamer with a HS-pentyl linked to a-
680 phosphate-cytosinine -nucleoside). In the region $1312\text{-}1004 \text{ cm}^{-1}$ strong absorptions are

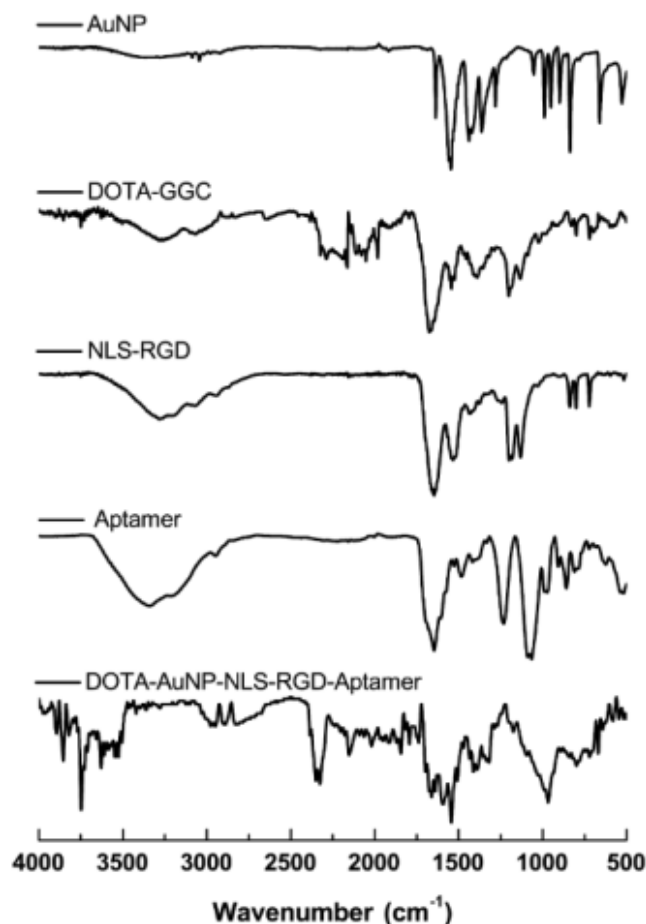
681 observed which are due to the asymmetric (1230 cm^{-1}) and symmetric (1090 cm^{-1})
682 stretching vibrations of the phosphate groups in the nucleosides. In this work bands at
683 1234 cm^{-1} and a doublet band at 1088 cm^{-1} and at 1064 cm^{-1} are observed [1,5]. In this
684 region DOTA-GGC and NLS-RGD spectra reveal a band at 1131 cm^{-1} which correspond
685 to the secondary aliphatic amides present in both compounds which disappear completely
686 in the NP-conjugate system and those at about 1200 and 1180 cm^{-1} due to C-N-C
687 vibrations from the DOTA and RGD cycles decrease significantly and shift by about $5-9$
688 cm^{-1} in the NP-conjugate system. The carboxylic from DOTA and the asparagine of RGD
689 are weak sharp bands observed at 1733 and 1735 cm^{-1} , respectively. In the NP- conjugate
690 system spectrum is observed as semi-weak-sharp band at 1737 cm^{-1} with a shoulder at
691 1747 cm^{-1} (Fig 10).

692 The asymmetric vibrations in the phosphates $-\text{O-P}(\text{O})-\text{O}-$ bridged to the terminal pentyl
693 mercaptan $-(\text{CH}_2)_5-\text{SH}$ and to the riboside by a methylene $(-\text{CH}_2-)$ each one disappear in
694 the MIR spectrum of the NP-conjugate system but the symmetric vibration at 1088 (
695 semi-defined band) is 5 cm^{-1} blue shifted with significant loss of absorbance while the
696 other (at 1064 cm^{-1}) is inside the semi broad strong band ($1200-900\text{ cm}^{-1}$) centered at 966
697 cm^{-1} . The absence of the band at 1230 cm^{-1} in the NP-Conjugate system spectrum and the
698 change in position and intensity of the other two indicate clearly that the aptamer is
699 bonded to NP through the HS-pentyl moiety resulting in a strong NP-S bond and a
700 significant change in the riboside torsion angle (Fig 10). This is also revealed in the $1000-$
701 700 cm^{-1} region where the bands are due to the vibrations of the phosphate –riboside
702 backbone, ring puckering and out of plain base vibrations. Thus, the bands at 987 and 973
703 cm^{-1} are associated to the nucleoside components. In the NP-Conjugate system spectrum,
704 that band at less frequency energy is the centered at $966, 7\text{ cm}^{-1}$ red shifted in the
705 conjugate. The bands at $906, 859, 809, 786\text{ cm}^{-1}$ disappear almost completely in the NP-
706 Conjugate system spectrum or the reason already discussed. Some bands observed in the
707 DOTA-GGC and NLS-RGD in the region from $1460-1100$ are still seen in the conjugate.

708 DOTA-GGC and Aptamer react with the NP by means of the thiol groups while NLS-
709 RGD through the sulphides of substituted cysteines. In DOTA-GGC, the $-\text{C-SH}$ from
710 terminal cysteine is seen as a weak band at 2630 cm^{-1} which has been already reported at

711 2546 cm^{-1} and confirmed by RAMAN for terminal cysteine in HYNIC-GGC peptide [7].
712 The Aptamer spectrum does not reveal the terminal thiol from the pentyl-SH linked to the
713 phosphate-nucleoside (Fig. 10).

714 It has to be pointed that the -SH stretching vibration is well defined in small molecules in
715 spite of its weak absorbance but it is scarcely seen in larger molecules and in the case of
716 the Aptamer spectrum is not easy to be analyzed, on one hand, its size and the whole
717 backbone conformation can prevent the appearance of such a weak band and on the other,
718 some bands between 900-780 cm^{-1} are associated to $-\text{CH}_2\text{-SH}$ and $\text{CH}_2\text{-S-}$ bonds which
719 are weak in IR but strong in RAMAN can be confused with that from phosphate
720 vibrations of the nucleosides. In general C-S stretching vibrations are seen between 800
721 and 550 cm^{-1} . However, depending on the functional group near the C-S bond and the
722 type of compounds this expands down and up this region (1035-245 cm^{-1} stretching
723 vibrations) [1]. In the case of the two peptides and the Aptamer before interacting with
724 NP, the band between 722-719 cm^{-1} is observed which does not demonstrate the bond -C-
725 SH since in NLS-RGD, this band is defined at 722 cm^{-1} for sulfides in the molecular
726 composition not thiols. It is still seen in the conjugate system at 719 cm^{-1} . Thus, the weak
727 bands at 694 and 684 can be associated to terminal aliphatic C-SH vibrations in DOTA-
728 GGC and Aptamer, respectively. NLS-RGD does not show any band between 706 and
729 604 cm^{-1} reported for C-S- stretching vibrations between 720-550 cm^{-1} . Finally, in the
730 conjugate-NP system a sharp band at 668 cm^{-1} and that at 719 cm^{-1} are observed which
731 were associated to the formation of NP-S bonds with both peptides and the Aptamer to
732 the nanoparticle (Fig. 10).

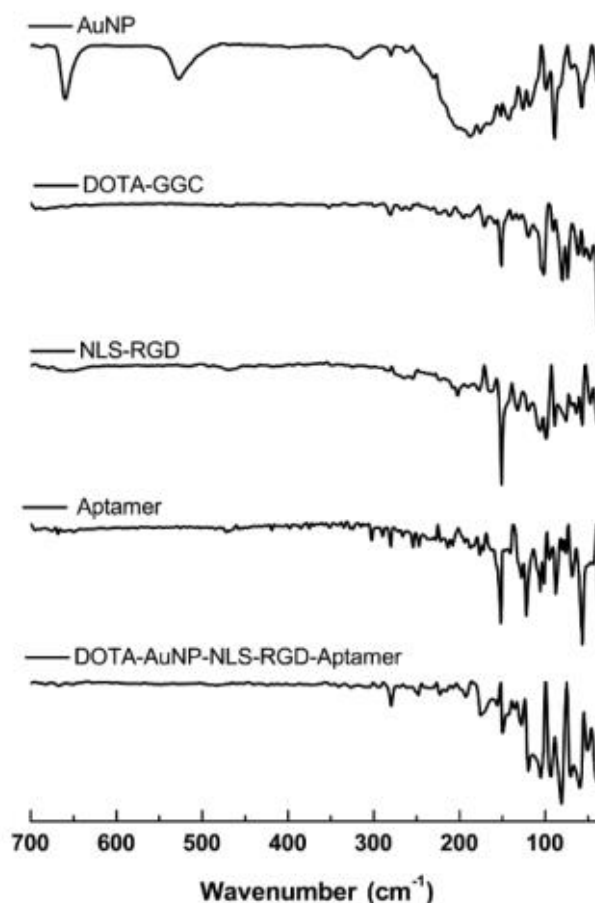


733

734 **Fig. 10** MIR-Infrared spectra of NP, DOTA-GGC, NLS-RGD, Aptamer and DOTA-
735 GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer.

736 In Fig. 11, are collected the FIR spectra. In the NP spectrum a semi-broad band at 660
737 and 527 cm⁻¹ corresponds to free phosphates ions (PO₄³⁻, HPO₄²⁻, H₂PO₄¹⁻) and that broad
738 structured band observed between 255 and 104 cm⁻¹ to these ions hydrogen bonded with
739 water molecules (-P=O●●●HOH and (-PO)OH●●●OH₂)[1,2] since the NPs are
740 stabilized with PBS. These bands are observed because of the interaction of these species
741 with the NP particles. Down 160 cm⁻¹ in NP the bands are mainly due to lattice
742 vibrations. In DOTA-NP-NLS-RGD-Aptamer, the substitution of the phosphate anions
743 by the peptides and the Aptamer is demonstrated by the absence of the bands at 660 and
744 527 cm⁻¹ and the broad structured band which reveal the interaction of the peptides and
745 Aptamer with NP through the formation of the Au-S bonds. As it can be seen in Fig.11,

746 the region down 300 cm^{-1} was not good for assigning vibration frequencies to Au-S
 747 bonds, only a medium-weak band at 149 cm^{-1} were clearly observed and assigned to
 748 Au(core)-S stretching vibration modes (Au-S- bond) [8]. In fact, the bands are mostly due
 749 to torsional oscillations, torsional vibrations [1] of -C-N, -C-O- bonds from amide VII of
 750 the molecules composing the conjugate NP system and lattice vibrations.

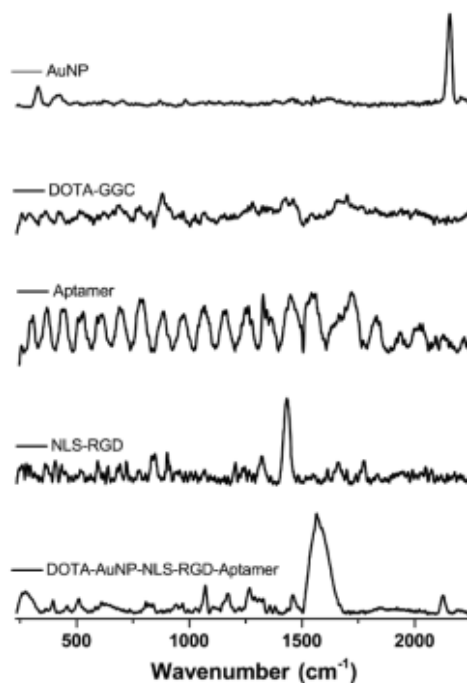


751

752 **Fig. 11** FAR-Infrared spectra of NP, DOTA-GGC, NLS-RGD, Aptamer and DOTA-
 753 GGC-NP-NLS-RGD-Aptamer.

754 Although the RAMAN spectra reveal only some bands with good intensity such bands
 755 allowed to confirm some of the assignments in MIR. In the figure 12 are observed three
 756 important bands in the NP spectrum, at 330 cm^{-1} to the PO_4^{3-} a broad one centered at 418
 757 cm^{-1} assigned to $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ and a strong band at 2156 cm^{-1} to HPO_4^{2-} ions hydrogen bonded
 758 to water molecules [1].

759 In the NLS-RGD spectrum, the intense band centered at 1433 cm^{-1} corresponds to
 760 stretching vibrations of the -C-N- bonds (Amide III) of the primary amides of the NLS-
 761 RGD. In the NP-conjugate system this band is not observed probable due to the
 762 symmetrical change of the peptides after its interaction with NP. In the NP conjugate
 763 system, spectrum a strong broad band ($1500\text{ to }1680\text{ cm}^{-1}$) with a maximum at 1566 cm^{-1}
 764 and a shoulder at 1588 cm^{-1} is observed and assigned to amides from the peptides and
 765 pyrimidines from the Aptamer; between $230\text{ and }340\text{ cm}^{-1}$ there is a broad weak band
 766 with two maxima at $260\text{ and }274\text{ cm}^{-1}$ and shoulders at $287\text{ and }301\text{ cm}^{-1}$ which is in the
 767 region usually reported for Au-S bond ($200\text{-}370\text{ cm}^{-1}$) formed between thiol compounds
 768 and gold clusters and gold nanoparticles in RAMAN and FIR [8,9, 10]. The sharp band
 769 at 2126 cm^{-1} seems to belong to imines groups vibrations from the bases of the Aptamer
 770 more than to free water.



771

772 **Fig. 12** Raman spectra of NP, DOTA-GGC, Aptamer, NLS-RGD and DOTA-GGC-NP-
 773 NLS-RGD-Aptamer.

774 Conclusions

775 A spectroscopic vibrational study of A DOTA-NP-NLS-RGD-Aptamer (Fig. 13) was
776 done. The analysis of DOTA and NLS-RGD spectra revealed that their conformations
777 change drastically once the Au-S bond is formed with them but it is concluded that the
778 Aptamer imposes the structural arrangement of the peptides in the NP-conjugate and
779 predominates in the structural feature of the spectrum. It was not found clear evidence of
780 another type of interaction between the NP and the peptides and aptamer apart from that
781 with the thiols and sulfides functional groups to form the NP-S bonds of the NP-
782 conjugate system.

783 REFERENCES

- 784 1. Socrates G (2001) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. John Wiley
785 & Sons, Middlesex, U.K
- 786 2. Jastrzębski W, Sitarz M, Rokita M, Bułat K (2011) Infrared spectroscopy of different
787 phosphates structures. *Spectrochimica Acta Part A*. 79:722–727
- 788 3. Fabris L, Antonello S, Armelao L, Donkers RL, Polo F, Toniolo C, Maran F (2006)
789 Gold Nanoclusters Protected by Conformationally Constrained Peptides. *J. Am.*
790 *Chem. Soc.* 128:326-336
- 791 4. Boal AK, Rotello VM (2000) Intra- and Intermonolayer Hydrogen Bonding in Amide-
792 Functionalized Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles.
793 *Langmuir*. 16:9527-9532
- 794 5. Lee JC, Gutell RR (2004) Diversity of base-pair conformations and their occurrence in
795 rRNA structure and RNA structural motifs. *J. Mol. Biol.* 344: 1225–1249
- 796 6. Chenon B, Sandorfy C (2000) Hydrogen bonding in the amine hydrohalides. General
797 aspects. *Can. J. Chem.* 36: 1181-1206
- 798 7. Ocampo-Garcia BE, Ramirez F de M, Ferro-Flores G, Leon-Rodriguez LM, Santos-
799 Cuevas CL, Morales-Avila E (2011) ^{99m}Tc-labeled gold nanoparticles capped with
800 HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl. Med. Biol.* 38: 1–
801 11
- 802 8. Tlahuice-Flores A, Whetten RL, Yacaman M (2013) Vibrational Normal Modes of
803 Small Thiolate-Protected Gold Clusters. *J. Phys. Chem. C*. 117: 12191–1219


-
- 804 9. Dolamic I, Varnholt B, Bürgi T (2013) Far-infrared spectra of well-defined thiolate-
805 protected gold clusters. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15: 19561—19565
- 806 10. Bürgi T (2015) Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled
807 monolayers to clusters. *Nanoscale.* 7: 15553–15567

7.2. SEGUNDO ARTÍCULO PUBLICADO

Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry
https://doi.org/10.1007/s10967-018-6266-6



In vitro and in vivo synergistic effect of radiotherapy and plasmonic photothermal therapy on the viability of cancer cells using ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticles under laser irradiation

Abraham González-Ruiz^{1,2} · Guillermina Ferro-Flores¹  · Nallely Jiménez-Mancilla^{2,3} · Alondra Escudero-Castellanos^{1,2} · Blanca Ocampo-García¹ · Myrna Luna-Gutiérrez¹ · Clara Santos-Cuevas¹ · Enrique Morales-Avila² · Keila Isaac-Olivé²

Received: 24 June 2018
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2018

Abstract

This research aimed to evaluate the photothermal and radiotherapeutic effect of the ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptamer anti-angiogenic nanosystem on the viability of U87MG cancer cells by using in vitro and in vivo models, as well as to assess the synergic effect of both therapies. In vitro results demonstrated a decrease in cell viability to $2.14 \pm 0.27\%$ after the treatment with photothermal therapy plus radiotherapy. These results correlated with the observed in vivo therapeutic response in mice with U87MG-induced tumors, in which ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptamer under laser irradiation inhibited tumor progression. The combination of radiotherapy and thermotherapy in one nanoradiopharmaceutical could be potentially useful for cancer treatment.

Keywords Lutetium-177 · ^{177}Lu -gold nanoparticles · Plasmonic photothermal therapy · Anti-VEGF aptamer · RGD peptide

Introduction

Radiopharmaceutical preparations based on ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles are a relevant topic in the field of theranostic innovation for cancer management. Gold nanoparticles have a non-toxic nature, a surface of easy chemical functionalization and unique optical properties due to the SPR (surface plasmon resonance) effect [1]. Because of the SPR phenomenon, Au-nanoparticles have demonstrated to be a potential tool in plasmonic photothermal therapy [2, 3]. On the other hand, ^{177}Lu has been

used in the design of multiple radiopharmaceuticals, due to its emitting radiation properties such as the therapeutic β_{max} emission of 0.497 MeV and its γ -radiation of 0.208 MeV for diagnostic imaging [4].

Current theranostic compounds aim to prevent tumor development from early stages. Inhibition of new vascular blood vessel formation around the tumor (angiogenesis) is crucial to inhibit the growth of the malignant lesion. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and integrins overexpressed in the angiogenic process are potential inhibition targets to stop tumor development [5, 6].

^{177}Lu -Au nanoparticles have been effectively functionalized with peptides, antibodies or aptamers for specific binding to tumor receptors [7, 8]. Recently, we reported the synthesis and physicochemical characterization of the ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer system with fluorescence and anti-angiogenic properties by targeting both the VEGF pathway through the anti-VEGF aptamer, and the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin through the NLS-RGD (Nuclear Localization Sequence-Arg-Gly-Asp) peptide [9]. Nevertheless, the ^{177}Lu -Au-nanoradiopharmaceutical could also allow the localized and simultaneous delivery of heat (by the SPR

✉ Guillermina Ferro-Flores
guillermina.ferro@inin.gob.mx;
ferro_flores@yahoo.com.mx

¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

² Universidad Autónoma del Estado de México, 50180 Toluca, Estado de México, Mexico

³ CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750 Ocoyoacac, Estado de México, Mexico

Published online: 24 October 2018



7.2.1. *In vitro* and *in vivo* synergistic effect of radiotherapy and plasmonic photothermal therapy on the viability of cancer cells using ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticles under laser irradiation

A. González-Ruiz^{1,2}, G. Ferro-Flores^{1*}, N. Jiménez-Mancilla^{2,3}, B. Ocampo-García¹, M. Luna-Gutiérrez¹, C. Santos-Cuevas¹, E. Morales-Avila², K. Isaac-Olivé²

¹*Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Department of Radioactive Materials, Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.*

²*Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México 50180, MEXICO.*

³*CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.*

**Corresponding author*

Guillermina Ferro-Flores, Ph.D.

(ORCID ID: 0000-0003-0296-7605)

Departamento de Materiales Radiactivos

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca S/N

La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México,

52750 MEXICO

Tel. + (52) (55)-53297200

guillermina.ferro@inin.gob.mx

7.2.2. Apartados del artículo

20 ***In vitro* and *in vivo* synergistic effect of radiotherapy**
21 **and plasmonic photothermal therapy on the viability of**
22 **cancer cells using ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer**
23 **nanoparticles under laser irradiation**

24 A. González-Ruiz^{1,2}, G. Ferro-Flores^{1*}, N. Jiménez-Mancilla^{2,3},
25 A. Escudero-Castellanos^{1,2}, B. Ocampo-García¹, M. Luna-Gutiérrez¹, C. Santos-Cuevas¹,
26 E. Morales-Avila², K. Isaac-Olivé²

27 ¹*Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Department of Radioactive Materials,*
28 *Ocoyoacac, Estado de México 52750, MEXICO.*

29 ²*Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México 50180,*
30 *MEXICO.*

31 ³*CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, Estado de*
32 *México 52750, MEXICO.*

33 **Abstract**

34 This research aimed to evaluate the photothermal and radiotherapeutic effect of the
35 ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptamer-anti-VEGF nanosystem on the viability of U87MG cancer
36 cells by using *in vitro* and *in vivo* models, as well as to assess the synergic effect of both
37 therapies. *In vitro* results demonstrated a decrease in cell viability to 2.14 ± 0.27 % after
38 the treatment with photothermal therapy plus radiotherapy. These results correlated with
39 the observed *in vivo* therapeutic response in mice with U87MG-induced tumors, in which
40 ^{177}Lu -Au-RGD-NLS-Aptamer-anti-VEGF under laser irradiation (photothermal therapy
41 plus radiotherapy) inhibited tumor progression. The combination of radiotherapy and
42 thermotherapy in one nanoradiopharmaceutical could be potentially useful for cancer
43 treatment.

44 .

45 **Keywords**

46 Lutetium-177; ^{177}Lu -gold nanoparticles; plasmonic photothermal therapy; anti-VEGF
47 aptamer; RGD peptide.

48 **Introduction**

49 Radiopharmaceutical preparations based on ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles are a
50 relevant topic in the field of theranostic innovation for cancer management. Gold
51 nanoparticles have a non-toxic nature, a surface of easy chemical functionalization and
52 unique optical properties due to the SPR (surface plasmon resonance) effect [1]. Because
53 of the SPR phenomenon, Au-nanoparticles have demonstrated to be a potential tool in
54 plasmonic photothermal therapy [2,3]. On the other hand, ^{177}Lu has been used in the
55 design of multiple radiopharmaceuticals, due to its emitting radiation properties such as
56 the therapeutic $\beta_{\text{-max}}$ emission of 0.497 MeV and its γ -radiation of 0.208 MeV for
57 diagnostic imaging [4].

58 Current theranostic compounds aim to prevent tumor development from early stages.
59 Inhibition of new vascular blood vessel formation around the tumor (angiogenesis) is
60 crucial to inhibit the growth of the malignant lesion. Vascular endothelial growth factor
61 (VEGF) and integrins overexpressed in the angiogenic process are potential inhibition
62 targets to stop tumor development [5,6].

63 ^{177}Lu -Au nanoparticles have been effectively functionalized with peptides, antibodies or
64 aptamers for specific binding to tumor receptors [7,8]. Recently, we reported the
65 synthesis and physicochemical characterization of the ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer
66 system with fluorescence and anti-angiogenic properties by targeting both the VEGF
67 pathway through the anti-VEGF aptamer, and the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin through the NLS-
68 RGD (Nuclear Localization Sequence-Arg-Gly-Asp) peptide [9]. Nevertheless, the ^{177}Lu -
69 Au-nanoradiopharmaceutical could also allow the localized and simultaneous delivery of
70 heat (by the SPR effect) and ionizing radiation (by β - particle emission) near or inside the

71 cell nucleus, generating a possible synergistic therapeutic effect between plasmonic
72 photothermal therapy and radiotherapy [10].

73 This research aimed to evaluate the photothermal and radiotherapeutic effect of the ^{177}Lu -
74 Au-RGD-NLS-Aptamer nanoradiopharmaceutical on the viability of U87MG cancer cells
75 by using *in vitro* and *in vivo* models, as well as to assess the synergic effect of both
76 therapies.

77 **Experimental**

78 1. Preparation of the ^{177}Lu -Au-nanosystems

79 The synthesis of both ^{177}Lu -labeled and unlabeled Au-nanosystem was described in a
80 previous work [9]. Briefly, the DOTA-GGC (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-
81 N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-Gly-Gly-Cys) molecule was used as a ^{177}Lu (ITG,
82 Germany) chelator, and for gold nanoparticles (20 nm, Sigma-Aldrich Co, USA),
83 conjugation through cysteine (active -SH group) was employed. Both molecules, NLS-
84 RGD [NH₂-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)-3-
85 succinimidepropionylamide-Gly-Cys(Acm)-Gly-Cys(Acm)-CONH₂], and the anti-VEGF
86 aptamer (28 RNA bases with the addition of a terminal pentyl-SH group, Iba Solutions
87 Company, Germany), were also conjugated to the gold nanoparticle surface through the
88 -SH group. In this research, the Au-conjugates were concentrated by ultracentrifugation
89 (30,000 MW cut off, Amicon Ultracel, Millipore, USA) to 1.12×10^{13} nanoparticles/mL.
90 For comparative purposes, the radioactive (^{177}Lu -labeled) and non-radioactive
91 nanoparticles of Au, Au-NLS-RGD, Au-Aptamer, and Au-NLS-RGD-Aptamer were also
92 prepared. Detailed methods of radiolabeling and radiochemical purity assessment by
93 ultrafiltration and size-exclusion chromatography have been shown elsewhere [11,12].

94 The Au-NLS-RGD-Aptamer nanosystem was characterized by TEM (transmission
95 electron microscopy) in shape and size (JEOL JEM2010 HT microscope operated at 200
96 kV) before and after laser irradiation. The nanoconjugate was also measured by UV-Vis
97 spectroscopy (Perkin-Elmer Lambda-Bio spectrometer) to monitor the shift in the surface

98 plasmon band before and after laser irradiation, as well as particle size analysis by DLS
99 (Dynamic Light Scattering, Nanotracc Wave, USA). Radiochemical purity was also
100 verified by ultrafiltration after laser irradiation.

101 2. Cell culture

102 The U87MG rat glioma cell line was obtained from the American Type Culture
103 Collection (Atlanta, GA, USA) and cultured (37°C, 5% CO₂) in Roswell Park Memorial
104 Institute Medium (Sigma-Aldrich Co.). Fetal bovine serum (10%), penicillin (100 U/mL)
105 and streptomycin (100 µg/mL) were also used.

106 5. Induction of U87MG tumors in athymic mice

107 The studies of tumor uptake in mice were carried out according to that established in
108 Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. Athymic male mice (20–22 g) were kept in
109 sterile cages with wood-shaving beds, constant temperature, humidity, noise and 12:12
110 light periods. By subcutaneous injection into the upper back of twenty 6–7-week-old
111 nude mice, glioma tumors of U87MG cells (1.5×10^6 suspended in 0.2 mL of phosphate
112 buffered saline) were induced.

113 3. Laser arrangement

114 An Nd-YAG laser (Qsmart-100, Quantel laser) pulsed for five ns at 532 nm (energy=45.9
115 mJ/pulse) was used for the irradiation experiments with a repetition rate of 10 Hz. For the
116 *in vitro* experiments, the irradiation time was 3.5 minutes (well plate area of 0.38 cm², ϕ
117 7 mm), and from 3.5 to 5.6 min for *in vivo* studies, due to the differences in tumor sizes
118 throughout the study. A Dual-Channel Joulemeter/Power Meter (MolelectronEPM 200,
119 Coherent) was used for measurement of the power of each laser pulse. The laser covered
120 the total well plate area as well as the tumoral area by using the diverging lens. The
121 density of energy was in all cases 250 J/cm² (average irradiance of 1.19 W/cm²). The well
122 plate was placed over a heating plate at 37°C (Microplate Thermo Shaker, HumanLab,
123 China) during laser irradiation. The temperature measurements during *in vitro*
124 experiments were carried out with a type-K thermocouple and an Arduino electronic
125 circuit to process the data.

126 4. In vitro cell viability assay

127 U87MG cells suspended in fresh medium were incubated in a 96-well plate at a density
128 of 1×10^4 cells/well for 24h at 37°C with 5% CO₂ and 85% humidity. For
129 experimentation, culture media was removed, and cells were exposed to non-radioactive
130 or radioactive Au-nanoparticles (Au-NLS-RGD-Aptamer, Au-NLS-RGD, Au-Aptamer,
131 Au, ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD-Aptamer, ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD, ¹⁷⁷Lu-Au-Aptamer or ¹⁷⁷Lu-
132 Au) (100 μL, 1.12×10^{13} Au-nanoparticles) for 2h. Untreated cells, ¹⁷⁷LuCl₃ or laser
133 irradiation of cells without Au-nanoparticles were considered as negative controls. The
134 activity of radioactive compounds was 5 kBq/100 μL. Afterwards, the solution in each
135 well was removed and replaced with fresh culture media. Cells were maintained under
136 standard culture conditions for 72h. For the evaluation of the synergistic effect between
137 radiotherapy and thermotherapy, cells exposed to ¹⁷⁷Lu-Au conjugates were first
138 irradiated with the laser. Finally, the viability of the cells was evaluated by standard XTT
139 assay ((sodium 3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-
140 nitro]benzene sulfonic acid hydrate)). The absorbance of untreated cells was considered
141 as 100% of living U87MG cells.

142 5. Therapeutic protocol

143 Four groups ($n = 4$) of athymic nude mice bearing U87MG gliomas (tumor size $0.05 \pm$
144 0.01 g) were used. Each group was subjected to one of the following treatments: (a) ¹⁷⁷Lu-
145 Au-NLS-RGD-Aptamer (molecular radiotherapy), (b) Au-NLS-RGD-aptamer (laser
146 irradiation: photothermal therapy) and (c) ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD-aptamer (molecular
147 radiotherapy + laser irradiation: photothermal therapy). There was also an untreated
148 control group. The injected activity was 2 MBq/0.05 mL, 5.6×10^{12} Au-nanoparticles/0.05
149 mL (injected intratumorally in mice under 2% isoflurane anesthesia), Cerenkov images
150 were acquired at 96 h after intratumoral (i.t.) radiopharmaceutical injection
151 (Xtreme/preclinical equipment, Bruker Corp., USA) to verify the ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD-
152 Aptamer retention in tumors.

153 Each treatment was administered on days 1, 7, 14 and 21, for a total of four doses
154 (radiotherapy and thermotherapy). The tumor irradiation was done with the same density

155 of energy as the *in vitro* experiments (250 J/cm²). Mice were kept under anesthesia (2%
 156 isoflurane) during the study. Tumor growth was verified weekly. The length (*L*) and
 157 width (*a*) were measured with calipers, and the volume was determined as $V=\pi/6*(L)(a)^2$.
 158 The tumor mass was calculated considering a tumor density of 1 g/cm³. After 25 days,
 159 the mice were sacrificed.

160 X-ray images (X-Treme preclinical equipment, Bruker Corp., USA) were acquired 3 d
 161 after the last injection (at 25 days of treatment). Mice kept under 2% isoflurane anesthesia
 162 were placed in the prone position, and imaging was performed.

163 6. Evaluation of the radiation absorbed dose

164 As a first step, *in vivo* biokinetics were obtained by dissection of mice (n=3) with
 165 U87MG-induced tumors at 1, 3, 24, 48, 72, and 96 h after ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD-Aptamer
 166 (2 MBq/0.05 mL, 5.6×10¹² Au-nanoparticles) intratumoral injection. This group was
 167 independent of the treatment groups previously mentioned. The extracted organs or tissue
 168 samples were measured using a NaI(Tl) detector (NML Laboratories Inc, USA) and
 169 results were expressed as a percentage of the injected activity per gram of tissue (% ID/g)
 170 or percentage of the injected activity per organ (%ID). Radioactivity of the main source
 171 regions (liver, spleen, kidneys, and tumor) as a function of time [Ah(t)] was adjusted to
 172 triexponential functions. As an evidence of the target-specific accumulation of the
 173 nanoradiopharmaceutical in tumors, a group of mice was previously injected (1h before)
 174 with cold Au-NLS-RGD-Aptamer (1.12×10¹³) to generate a receptor-blocking effect.
 175 Finally, mice were dissected one hour after ¹⁷⁷Lu-nanosystem administration.

176 The Ah(t) functions were used in the therapeutic protocol to obtain the total number of
 177 disintegrations (N) in the main source organs and tumor during the entire treatment
 178 (Eq. 1):

$$179 \quad N_{sources} = \int_{t=0}^{t=25 d} Ah(t)dt + \int_{t=7}^{t=25 d} Ah(t)dt + \int_{t=14}^{t=25 d} Ah(t)dt + \int_{t=21}^{t=25 d} Ah(t)dt \quad (1)$$

180 The radiation absorbed dose to organs and tumor was obtained according to Eq. 2:

$$181 \quad \bar{D}_{target-source} \sum_{source} N_{source} \times DF_{target-source} \quad (2)$$

182 where \bar{D} is the mean radiation absorbed dose and DF is a dose factor (Eq. 3):

$$183 \quad DF = \frac{\sum n_i E_i \phi_i}{m} \quad (3)$$

184 DF values were calculated by using the organ masses (m) and absorbed energy fraction
 185 (ϕ_i) reported for a mouse model by Miller et al. [13]. From the lutetium-177 beta
 186 spectrum, the $\sum n_i E_i$ was calculated.

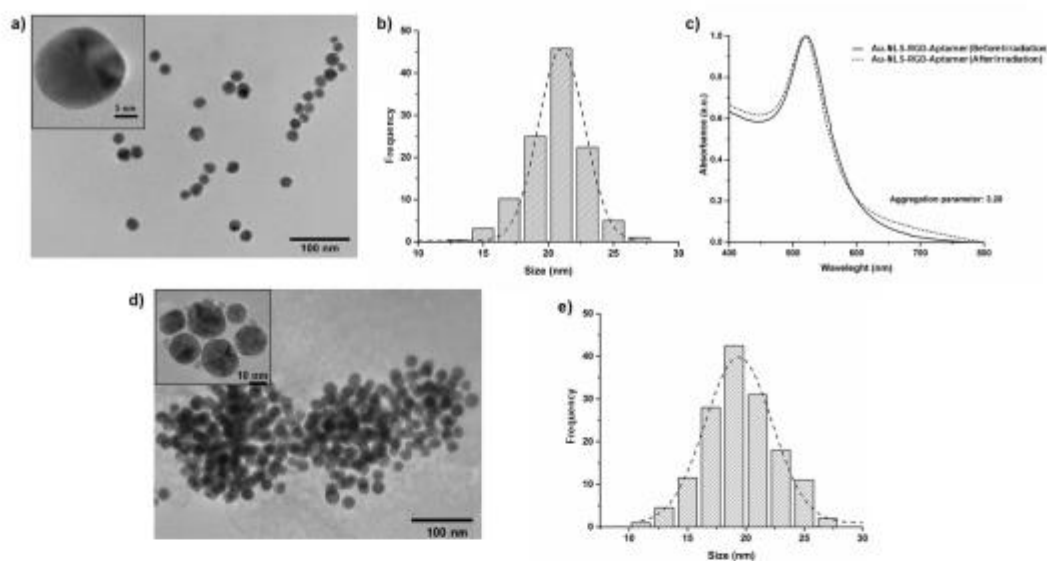
187 7. Statistical analysis

188 The data are presented as mean \pm SD of the results of three independent replicates of each
 189 condition tested. Three-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the
 190 effects of different treatments on cell viability. The differences between the *in vivo*
 191 treatments of the unblocked and blocked receptors were assessed through Student's t-test.

192 Results and discussion

193 Chemical results

194 TEM images and UV-Vis spectra of the Au-NLS-RGD-Aptamer before and after laser
 195 irradiation are shown in Fig. 1. As can be observed, the most significant changes were a
 196 minimum increase in the aggregation factor (area under the curve between 600-700 nm)
 197 and a slight increase in the diameter, which was confirmed by the redshift of the Au-
 198 nanoparticle SPR band (from 519.2 nm to 521.3 nm) and the DLS analysis (from
 199 24.70 ± 0.07 to 26.86 ± 1.60 nm). After ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer laser irradiation,
 200 the radiochemical purity remained stable (99%). These results confirmed that the laser
 201 treatment does not interfere with the stability of the nanoradiopharmaceutical, allowing
 202 the delivery of radiation doses until total radionuclide decay is achieved in the biological
 203 system.

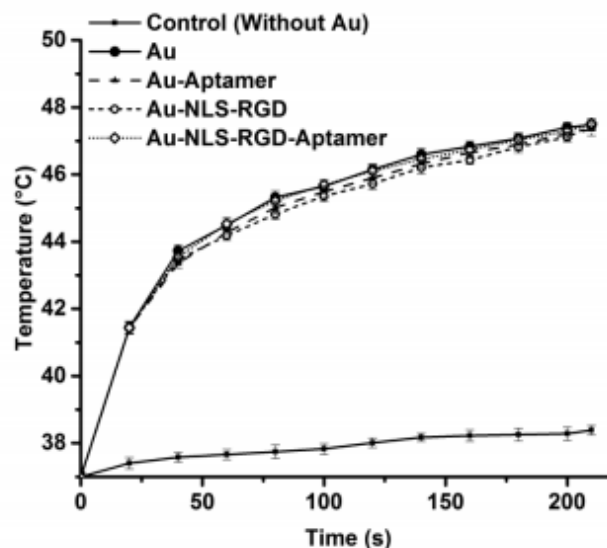


204

205 **Fig. 1** Au-NLS-RGD-Aptamer nanosystem: TEM images a) before and d) after
 206 irradiation; particle size distribution b) before and e) after irradiation and c) UV-Vis
 207 spectrum before and after irradiation. Irradiation: Nd-YAG laser pulsed for 5 ns at
 208 532 nm (energy=45.9 mJ/pulse), 3.5 min, repetition rate of 10 Hz (1.19 Wcm⁻²).

209 *In vitro photothermal and radiotherapeutic cytotoxicity of Au-nanosystems.*

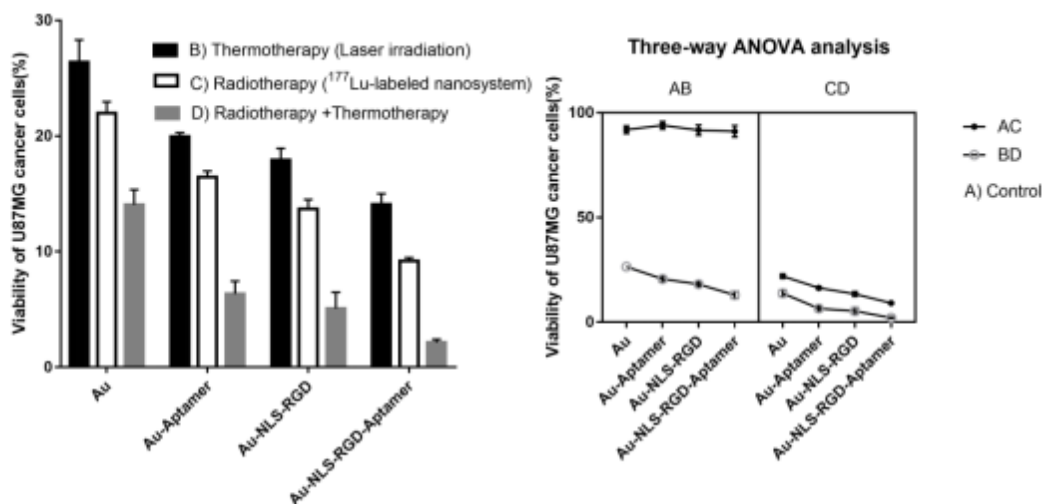
210 Figure 2 shows the effect of the Au-NLS-RGD-Aptamer, Au-NLS-RGD, Au-Aptamer
 211 and Au nanoparticles on the temperature increase of the culture media containing
 212 U87MG cells and under laser irradiation at different times. The temperature in each
 213 irradiated well reached ~47.5°C ($\Delta t=10.5^{\circ}\text{C}$) for all Au-nanoconjugates, exhibiting a
 214 significant difference ($p<0.05$) with regard to the solution without any Au-nanoconjugate
 215 (control, $\Delta t=1.3^{\circ}\text{C}$) (Fig 2). This result was expected since, in all nanosystems, the laser
 216 beam interaction with gold nanoparticles causes the collective oscillation of electrons and
 217 light absorption that is converted to heat, delivered to the surrounding medium.



218

219 **Fig. 2** Effect of the Au-NLS-RGD-Aptamer, Au-NLS-RGD, Au-Aptamer and Au
 220 nanoparticles on the temperature increase of the culture media containing U87MG cells
 221 and under laser irradiation at different times. Irradiation: Nd-YAG laser pulsed for 5 ns at
 222 532 nm (energy=45.9 mJ/pulse), repetition rate of 10 Hz.

223 Fig. 3 shows the viability assay results of the cells exposed to laser irradiation and/or
 224 targeted radiotherapy. ANOVA results indicate that all nanosystems had a significant
 225 effect ($p < 0.05$) on U87MG cell viability, with a statistically significant difference among
 226 the treatments. All Au-nanoconjugates under laser irradiation induced a significant
 227 ($p < 0.05$) loss of cell viability when compared to the cells irradiated without Au (control;
 228 cell viability $> 88\%$), due to the localized heat deposition as a consequence of the SPR
 229 phenomenon. Likewise, all cells treated with ^{177}Lu -Au-nanosystems were significantly
 230 ($p < 0.05$) more affected in their viability than those treated with $^{177}\text{LuCl}_3$ (control; cell
 231 viability $> 88\%$), due to the target-specific recognition and internalization of the nano-
 232 radiopharmaceuticals with the consequent radiation dose delivery inside cells. However,
 233 in agreement with our previous results, the Au-NLS-RGD-Aptamer system produced the
 234 most significant effect over U87MG cancer cell viability because of the higher cell
 235 uptake and internalization with regard to those of Au-NLS-RGD and Au-Aptamer
 236 nanoconjugates [9].



237

238 **Fig. 3** Left: Effect on the viability of U87MG cells exposed to B) Au-NLS-RGD-
 239 Aptamer, Au-NLS-RGD, Au-Aptamer and Au nanoparticles under laser irradiation
 240 (thermotherapy, Nd-YAG laser, 532 nm); or C) ¹⁷⁷Lu-Au NLS-RGD-Aptamer, ¹⁷⁷Lu-Au
 241 NLS-RGD, ¹⁷⁷Lu-Au-Aptamer and ¹⁷⁷Lu-Au nanosystems (Targeted Radiotherapy); or
 242 D) ¹⁷⁷Lu- Au-NLS-RGD-Aptamer, ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD, ¹⁷⁷Lu-Au-Aptamer, and
 243 ¹⁷⁷Lu-Au nanosystems under laser irradiation (targeted radiotherapy plus thermotherapy).
 244 Right: Graphical representation of the three-way ANOVA analysis of the B, C) and D)
 245 treatments. A) Negative controls (¹⁷⁷LuCl₃ or U87MG cells irradiated without Au-
 246 nanoparticles).

247 Additionally, the affinity of the Aptamer (anti-VEGF), RGD (by the integrins $\alpha(v)\beta(3)$)
 248 over-expressed in U87MG cells), and the nuclear localization properties of the NLS
 249 sequence, allow a higher uptake and accumulation of the Au-NLS-RGD-Aptamer near
 250 and inside the cell nucleus. It is known from theoretical studies, that temperature reaches
 251 700°C around a 20 nm-spherical gold nanoparticle when it is under laser irradiation
 252 (530 nm) [14]. Therefore, the localized delivery of heat and ionizing radiation near or
 253 inside cell nucleus during the ¹⁷⁷Lu-Au-NLS-RGD-Aptamer plus the irradiation treatment
 254 causes the most U87MG cell damage (Fig. 3). The significant ($p < 0.05$) synergistic effect
 255 of the plasmonic photothermal therapy (thermotherapy) and the targeted radiotherapy on
 256 cell viability in all treatments with regard to the single treatment (thermotherapy or
 257 radiotherapy) is also evident in Fig 3. It is important to emphasize that the main feature of
 258 ionizing radiation is the localized release of large amounts of energy, which is more than
 259 enough to break a chemical bond; therefore, the biologic radiation effects result

260 principally from direct and indirect damage to DNA. Since proteins are the primary target
 261 for thermal cell damage [15], the two therapies (photothermal therapy and targeted
 262 radiotherapy), with different mechanisms to produce cell damage, resulted in an additive
 263 ability to kill tumor cells when they were used simultaneously. Other differences between
 264 irradiation (radiation therapy) and heating (thermotherapy) at the immuno-molecular
 265 level, recently reported by Finkel et al. [16] and Werthmüller et al. [17], also support the
 266 aforementioned synergistic effect.

267 *In vivo therapeutic protocol*

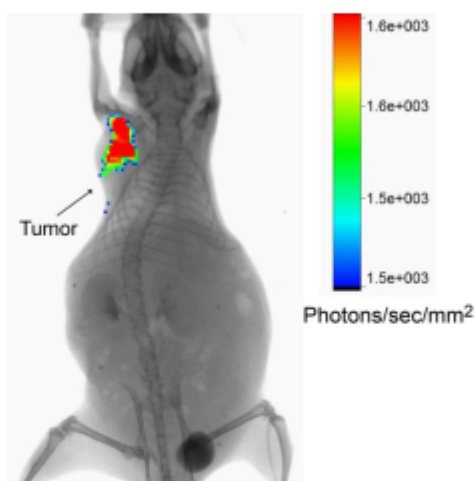
268 Biodistribution studies showed that $38.42 \pm 3.35\%$ of the ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer
 269 remains in the tumor at 96 h after i.t. administration (Table 1).

270 **Table 1.** Biodistribution in mice with U87MG-induced tumors after intratumoral
 271 administration of ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticles, expressed as a percentage of
 272 the injected dose/g of tissue (% ID/g⁺⁺) or a percentage of the injected dose per organ
 273 (%ID⁺) (mean \pm SD, n=3).

TISSUE	Unblocked						Blocked ^a
	1 h	3 h	24 h	48 h	72 h	96 h	1 h
Blood ⁺⁺	0.22 \pm 0.03*	0.19 \pm 0.03	0.07 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	1.95 \pm 0.76*
Heart ⁺	0.16 \pm 0.08	0.08 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.11 \pm 0.35
Lung ⁺	0.32 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.09 \pm 0.28
Liver ⁺	1.98 \pm 0.23*	2.15 \pm 0.12	0.91 \pm 0.39	0.82 \pm 0.12	0.75 \pm 0.11	0.51 \pm 0.12	4.03 \pm 0.95*
Pancreas ⁺	0.12 \pm 0.07	0.10 \pm 0.06	0.08 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.11 \pm 0.04
Spleen ⁺	0.62 \pm 0.13	1.20 \pm 0.12	0.64 \pm 0.38	0.38 \pm 0.15	0.19 \pm 0.07	0.16 \pm 0.21	0.32 \pm 0.29
Kidneys ⁺	2.57 \pm 0.38*	3.87 \pm 0.95	1.79 \pm 0.89	1.03 \pm 0.25	0.79 \pm 0.13	0.67 \pm 0.12	5.57 \pm 1.14*
Intestine ⁺⁺	0.54 \pm 0.14	0.49 \pm 0.09	0.31 \pm 0.18	0.18 \pm 0.10	0.08 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	0.32 \pm 0.18
Muscle ⁺⁺	0.11 \pm 0.03	0.06 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.21 \pm 0.10
Bone ⁺⁺	0.14 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.27 \pm 0.15
U87MG Tumor⁺	75.19 \pm 5.12*	58.31 \pm 4.21	53.52 \pm 5.07	43.23 \pm 4.32	39.92 \pm 4.08	38.42 \pm 3.35	33.25 \pm 4.15*

274 *Blocked with an additional intratumoral cold Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticle blocking dose one hour
 275 prior to administration of ^{177}Lu Au-NLS-RGD-Aptamer, in order to determine the non-specific binding of
 276 the radioactivity.
 277 *Significant difference ($P < 0.05$) between unblocked and blocked cell receptors

278 It was confirmed with the Cerenkov images acquired at 96 h post-radiopharmaceutical
 279 injection, in which the activity (Cerenkov light produced from β^- particles of ^{177}Lu in
 280 tissue) associated to the tumor is clearly visible as result of the high radiopharmaceutical
 281 retention (Fig. 4).



282

283 **Fig. 4** Cerenkov image (X-treme/preclinical equipment) acquired at 96 h after
 284 intratumoral administration of the ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer nanosystem. The
 285 activity (Cerenkov light produced from β^- particles of ^{177}Lu in tissue) associated to the
 286 tumor is clearly visible as result of the high radiopharmaceutical retention.

287 Liver, spleen, and kidney had a remarkably lower uptake after 96 h ($< 0.7\%$ ID)
 288 compared to that of the tumor (38.4% ID), and that is why they were not visible in the
 289 Cerenkov imaging modality. The overall specificity was confirmed by the partial receptor
 290 blocking study, in which a previous injection of the non-radioactive Au-NLS-RGD-
 291 Aptamer significantly reduced (t-student test, $p < 0.05$) the activity of tumors.
 292 Nevertheless, at 1 h, a high percentage of the administered activity remained in the
 293 blocked tumor (53.31% for the unblocked tissue vs. 33.25% in the blocked tissue;
 294 difference of 20.06%) due to the passive accumulation of the nanosystem in the tumoral
 295 lesion, induced by its colloidal nature and by the well-known passive EPR (enhanced
 296 permeability and retention) effect [18]. Passive targeting in the tumors occurred due to

297 extravasations through leaky blood vessels (gaps - 100-600 nm), but the significant
 298 difference in tumor uptake (20.06 %) is related to active targeting, which means a target-
 299 specific recognition. Biokinetic models also indicated that the total number of
 300 disintegrations and average absorbed radiation dose are significantly higher in the tumor
 301 than the other source organs (Table 2).

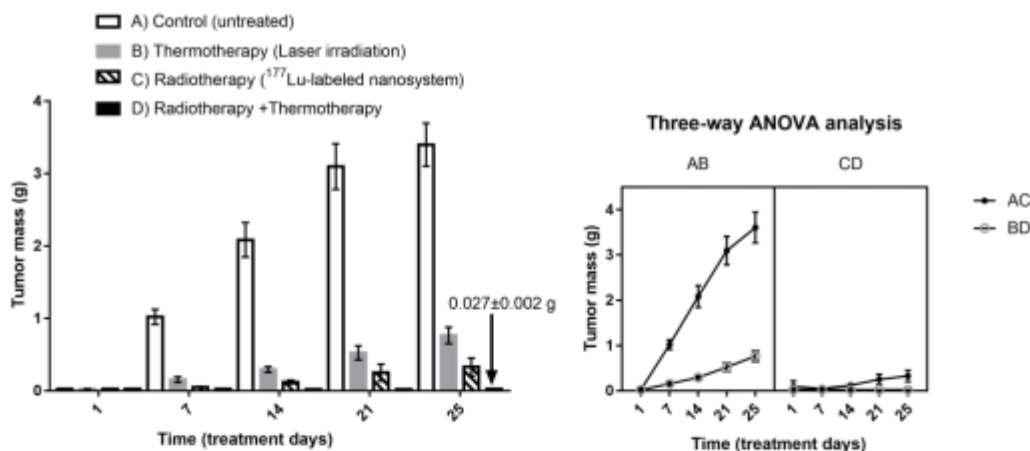
302 **Table 2.** Biokinetic models and average radiation absorbed doses of the principal source
 303 organs of mice with U87MG-induced tumors after intratumoral administration of
 304 ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer.

Organ	Biokinetic model	N_{total} (MBq \cdot h/MBq) (four injections at different times)	Average Radiation Absorbed Do (Gy/MBq)
Kidney	$A_h(t) = -7.42 e^{-1.434t} + 3.57 e^{-0.062t} + 0.98 e^{-0.008t}$	1.31	0.39
Liver	$A_h(t) = -14.60 e^{-2.604t} + 2.67 e^{-0.308t} + 1.10 e^{-0.011t}$	0.58	0.04
Spleen	$A_h(t) = -4.51 e^{-1.914t} + 1.18 e^{-0.039t} + 0.15 e^{-0.008t}$	0.44	0.36
Tumor	$A_h(t) = 34.80 e^{-1.484t} + 43.20 e^{-1.534t} + 58.11 e^{-0.009t}$	29.84	89

305

306 ANOVA results of the *in vivo* studies demonstrated that there is a statistically significant
 307 difference ($p < 0.05$) in all treatments. The progression of tumor size for the
 308 Au-nanoconjugates was significantly lower ($p < 0.05$) after 25 days compared to that of
 309 the control group (Fig. 5). At 25 days, the tumor size in the ^{177}Lu -labeled Au-NLS-RGD-
 310 Aptamer nanosystem group under laser irradiation (radiotherapy plus thermotherapy) was
 311 126 times smaller than that of the controls, and 28 times and 12 times lower than in the
 312 thermotherapy and radiotherapy groups, respectively (Fig. 5). The average radiation
 313 absorbed doses in tumors at the end of the radiotherapy treatment were 80 Gy for the
 314 ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptamer and 89 Gy in the case of ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-
 315 Aptamer plus laser irradiation. Differences in the radiation absorbed doses for the same
 316 radiopharmaceutical are associated with a significantly ($p < 0.05$) greater progression of

317 the tumor mass when radiotherapy was performed without thermotherapy (0.329 ± 0.124 g
 318 for the single treatment vs. 0.027 ± 0.002 g for the dual therapy).

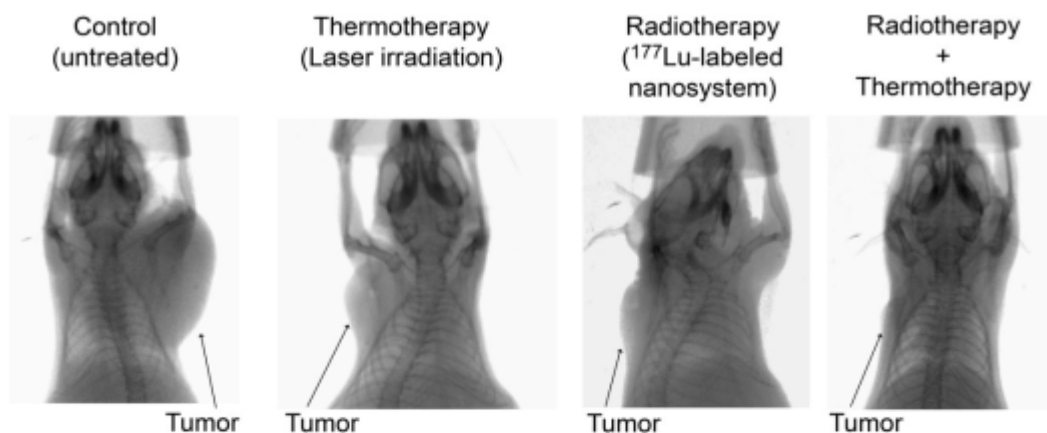


319

320 **Fig. 5** Left: Tumor size progression for B) Thermotherapy (Au-NLS-RGD-Aptamer
 321 under laser irradiation), C) Targeted radiotherapy (^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer), and
 322 C) Thermotherapy plus radiotherapy (^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer under laser
 323 irradiation) groups at different days of the treatment. Right: Graphical representation of
 324 the three-way ANOVA analysis of the A) control (untreated) and B, C, and D treatments.

325 Radiotherapy results are in agreement with those reported by Vilchis-Juarez et al. [12],
 326 using different ^{177}Lu -radiopharmaceuticals in the treatment of C6 glioma tumors in mice,
 327 but improved in this research by adding the plasmonic photothermal therapy. Fig. 6
 328 shows the X-ray images at 96 h after the last injection (at 25 days of treatment), in which
 329 the significantly smaller size of the tumor, due the synergistic effect of the photothermal
 330 and radiotherapy treatment, can be observed when compared to the results of the single
 331 procedures and the control (untreated). It is well-known that hyperthermia increases the
 332 effectiveness of radiation therapy by improving tumor oxygenation and affecting DNA
 333 repair mechanisms [15]. Furthermore, tumor hypoxia does not protect cells from heat as
 334 it does from ionizing radiation. Conversely, hyperthermia is effective at reversing
 335 hypoxia through the increase of vascular perfusion. Therefore, radiosensitization by
 336 hyperthermia is a critical mechanism induced in the synergistic effect observed in this
 337 research. Nevertheless, immune sensitization by heat has also been reported as a possible

338 tool for cancer treatment, since hyperthermia affects multiple aspects of the antitumor
 339 immune system [19,20].



340

341 **Fig. 6** X-ray images (X-Treme/preclinical equipment) of mice with U87MG tumors
 342 under thermotherapy (Au-NLS-RGD-Aptamer under laser irradiation), targeted
 343 radiotherapy (^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer) and thermotherapy plus radiotherapy
 344 (^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer under laser irradiation) treatments at 96 h after the last
 345 injection (at 25 days of treatment).

346 For potential clinical applications, the ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer radiopharmaceutical
 347 prepared in this study could also be used in photothermal therapy by using short NIR
 348 (near infrared) laser pulses to generate a second harmonic, which converts the NIR
 349 photons (800 nm) to visible photons (400 nm). The visible photons can be absorbed by
 350 the ^{177}Lu -nanospheres through SPR and electron interband transition with the conversion
 351 of their energy into heat [21]. The use of NIR light is important because tissues in the
 352 body are moderately transparent to NIR photons, thus creating the possibility of
 353 producing therapeutic effects in deep tissues [10,21].

354 Although several articles have used iron oxide and gold nanoparticles for *in vivo*
 355 thermotherapy [22-24], this is the first time that target-specific radiolabeled gold
 356 nanoparticles are reported as novel nanosystems that efficiently combine the therapeutic
 357 properties of radiotherapy and hyperthermia as a synergistic modality *in vivo*.
 358 Nevertheless, ^{177}Lu -Au-NLS-RGD-Aptamer-anti-VEGF under laser irradiation must be

359 evaluated in different cancer cells both *in vitro* and *in vivo*, as well as its effect on long-
360 term cell proliferation to establish its clinical potential.

361 **Conclusions**

362 Due to the synergistic effect of its photothermal and radiotherapeutic properties, the
363 ¹⁷⁷Lu-Au-RGD-NLS-Aptamer-anti-VEGF nanoradiopharmaceutical produced a
364 significant ($p < 0.05$) *in vitro* and *in vivo* decrease in U87MG cell viability. Furthermore,
365 the nanosystem inhibited tumor progression. The combination of radiotherapy and
366 thermotherapy in one nanoradiopharmaceutical under laser irradiation could be
367 potentially useful in cancer treatment.

368 **Declaration of Conflicting Interests**

369 The authors declare no potential conflicts of interest with regard to the research,
370 authorship, and/or publication of this article.

371 **Ethical approval**

372 All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use
373 of animals were followed.

374 **Acknowledgments**

375 This research received financial support from the Mexican National Council of Science
376 and Technology (CONACyT-Mexico, Grant 242443). This work was performed as part
377 of the activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de
378 Radiofármacos, CONACyT”.

379 **References**

380 [1] Zarschler K, Rocks L, Licciardello N, et al (2016) Ultrasmall inorganic nanoparticles:
381 State-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine* 12:1663-
382 1701. doi: 10.1016/j.nano.2016.02.019.

- 383 [2] Elbially N, Abdelhamid M, Youssef T (2010) Low power argon laser-induced thermal
384 therapy for subcutaneous Ehrlich carcinoma in mice using spherical gold nanoparticles. *J*
385 *Biomed Nanotechnol.* 6:687-693. doi: 10.1166/jbn.2010.1166.
- 386 [3] Abadeer NS, and Murphy CJ (2016) Recent Progress in Cancer Thermal Therapy
387 using Gold Nanoparticles. *J Phys Chem C* 120: 4691–4716. doi
388 10.1021/acs.jpcc.5b11232.
- 389 [4] Banerjee S, Pillai M, Knapp F (2015) Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals
390 linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev* 115:2934-2974
391 doi:10.1021/cr500171e.
- 392 [5] Frezzetti D and Gallo M. (2016) Vascular Endothelial Growth Factor A Regulates the
393 Secretion of Different Angiogenic Factors in Lung Cancer Cells. *J Cell Physiol*
394 231:1514-1521. doi: 10.1002/jcp.25243.
- 395 [6] Ellert-Miklaszewska A, Poleszak K, Kaminska B (2017) Short peptides interfering
396 with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. *Future Med Chem*
397 9:199-221 doi: 10.4155/fmc-2016-0189.
- 398 [7] Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, Santos-Cuevas CL, et al (2015) Theranostic
399 Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (177)Lu and
400 Conjugated to Peptides *Curr Radiopharm* 8:150-159. doi
401 10.2174/1874471008666150313115423.
- 402 [8] Yook S, Cai Z, Lu Y, Winnik MA, Pignol J, Reilly RM (2015) Radiation
403 nanomedicine for EGFR-positive breast cancer: panitumumab-modified gold
404 nanoparticles complexed to the β -particle-emitter, (177)Lu. *Mol Pharm.* 12:3963- 3972
405 doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00425.
- 406 [9] Gonzalez-Ruiz A., Ferro-Flores G., Azorin-Vega E. et al. (2017) Synthesis and *in*
407 *vitro* evaluation of an antiangiogenic cancer-specific dual-targeting 177Lu-Au
408 nanoradiopharmaceutical. *J Radioanal Nucl Chem.* 314: 1337-1345. doi
409 10.1007/s10967-017-5465-x.
- 410 [10] Jimenez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas CL, et al. (2013)
411 Multifunctional targeted therapy system based on 99mTc/177Lu-labeled gold
412 nanoparticles-Tat (49–57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells, *J*
413 *Labelled Compd Radiopharm* 56:663-671. doi: 10.1002/jlcr.3087
- 414 [11] Morales-Avila E, Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, et al. (2011) Multimeric
415 System of 99mTc-Labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDfK(C)] for
416 Molecular Imaging of Tumor $\alpha(v)\beta(3)$ Expression. *Bioconjugate Chem* 22: 913-
417 922. doi: 10.1021/bc100551s.
- 418 [12] Vilchis-Juarez A, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, et al. (2014) Molecular
419 targeting radiotherapy with cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to 177Lu-labeled gold
420 nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Biomed Nanotechnol* 10:393-404. doi
421 10.1166/jbn.2014.1721.

- 422 [13] Miller WH, Hartmann-Siantar C, Fisher D, et al. (2005) Evaluation of beta-absorbed
423 fractions in a mouse model for ^{90}Y , ^{188}Re , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{64}Cu , and ^{177}Lu radionuclides.
424 *Cancer Biother Radiopharm* 20:436-449. doi: 10.1089/cbr.2005.20.436.
- 425 [14] Letfullin RR, Iversen CB, George TF.(2011) Modeling nanophotothermal therapy:
426 kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold
427 nanoparticles. *Nanomedicine* 7:137-145. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.011
- 428 [15] Hall EJ and Giaccia AJ (2012) *Radiobiology for the radiologist*. Wolters Kluwer
429 Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- 430 [16] Finkel P, Frey B, Mayer F, et al. (2016) The dual role of NK cells in antitumor
431 reactions triggered by ionizing radiation in combination with hyperthermia.
432 *Oncoimmunology*. 5(6):e1101206. doi: 10.1080/2162402X.2015.1101206.
- 433 [17] Werthmüller N, Frey B, Rückert M, et al. (2016) Combination of ionising radiation
434 with hyperthermia increases the immunogenic potential of B16-F10 melanoma cells in
435 vitro and in vivo. *Int J Hyperthermia* 32:23-30. doi: 10.3109/02656736.2015.1106011.
- 436 [18] Maeda A, Wu J, Sawa T, et al. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR
437 effect in macromolecular therapeutics:a review, *J. Control Release* 65:271-284. doi:
438 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
- 439 [19] Peer AJ, Grimm MJ, Zynda ER, et al. (2010) Diverse immune mechanisms may
440 contribute to the survival benefit seen in cancer patients receiving hyperthermia.
441 *Immunol Res* 46: 137-154. doi: 10.1007/s12026-009-8115-8.
- 442 [20] Zhang Y, Li N, Suh H, et al. (2018) Nanoparticle anchoring targets immune agonists
443 to tumors enabling anti-cancer immunity without systemic toxicity. *Nat Commun* 9:6.
444 doi: 10.1038/s41467-017-02251-3.
- 445 [21] Huang X, Qian W, El-Sayed IH, et al. (2007) The potential use of the enhanced
446 nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers Surg*
447 *Med* 39:747-753. doi: 10.1002/lsm.20577.
- 448 [22] Espinosa A, Bugnet M, Radtke G, et al. (2015) Can magneto-plasmonic nanohybrids
449 efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia?. *Nanoscale* 7:18872-
450 18877. doi: 10.1039/c5nr06168g.
- 451 [23] Luna-Gutierrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, et al. (2013) A therapeutic
452 system of ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles-RGD internalized in breast cancer cells. *J*
453 *Mex Chem Soc* 57:212-219.
- 454 [24] Sabale S, Kandesar P, Jadhav V, et al. (2017) Recent developments in the synthesis,
455 properties, and biomedical applications of core/shell superparamagnetic iron oxide
456 nanoparticles with gold. *Biomater Sci* 5:2212-2225. doi: 10.1039/c7bm00723j

8. DISCUSIÓN GENERAL

Se demostró la funcionalización de las AuNPs con el péptido RGD, el péptido de internalización nuclear (NLS) y el aptámero análogo al Pegaptanib. Los análisis de espectroscopia IR-MIR, IR-FAR y RAMAN mostraron bandas características de interacción Au-S previamente reportadas (Zong et al., 2017), en las diferentes regiones de estudio (MIR: 668 cm^{-1} , 719 cm^{-1} , FAR: 149 cm^{-1} y RAMAN: 260 , 274 , 287 y 301 cm^{-1}). El análisis de los espectros revela que el principal modo de interacción entre la AuNP y las moléculas fue la reacción espontánea de la superficie de la AuNP con un tiol (cisteína) o una amina primaria N-terminal de las moléculas. El grupo tiol estabiliza la AuNP formando un modelo químico conocido como "grapa", es decir, dos grupos tiol interaccionando con tres átomos de oro (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013). Los resultados encontrados concuerdan con nanoradiofármacos basados en AuNPs previamente sintetizados (Ferro-flores *et al.*, 2015; J. Kimling *et al.*, 2006; Morales-Avila *et al.*, 2011).

El análisis de imágenes TEM de las AuNP muestran un diámetro medio de $21\text{ nm} \pm 0.104$. Debido a la conjugación de las moléculas: aptámero, NLS-RGD y DOTA-GGC a la superficie de la AuNP se observa un "halo" alrededor de la nanopartícula. Este fenómeno se atribuye a que las moléculas funcionalizadas presentan una baja densidad electrónica; provocando una interacción menor con el haz de electrones del TEM (contraste en la imagen). El diámetro hidrodinámico medio determinado por DLS para AuNP y AuNP-nanosistema fue de $24.70 \pm 0.07\text{ nm}$ y $29.99 \pm 1.90\text{ nm}$ respectivamente. El incremento en el diámetro hidrodinámico confirma la conjugación de las moléculas NLS-RGD, DOTA-GGC y el aptámero a la superficie de la AuNP. Asimismo, el AuNP-nanosistema mostró un incremento en la estabilidad coloidal en los resultados del potencial Z (AuNP = $-59 \pm 2.7\text{ mV}$ y AuNP-nanosistema = $-74 \pm 4.8\text{ mV}$), resultados similares fueron reportados por Luna-Gutiérrez y Mancilla-Jiménez (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013; Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013).

El espectro Uv-vis de las AuNPs mostró el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie característica a 519.2 nm. Se observó un cambio de color rojo a 519.5, 519.8, 521.3 y 522.3 nm en los espectros del DOTA--GGC-AuNP, DOTA-GGC-AuNP-Aptámero, DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD, DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero respectivamente. En los conjugados de AuNP se puede observar una disminución en la intensidad del pico de resonancia plasmónica de superficie, debido a cambios en el índice de refracción y medio dieléctrico (Vilchis-Juárez *et al.*, 2014).

Posteriormente a la caracterización de las AuNPs funcionalizadas con los péptidos se obtuvo exitosamente el sistema multimérico ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero. El complejo purificado por exclusión molecular presenta una pureza mayor al 95 % en los análisis por cromatografía de exclusión molecular y ultrafiltración.

Por otro lado, los ensayos *in vitro* mostraron que el sistema ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero es estable en suero humano durante 24 h (pureza radioquímica: $99 \pm 1\%$). La resonancia de plasmón de superficie de 522.3 nm característica del AuNP-nanosistema, se mantuvo estable, pero ligeramente desplazado hacia el azul (521.9 nm) como consecuencia de las interacciones de proteínas (Eder *et al.*, 2014).

Como se ha reportado previamente el ciclo RGD tiene afinidad por la integrina α (v) β (3) [20, 32]. El sistema funcionalizado ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero mostró que la concentración del péptido RGD para desplazar el 50% del ^{177}Lu -AuNP-NLS -RGD-Aptámero del receptor fue de $4.41\text{nM} \pm 0.4\text{nM}$ (IC_{50}) por lo que se puede concluir que el sistema presenta alta afinidad por la integrina α (v) β (3). La afinidad del ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero es congruente con similares resultados de afinidad en sistemas coloidales basados en AuNP-RGD y radiomarcados con ^{177}Lu (Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2015).

Mediante el ensayo de *formación de tubos en células endoteliales* (EA.hy926) se comprobó que cada uno de los nanosistemas DOTA-GGC-AuNP, DOTA-GGC-AuNPs-NLS-RGD o DOTA-GGC-AuNP-Aptámero regulan de forma negativa y con diferente intensidad los pasos clave del proceso de angiogénesis. El tratamiento con DOTA-AuNP- disminuye la migración y reorganización de las células, deteniendo el proceso de formación de túbulos. Se ha reportado que las nanopartículas de oro (AuNP) bloquean la interacción VEGF₁₆₅/VEGFR2 por lo que presentan propiedades antiangiogénicas (Lee *et al.*, 2005; Morales-Avila *et al.*, 2011).

Las células expuestas a AuNP conjugadas con NLS-RGD reducen significativamente la adhesión celular y evitan completamente la habilidad de las células endoteliales para formar túbulos incluso ante la presencia de factores proangiogénicos. Esta respuesta es debida al efecto de bloqueo que tiene el RGD con la integrina $\alpha(v)\beta(3)$ la cual juega un papel clave en la adhesión celular.

La conjugación DOTA-AuNP-aptámero (pegaptanib) actúa directamente en la inhibición del VEGF lo que incrementa el efecto antiangiogénico de las nanopartículas. El aptámero liga e inhibe con alta afinidad al VEGF₁₆₅, dicha isoforma está ampliamente ligada con el proceso de angiogénesis (Ng *et al.*, 2006).

El Sistema completo DOTA-AuNP-NLS-RGD-Aptámero, inhibe la formación de túbulos completamente. Bajo estas condiciones se inhibe la adhesión celular, migración y protección. La conjugación del aptámero y el péptido NLS-RGD en la misma molécula muestran un efecto sinérgico antiangiogénico. El efecto sinérgico de las moléculas NLS-RGD y aptámero en el sistema completo es capaz de bloquear con alta afinidad y especificidad el VEGF y las integrinas $\alpha(v)\beta(3)$ interfiriendo con el proceso de formación de túbulos.

Por otra parte, la molécula $^{177}\text{LuNP-NLS-RGD-Aptámero}$ tienen una mayor captación e internalización que la de la molécula inespecífica $^{177}\text{Lu-NP}$ y el resto de los tratamientos ($p < 0.05$). La acumulación no específica $^{177}\text{Lu-NP}$ en células de glioblastoma C6 está relacionada con el mecanismo de captación pasiva NP (Dykman & Khlebtsov, 2014). El $^{177}\text{Lu-NP-NLS-RGD-Aptámero}$ internalizado en núcleos celulares también demostró una entrada nuclear específica debido a la acción del péptido de internalización nuclear.

Dado que la línea celular C6 sobreexpresa la integrina α (v) β (3), la absorción e internalización de las moléculas NLS-RGD fue la esperada. Esto está de acuerdo con los trabajos anteriores en los que se ha informado de la afinidad de RGD con la integrina α (v) β (3) y las propiedades de internalización del NLS (Haubner & Decristoforo, 2009).

A primera vista, es difícil comprender el efecto de absorción e internalización del aptámero, porque la molécula del aptámero está cargada negativamente al igual que la membrana celular. Sin embargo se han informado diferentes vías endocíticas tomadas por AuNPs funcionalizadas con aptámeros (Zhang, Liu, Liu, Zhang, & Tan, 2013). Dichos sistemas exhiben buenas propiedades de captación celular. Además, se ha informado que la captación e internalización celular del AuNP-aptámero es mayor que la de las AuNPs sin funcionalizar (Yeom *et al.*, 2017).

El nanosistema $^{177}\text{Lu-AuNP-NLS-RGD-Aptámero}$ internalizado presenta una mayor fluorescencia que el resto de los tratamientos, lo que indica una mayor internalización de AuNPs en las células C6 (efecto sinérgico del NLS-RGD y aptámero). Esto concuerda con el resultado de la captación e internalización descrita anteriormente. La fluorescencia presente en los sistemas coloidales $^{177}\text{Lu-AuNP-NLS-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP-Aptámero}$ y $^{177}\text{Lu-AuNP-NLS-RGD-aptámero}$, una vez internalizados en las

células C6, puede atribuirse al fenómeno de emisión inducida por agregación (Goswami *et al.*, 2016; C. Zhou, Yang, Liu, Yu, & Zheng, 2013).

Posteriormente el análisis de imágenes TEM del AuNP-nanosistema después de la irradiación láser demostró que existe una reducción en el diámetro medio de las AuNPs irradiadas. La reducción en diámetro de las AuNPs puede explicarse a través del proceso múltiple (excitación multifotónica, proceso fotoeléctrico y emisión termoiónica) que tiene lugar bajo las condiciones actuales de irradiación (Hashimoto *et al.*, 2012). Investigaciones han reportado la reducción del diámetro de las AuNPs tras un proceso de irradiación láser.

Asimismo, se observó un desplazamiento de la banda de SPR hacia el azul (518,2 nm) debido a que la irradiación con láser conduce a una reordenación estérica molecular en la superficie de las AuNPs. El incremento en el parámetro de agregación del nanosistema AuNP sugiere una aglomeración de AuNP posiblemente debido a interacciones entre partículas reducidas como resultado del acoplamiento electromagnético entre las nanopartículas.

Por otra parte, la temperatura máxima alcanzada por los AuNP-nanosistemas bajo irradiación con y sin células fue de $\sim 42,5$ ° C. El calor de las AuNPs generado por el fenómeno SPR se libera de manera radiativa al medio circundante, lo que provoca un aumento de la temperatura en cada muestra. Las muestras control no mostraron un aumento significativo de la temperatura (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013).

Las células cultivadas sobre la placa, expuestas a las condiciones de irradiación descritas anteriormente y sin otro tipo de estimulación (control negativo) retienen su viabilidad celular. Sin embargo, los cultivos estimulados con los AuNP-nanosistemas y bajo irradiación indujeron una pérdida significativa de la viabilidad celular. El sistema ^{177}Lu -DOTA-AuNP-NLS-RGD-aptámero entrega de forma específica el calor

producido cerca del núcleo celular causando un mayor daño y pérdida en la viabilidad de las muestras en comparación con el resto de los tratamientos.

Por otro lado, en el ensayo de proliferación en células C6, el ^{177}Lu -AuNP-NLS-RGD-Aptámero presenta mayor captación e internalización que el resto de los tratamientos y por lo tanto se deposita una mayor dosis en las células (emisión de partículas $\beta \rightarrow ^{177}\text{Lu}$). Estudios previos han reportado el efecto terapéutico de radiofármacos marcados con ^{177}Lu y basado en AuNPs (Vilchis-Juárez *et al.*, 2014).

Finalmente, los ratones con tumores inducidos que fueron inyectados con DOTA-AuNP-NLS-RGD-Aptámero e irradiados con láser, presentan un arresto en el crecimiento del tumor durante las primeras 120 h posteriores al tratamiento, en comparación con el resto de los tratamientos. El sistema completo presenta mayor captación e internalización. Por lo tanto, el calor producido por efecto fototérmico plasmónico del sistema completo es entregado de forma localizada en el núcleo celular causando mayor daño en las células tumorales. Sin embargo, posterior a 120 h el tumor continúa su crecimiento de forma normal, lo que abre la posibilidad de modificar el plan de tratamiento.

9. CONCLUSIONES GENERALES

1. A través de análisis espectroscópicos (IR, UV-Vis, Raman), microscopia de transmisión electrónica (TEM) y cálculo de tamaño de partícula por dispersión de luz (DLS) se demostró la funcionalización de las AuNPs con las moléculas NLS-RGD, DOTA-GGC y aptámero. La principal forma de interacción entre las AuNPs y las moléculas de estudio es mediante reacción instantánea de los grupos tiol (sulfuros) formando un enlace Au-S.
2. El sistema multimérico de AuNP (DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero) se marcó exitosamente con ^{177}Lu con una alta pureza radioquímica de los nanoconjugados (>95%) sin necesidad de algún tipo de purificación posterior.
3. El conjugado ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero es estable en suero humano y presenta un reconocimiento molecular específico por la integrina α (v) β (3) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Asimismo, presenta potencial como agente antiangiogénico (inhibición del proceso de formación de túbulos vasculares *in vitro*).
4. El conjugado ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero presenta una captación e internalización celular mayor que los compuestos monoméricos y que las moléculas inespecíficas (*in vitro*). Asimismo, el sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero internalizado en las células de estudio, presenta propiedades de fluorescencia.
5. El calor generado por el fenómeno de SPR, presente en el sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero es entregado de forma localizada en las inmediaciones del núcleo celular de las células tratadas y es suficiente para

generar daño celular irreparable. Por lo tanto, el sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero presenta potencial *in vitro* e *in vivo* para terapia fototérmica plasmónica.

6. El sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero exhibe propiedades adecuadas para radioterapia molecular dirigida en tumores de glioma (C6) (*In vitro*). El depósito de energía dado por las emisiones β del ^{177}Lu se da de forma localizada en la cercanía del ADN. Asimismo, las γ emitidas permiten la obtención de imagen molecular por efecto Cerenkov *in vivo* en ratones atímicos.
7. El sistema ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-NLS-RGD-Aptámero muestra aplicación potencial en el diagnóstico médico y tratamiento terapéutico de células cancerosas debido a su combinación única de propiedades antiangiogénicas, radiactivas, ópticas y termoablativas.

10. BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abadeer, N. S., & Murphy, C. J. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 4691–4716. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>
- Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M., & Iati, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics Condensed Matter*, 29(20). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>
- Aranda-Lara, L., Ferro-Flores, G., De María Ramírez, F., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Díaz-Nieto, L., & Isaac-Olivé, K. (2016). Improved radiopharmaceutical based on^{99m}Tc-Bombesin-folate for breast tumour imaging. *Nuclear Medicine Communications*, 37(4), 377–386. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000460>
- Ballester, F., & Udías, J. M. (2008). Física Nuclear y Medicina. In *Temas de Física* (p. 8). España.
- Banerjee, S., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical Reviews*, 115(8), 2934–2974. <https://doi.org/10.1021/cr500171e>
- Berry, C. C., de la Fuente, J. M., Mullin, M., Chu, S. W. L., & Curtis, A. S. G. (2007). Nuclear localization of HIV-1 tat functionalized gold nanoparticles. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 6(4), 262–269.
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1289–1306. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2008.03.013>
- Boswell, C. A., & Brechbiel, M. W. (2005). Auger electrons: lethal, low energy, and coming soon to a tumor cell nucleus near you. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(12), 1946–1947.
- Bürgi, T. (2015). Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. *Nanoscale*, 7(38), 15553–15567. <https://doi.org/10.1039/C5NR03497C>
- Cai, Z., Yook, S., Lu, Y., Bergstrom, D., Winnik, M. A., Pignol, J. P., & Reilly, R. M. (2017). Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with¹⁷⁷Lu. *Pharmaceutical*

Research, 34(3), 579–590. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2082-2>

Carrillo-Cazares, A., Jiménez-Mancilla, N. P., Luna-Gutiérrez, M. A., Isaac-Olivé, K., & Camacho-López, M. A. (2017). Study of the Optical Properties of Functionalized Gold Nanoparticles in Different Tissues and Their Correlation with the Temperature Increase. *Journal of Nanomaterials*, 2017(3). <https://doi.org/10.1155/2017/3628970>

Cervino, A. R., Burei, M., Mansi, L., & Evangelista, L. (2013). Molecular pathways and molecular imaging in breast cancer: an update. *Nuclear Medicine and Biology*, 40(5), 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.03.002>

Chemistry Explained. (2018). Lutetium.

Cherry, S. R., Sorenson, J. A., & Phelps, M. E. (2012). *Physics in nuclear medicine*. Elsevier/Saunders.

Cornelissen, B., McLarty, K., Kersemans, V., Scollard, D. A., & Reilly, R. M. (2008). Properties of [(111)In]-labeled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates in tumor-bearing mice following intravenous or intratumoral injection. *Nuclear Medicine and Biology*, 35(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.09.007>

Costantini, D. L., Hu, M., & Reilly, R. M. (2008). Peptide motifs for insertion of radiolabeled biomolecules into cells and routing to the nucleus for cancer imaging or radiotherapeutic applications. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 23(1), 3–24. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.0430>

Couturier, O., Supiot, S., Degraef-Mougin, M., Faivre-Chauvet, A., Carlier, T., Chatal, J.-F., ... Cherel, M. (2005). Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(5), 601–614. <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1803-2>

Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, 3(2), 67–78.

Dolamic, I., Varnholt, B., & Bürgi, T. (2013). Far-infrared spectra of well-defined thiolate-protected gold clusters. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(45), 19561–19565. <https://doi.org/10.1039/c3cp53845a>

Dykman, L. A., & Khlebtsov, N. G. (2014). Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells. *Chemical Reviews*, 114(2), 1258–1288. <https://doi.org/10.1021/cr300441a>

- 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. *Prostate*, 74(6), 659–668. <https://doi.org/10.1002/pros.22784>
- Fales, A. M., Vogt, W. C., Pfefer, J., & Ilev, I. K. (2017). Quantitative Evaluation of Nanosecond Pulsed Laser-Induced Photomodification of Plasmonic Gold Nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16052-7>
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003 9:6, 9(6), 669. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C., & Melendez-Alafort, L. (2006). Third Generation Radiopharmaceuticals for Imaging and Targeted Therapy. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2(4), 339–352 (14). <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/157341206778699555>
- Ferro-flores, G., Ocampo-garcía, B. E., Santos-cuevas, C. L., María, F. De, Azorín-vega, E. P., & Meléndez-alaafort, L. (2015). Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with 177 Lu and Conjugated to Peptides, 150–159.
- Ferro-Flores, G., Ramírez, F. de M., Meléndez-Alafort, L., & Santos-Cuevas, C. L. (2010). Peptides for in vivo target-specific cancer imaging. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(1), 87–97.
- Fidler, I. J. (1970). Metastasis : Quantitative Analysis of Dis- tribution and Fate of Tumor Emboli Labeled. *Journal of the National Cancer Institute*, 45(4), 773–782.
- Finkel, P., Frey, B., Mayer, F., Bösl, K., Werthmöller, N., Mackensen, A., ... Ullrich, E. (2016). The dual role of NK cells in antitumor reactions triggered by ionizing radiation in combination with hyperthermia. *Oncology*, 5(6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1101206>
- Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- Gao, H., Yang, Z., Zhang, S., Cao, S., Shen, S., Pang, Z., & Jiang, X. (2013). Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Scientific Reports*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep02534>
- Gautier, J., Allard-Vannier, E., Hervé-Aubert, K., Soucé, M., & Chourpa, I. (2013).

- Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. *Nanotechnology*, 24(43), 432002. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/43/432002>
- Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), 1028–1032.
- Gobin, A. M., Watkins, E. M., Quevedo, E., Colvin, V. L., & West, J. L. (2010). Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 6(6), 745–752. <https://doi.org/10.1002/sml.200901557>
- González-Rubio, G., Guerrero-Martínez, A., & Liz-Marzán, L. M. (2016). Reshaping, Fragmentation, and Assembly of Gold Nanoparticles Assisted by Pulse Lasers. *Accounts of Chemical Research*, 49(4), 678–686. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00041>
- Goswami, N., Yao, Q., Luo, Z., Li, J., Chen, T., & Xie, J. (2016). Luminescent Metal Nanoclusters with Aggregation-Induced Emission. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(6), 962–975. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcl.5b02765>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2012). *Compendio de fisiología médica*. Elsevier.
- Hashimoto, S., Werner, D., & Uwada, T. (2012). Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(1), 28–54. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.001>
- Haubner, R., & Decristoforo, C. (2009). Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 872–886.
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 23(3), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>
- IARC. (2018). Global Cancer Observatory.
- Inasawa, S., Sugiyama, M., & Yamaguchi, Y. (2005). Laser-induced shape transformation of gold nanoparticles below the melting point: The effect of surface melting. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(8), 3104–3111. <https://doi.org/10.1021/jp045167j>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, I. (2015). Estadísticas a Propósito Del

- Día Mundial De La Lucha Contra El Cáncer De Mama (19 De Octubre). *Inegi*, 1-14. <https://doi.org/10.1017/S0250569X00002351>
- Iori, M., Capponi, P. C., Rubagotti, S., Esposizione, L. R., Seemann, J., Pitzschler, R., ... Asti, M. (2017). Labelling of ^{90}Y - and ^{177}Lu -DOTA-Bioconjugates for targeted radionuclide Therapy: A comparison among manual, semiautomated, and fully automated synthesis. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2017, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/8160134>
- J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and, & Plech*, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. <https://doi.org/10.1021/JP061667W>
- Jiang, K., Smith, D. A., & Pinchuk, A. (2013). Size-dependent photothermal conversion efficiencies of plasmonically heated gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(51), 27073-27080. <https://doi.org/10.1021/jp409067h>
- Jimenez-Mancilla, N., Ferro-Flores, G., Ocampo-Garcia, B., Luna-Gutierrez, M., De Maria Ramirez, F., Pedraza-Lopez, M., & Torres-Garcia, E. (2012). Multifunctional Targeted Radiotherapy System for Induced Tumours Expressing Gastrin-releasing Peptide Receptors. *Current Nanoscience*, 8(2), 193-201. <https://doi.org/10.2174/157341312800167678>
- Jiménez-Mancilla, N., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Ocampo-García, B., Luna-Gutiérrez, M., Azorín-Vega, E., ... Torres-García, E. (2013). Multifunctional targeted therapy system based on $^{99\text{m}}\text{Tc}$ / ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56(13), 663-671. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3087>
- Karagiannis, T. C. (2007). Comparison of different classes of radionuclides for potential use in radioimmunotherapy. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 10(2), 82-88.
- Kassis, A. I., & Adelstein, S. J. (2005). Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 46 Suppl 1(1 suppl), 4S-12S.
- Kodiha, M., Wang, Y. M., Hutter, E., Maysinger, D., & Stochaj, U. (2015). Off to the organelles - killing cancer cells with targeted gold nanoparticles. *Theranostics*, 5(4), 357-370. <https://doi.org/10.7150/thno.10657>
- Koi, L., Bergmann, R., Brüchner, K., Pietzsch, J., Pietzsch, H.-J., Krause, M., ... Baumann, M. (2014). Radiolabeled anti-EGFR-antibody improves local tumor control after external beam radiotherapy and offers theragnostic potential.

Radiotherapy and Oncology, 110(2), 362–369.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.12.001>

Krammer, A., Lu, H., Isralewitz, B., Schulten, K., & Vogel, V. (1999). Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1351–1356.

Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (Stanley L. (2010). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier.

Lee, J.-H., Canny, M. D., De Erkenez, A., Krilleke, D., Ng, Y.-S., Shima, D. T., ... Jucker, F. (2005). A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 18902–18907.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509069102>

Levi de Cabrejas, M. (1999). *Tomografía en Medicina Nuclear*. (C. de I. y G. de C. del ALASBIMN, Ed.). Buenos Aires: Sociedad Uruguaya de Biología y Medicina Nuclear.

Li, Z.-B., Cai, W., Cao, Q., Chen, K., Wu, Z., He, L., & Chen, X. (2007). (64)Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor alpha(v)beta(3) integrin expression. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(7), 1162–1171.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.107.039859>

Liekens, S., De Clercq, E., & Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 61(3), 253–270.

Luna-Gutiérrez, M., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B. E., Santos-Cuevas, C. L., Jiménez-Mancilla, N., León-Rodríguez, D., ... Isaac-Olivé, K. (2013). A Therapeutic System of 177 Lu-labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells Article. *J. Mex. Chem. Soc*, 57(3), 212–219.

Luna-Gutiérrez, M., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Jiménez-Mancilla, N., Morales-Avila, E., De León-Rodríguez, L., & Isaac-Olivé, K. (2012). 177Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 55(4), 140–148. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2910>

Mendoza-Nava, H., Ferro-Flores, G., De María Ramírez, F., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Azorín-Vega, E., ... Isaac-Olivé, K. (2017). Fluorescent, plasmonic, and radiotherapeutic properties of the 177Lu-dendrimer-AuNP-folate-bombesin nanoprobe located inside cancer cells. *Molecular Imaging*, 16, 1–10.

<https://doi.org/10.1177/1536012117704768>

Mendoza-Nava, H., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Serment-Guerrero, J., Santos-Cuevas, C., Jiménez-Mancilla, N., ... Camacho-López, M. A. (2013). Laser heating of gold nanospheres functionalized with octreotide: in vitro effect on HeLa cell viability. *Photomedicine and Laser Surgery*, 31(1), 17-22. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3320>

Mendoza-Nava, H., Ferro-Flores, G., Ramírez, F. D. M., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Aranda-Lara, L., ... Isaac-Olivieri, K. (2016). 177Lu-Dendrimer Conjugated to Folate and Bombesin with Gold Nanoparticles in the Dendritic Cavity: A Potential Theranostic Radiopharmaceutical. *Journal of Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1039258>

Morales-Avila, E., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B. E., De Leon-Rodríguez, L. M., Santos-Cuevas, C. L., García-Becerra, R., ... Gomez-Olivan, L. (2011). Multimeric System of Tc-99m-Labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDFK(C)] for Molecular Imaging of Tumor alpha(v)beta(3) Expression. *Bioconjugate Chemistry*, 22(5), 913-922. <https://doi.org/10.1021/bc100551s>

Moros, M., Mitchell, S. G., Grazú, V., & de la Fuente, J. M. (2013). The fate of nanocarriers as nanomedicines in vivo: important considerations and biological barriers to overcome. *Current Medicinal Chemistry*, 20(22), 2759-2778.

Mountcastle, V. B. (1997). The columnar organization of the neocortex, 120, 701-722.

Mulvaney, P. (1996). Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. <https://doi.org/10.1021/LA9502711>

Ng, E. W. M., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Guyer, D. R., & Adamis, A. P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2), 123-132. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>

Nitin, N., LaConte, L., Rhee, W. J., & Bao, G. (2009). Tat Peptide Is Capable of Importing Large Nanoparticles Across Nuclear Membrane in Digitonin Permeabilized Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 37(10), 2018-2027. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9768-0>

OMS. (2017). Cáncer.

Peeters, S., Kitz, M., Preisser, S., Wetterwald, A., Rothen-Rutishauser, B., Thalmann, G. N., ... Frenz, M. (2012). Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage. *Biomedical Optics Express*, 3(3), 435-446. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.000435>

- Petrova, H., Juste, J. P., Pastoriza-Santos, I., Hartland, G. V., Liz-Marzán, L. M., & Mulvaney, P. (2006). On the temperature stability of gold nanorods: Comparison between thermal and ultrafast laser-induced heating. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(7), 814–821. <https://doi.org/10.1039/b514644e>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Prakash, J. S., & Rajamanickam, K. (2015). Aptamers and Their Significant Role in Cancer Therapy and Diagnosis. *Biomedicines*, 3(3), 248–269. <https://doi.org/10.3390/biomedicines3030248>
- Qiao, Z., Feng, H., & Zhou, J. (2014). Molecular dynamics simulations on the melting of gold nanoparticles. *Phase Transitions*, 87(1), 59–70. <https://doi.org/10.1080/01411594.2013.798410>
- Saha, G. B. (2010). *Fundamentals of nuclear pharmacy*. Springer.
- Santos-Cuevas, C. L., Ferro-Flores, G., Rojas-Calderón, E. L., García-Becerra, R., Ordaz-Rosado, D., Arteaga de Murphy, C., & Pedraza-López, M. (2011). ^{99m}Tc-N2S2-Tat (49-57)-bombesin internalized in nuclei of prostate and breast cancer cells: kinetics, dosimetry and effect on cellular proliferation. *Nuclear Medicine Communications*, 32(4), 303–313. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e328341b27f>
- Schottelius, M., & Wester, H.-J. (2009). Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods*, 48(2), 161–177. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.012>
- Secretaría de Salud. (2016). *FARMACOPEA de los Estados Unidos Mexicanos* (3a ed.). México.
- Shi, J., Wang, F., & Liu, S. (2016). Radiolabeled cyclic RGD peptides as radiotracers for tumor imaging. *Biophysics Reports*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s41048-016-0021-8>
- Sofou, S. (2008). Radionuclide carriers for targeting of cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 181–199.
- Taniguchi, H. (2013). Los tipos de cáncer que más afectan a los mexicanos.
- Tlahuice-Flores, A., Whetten, R. L., & Jose-Yacamán, M. (2013). Vibrational normal modes of small thiolate-protected gold clusters. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(23), 12191–12198. <https://doi.org/10.1021/jp4033063>

- Tsionou, M. I., Knapp, C. E., Foley, C. A., Munteanu, C. R., Cakebread, A., Imberti, C., ... Ma, M. T. (2017). Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Advances*, 7(78), 49586–49599. <https://doi.org/10.1039/c7ra09076e>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>
- Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scopinaro, F., & De Vincentis, G. (2004). Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 19(2), 219–229. <https://doi.org/10.1089/108497804323072002>
- Verdera, S., & Gomez De Castiglia, S. (2009). *Avances en Radiofarmacia*. Colombia.
- Vilchis-Juárez, A., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B., Díaz-Nieto, L., ... Gómez-Oliván, L. (2014). Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(3), 393–404. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1721>
- Wang, G., Wu, N., Wang, J., Shao, J., Zhu, X., Lu, X., & Guo, L. (2016). Abnormal change of melting points of gold nanoparticles confined between two-layer graphene nanosheets. *RSC Advances*, 6(110), 108343–108346. <https://doi.org/10.1039/c6ra12119e>
- Werner, D., Furube, A., Okamoto, T., & Hashimoto, S. (2011). Femtosecond laser-induced size reduction of aqueous gold nanoparticles: In situ and pump-probe spectroscopy investigations revealing coulomb explosion. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(17), 8503–8512. <https://doi.org/10.1021/jp112262u>
- Wu, X., Chen, J., Wu, M., & Zhao, J. X. (2015). Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*, 5(4), 322–344. <https://doi.org/10.7150/thno.10257>
- Xiang, D., Shigdar, S., Qiao, G., Wang, T., Kouzani, A. Z., Zhou, S. F., ... Duan, W. (2015). Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: The next generation of cancer medicine. *Theranostics*, 5(1), 23–42. <https://doi.org/10.7150/thno.10202>
- Yeom, J.-H., Joo, M., Lee, B., Kim, K. P., Ha, N.-C., Park, Y., ... Lee, K. (2017). Intracellular delivery of recombinant proteins via gold nanoparticle–DNA aptamer composites is independent of the protein physicochemical properties and cell type. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 45, 5–10.

<https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2016.09.043>

Yook, S., Cai, Z., Lu, Y., Winnik, M. A., Pignol, J. P., & Reilly, R. M. (2015). Radiation Nanomedicine for EGFR-Positive Breast Cancer: Panitumumab-Modified Gold Nanoparticles Complexed to the β -Particle-Emitter, ^{177}Lu . *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), 3963–3972.

<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00425>

Yoon, H.-J., Lim, T. G., Kim, J.-H., Cho, Y. M., Kim, Y. S., Chung, U. S., ... Jang, W.-D. (2014). Fabrication of Multifunctional Layer-by-Layer Nanocapsules toward the Design of Theragnostic Nanoplatform. <https://doi.org/10.1021/BM401928F>

Zhang, J., Liu, B., Liu, H., Zhang, X., & Tan, W. (2013). Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine (London, England)*, 8(6), 983–993. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.80>

Zhou, C., Yang, S., Liu, J., Yu, M., & Zheng, J. (2013). Luminescent gold nanoparticles: a new class of nanoprobe for biomedical imaging. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 238(11), 1199–1209. <https://doi.org/10.1177/1535370213505825>

Zhou, Y., Shao, G., & Liu, S. (2012). Monitoring Breast Tumor Lung Metastasis by U-SPECT-II/CT with an Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -Targeted Radiotracer(^{99m}Tc -3P-RGD(2)). *Theranostics*, 2(6), 577–588. <https://doi.org/10.7150/thno.4443>

Zong, J., Cobb, S. L., & Cameron, N. R. (2017). Peptide-functionalized gold nanoparticles: versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications. *Biomater. Sci.*, 5, 872–886. <https://doi.org/10.1039/C7BM00006E>