



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de la eficacia terapéutica y radiotoxicidad
de los conjugados ^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK) $_2$ y ^{177}Lu -
DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] en un modelo murino
y su relación con la inhibición de los factores
angiogénicos VEGF y HIF-1 α .

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

QFB. Andrea Vilchis Juárez

Dirigido por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dr. Enrique Morales Avila

Dra. Guillermina Ferro Flores

Toluca, México, Noviembre de 2013





3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 305/2013

Toluca, México, 11 de julio de 2013

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ANDREA VILCHIS JUAREZ
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan
PRESIDENTE

Dr. Enrique Morales Avila
SECRETARIO

Dra. Blanca Eli Ocampo García
PRIMER VOCAL

Dra. Lorenza Díaz Nieto
SEGUNDO VOCAL

Dra. Clara Leticia Santos Cuevas
TERCER VOCAL

Dr. Fernando Ureña Núñez
SUPLENTE

Dra. María Dolores Hernández Navarro
SUPLENTE

FIRMA

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Horiberto Enriquez"

M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, bajo la dirección de la Dra. Guillermina Ferro Flores, en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el Instituto Nacional de Cancerología y en el Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios, con Financiamiento SEP-CONACYT (Clave de Proyecto: SEP-CB-2010-150942)

A **Dios**, gracias por la vida, gracias por poner a cada persona y cada situación en mi vida porque ellas me han hecho aprender, crecer y ser más fuerte. Gracias por todo lo que he vivido y en tus manos pongo mi futuro, ayúdame a que cada decisión que tome sea certera.

A mi pequeño **Leonel**, quien es mi logro más grande, mi mayor felicidad, mi más grande satisfacción, quien alegra cada día de mi vida con la inocencia de su sonrisa y su mirada, quien me ha enseñado la infinita capacidad que Dios nos ha dado para amar. ¡Te amo con toda mi alma y con todo mi corazón!

A **Edgar**, gracias por el apoyo que me has dado desde el día en que te conocí, gracias por compartir tu vida conmigo, este logro no es solo mío, también es tuyo, juntos llegamos aquí. ¡Te amo!

De todo corazón a mis padres, **Irma y Marco Antonio**, por el amor y apoyo que me han dado desde el día en que nací, infinitamente gracias porque sin la formación que me han dado durante toda mi vida no hubiese podido llegar aquí. Ustedes son mi mejor ejemplo. ¡Los amo!

Y por supuesto a mis hermanos **Toño, Alex y Lupita** porque están a mi lado para compartir mis logros y para ser mi apoyo cuando las cosas no van bien, gracias porque sé que siempre podré contar con ustedes y ustedes saben que siempre estaré para cuando me necesiten, así nos enseñó papá y mamá. Y recuerden que deben llegar tan o más lejos que yo, que el esfuerzo que han hecho nuestros padres rinda grandes frutos. ¡Los amo!

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar.”

Thomas Chalmers

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares donde se realizó esta investigación.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el apoyo para la obtención de ratones y a la Dra. Lorenza Díaz Nava del Laboratorio de Biología de la Reproducción por el apoyo para la realización de la PCR en Tiempo Real.

Al Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo para la obtención de imágenes SPECT/PET/CT y para la conservación de los animales en el bioterio.

Al Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios por el apoyo para la realización de los estudios histopatológicos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de formación académica otorgada durante la realización de este proyecto.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada como apoyo para tesis de posgrado.

De un modo muy especial, mi agradecimiento para mis compañeros del ININ que me apoyaron incondicionalmente en la realización de este proyecto, que me compartieron sus conocimientos, resolvieron mis dudas e hicieron que mi estancia en el ININ fuera muy grata. Gracias Blanquita, Lety, Enrique, Mir, Naye, Noé, Mau, Chava.

Por más que diga, no me alcanzarán las palabras para expresarle mi admiración y gratitud a la Dra Guille por la oportunidad que me dio para ser parte de este gran proyecto, por el tiempo que ha dedicado a mi formación, por la oportunidad de aprender y por la fortuna que he tenido de conocer no solo a una excelente y admirable profesional sino también a una persona de gran calidad humana. ¡Gracias por todo Doctora!

También quiero expresar mi agradecimiento a la QFB. Edelmira Mejía García por la oportunidad laboral que me dio en el CMI mientras estaba en la maestría ¡gracias química Ede!

Abreviaturas	10
Índice de tablas	12
CAPÍTULO I	
I. Resumen	14
II. Abstract	15
III. Introducción	16
IV. Antecedentes	19
V. Justificación	26
VI. Hipótesis	27
VII. Objetivo General	27
VIII. Objetivos Específicos	27
IX. Diseño del Experimento	28
a) Obtención de ^{177}Lu	28
b) Obtención de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$	28
<i>b.1. Síntesis de c[RGDfK(C)], método descrito por Morales Avila y cols.</i>	28
<i>b.2. Síntesis de DOTA-GGC, método descrito por Luna-Gutiérrez y cols.</i>	30
<i>b.2.1. DO3A-tris-tertBuester</i>	30
<i>b.2.2. DOTA-GGC</i>	30
<i>b.3. Síntesis de AuNPs de 20 nm, método descrito por Ocampo-García y cols.</i>	31
<i>b.3.1. Caracterización de AuNP de 20 nm</i>	31
<i>b.4. Preparación $^{177}\text{Lu-DOTA-GGC}$</i>	32
<i>b.4.1. Determinación de la pureza radioquímica de $^{177}\text{Lu-DOTA-GGC}$</i>	32
<i>b.5. Preparación de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$</i>	32
<i>b.6. Determinación de la pureza radioquímica de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$</i>	32
c) Obtención de $^{177}\text{Lu-AuNP}$	33
<i>c.1. Determinación de la pureza radioquímica de $^{177}\text{Lu-AuNP}$</i>	33
d) Obtención de $^{177}\text{Lu-RGD}$	34
<i>d.1. Determinación de la pureza radioquímica de $^{177}\text{Lu-RGD}$</i>	34
e) Caracterización	34

e.1. Microscopia de transmisión electrónica (TEM)	34
e.2. Espectroscopia Ultravioleta-Visible(UV-Vis)	34
e.3. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	35
e.4. Infrarrojo lejano	35
e.5. Espectroscopia Raman	35
f) Biodistribución y obtención del modelo biocinético	36
g) Inducción de tumores en ratones atómicos	37
g.1. Modelo murino	37
g.2. Obtención de células	37
g.3. Inducción de tumores	37
h) Grupos y controles	38
i) Régimen de dosificación	38
j) Estimación de la dosis absorbida de radiación	38
k) Evaluación de la eficacia terapéutica	40
k.1. Determinación de la captación de los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ en el tumor	40
k.2. Determinación de la actividad metabólica	40
l) Evaluación de la radiotoxicidad	41
l.1. Determinación de urea y nitrógeno ureico (BUN)	41
l.2. Determinación de creatinina	42
m) Evaluación de la inhibición de los factores angiogénicos: VEGF y HIF-1 α	42
m.1. Extracción de los tumores	42
m.2. Extracción de RNA: Método del Trizol	43
m.3. Retrotranscripción	43
m.4. Protocolos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
n) Evaluación histopatológica	46
o) Análisis Estadístico	47

CAPÍTULO II

X. Artículo científico	50
Molecular Targeting Radiotherapy with cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to ^{177}Lu -Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice.	

XI.	Conclusiones y perspectivas	62
XII.	Referencias	63
XIII.	Anexos	
	ANEXO 1. Radiocromatograma en HPLC - Fase Reversa de ^{177}Lu -DOTA-GGC	73
	ANEXO 2. Estructura ^{177}Lu -AuNP-RGD	74
	ANEXO 3. Estructura de ^{177}Lu -AuNP	75
	ANEXO 4. Estructura de ^{177}Lu -RGD	76
	ANEXO 5: Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)	77
	ANEXO 6. Espectroscopia del Infrarrojo Lejano y Espectroscopia Raman	78
	ANEXO 7A. Biodistribución de ^{177}Lu -AuNP-RGD	79
	ANEXO 7B. Biodistribución de ^{177}Lu -AuNP	80
	ANEXO 7C. Biodistribución de ^{177}Lu -RGD	81
	ANEXO 8A. Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en el tumor	82
	ANEXO 8B. Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en el bazo.	83
	ANEXO 8C. Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en el hígado.	84
	ANEXO 8D. Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en los riñones.	85
	ANEXO 9: Concentraciones relativas de VEGF, HIF-1 α y Trombospondina-1	86
	ANEXO 10. Resultados histopatológicos del riñón	87

LISTADO DE ABREVIATURAS

^{177}Lu -RGD	^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK) ₂
^{177}Lu -AuNP	^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP
^{177}Lu -AuNP-RGD	^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]
% DI	% de dosis inyectada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AQB	Agente Quelante Bifuncional
ARN	Ácido ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de oro
CEs	Células endoteliales
CT	Tomografía computarizada
DCM	Diclorometano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DNTP's	Desoxirribonucleótidos
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético
FDG	Flúor Desoxiglucosa
GGC	Glicina-Glicina-Cisteína
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INCMyNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
IT	Intratumoral
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NIR	Infrarrojo cercano
NP	Nanopartícula
PBS	Buffer de fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
p.i.	post inyección
RGD	Arginina-Glicina-Ácido aspártico
c[RGDfK(C)]	ciclo - Arginina-Glicina-Ácido aspártico-Fenilalanina-Lisina-Cisteína
RGDyK	Arginina-Glicina-Ácido aspártico-Tirosina-Lisina
RT	Retrotranscriptasa
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales
SUV	Valor estandarizado de captación
T3P	Ácido 1-propanofosfónico anhidro
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetano
TLC	Cromatografía en capa fina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Grupos y controles.	26
Tabla 2. Condiciones en el termociclador para la retrotranscripción.	32
Tabla 3. Secuencias y concentraciones de oligos.	33
Tabla 4. Protocolo de PCR, β -Actina.	33
Tabla 5. Protocolo de PCR, VEGF.	34
Tabla 6. Protocolo de PCR, HIF-1 α .	34
Tabla 7. Protocolo de PCR, Trombospondina-1.	34
Tabla 8. Condiciones del termociclador para la RCR.	35

CAPÍTULO I

La terapia de blancos moleculares se ha convertido en una estrategia relevante para el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que los receptores de péptidos pueden ser utilizados con éxito para visualización *in vivo* de los cánceres humanos, y los péptidos radiomarcados han mostrado ser eficaces en la terapia de tumores malignos.

Los péptidos basados en la secuencia cíclica Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) han sido diseñados para antagonizar la función de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ así como inhibir la angiogénesis. La conjugación del péptido RGD a nanopartículas de oro (AuNPs) radiomarcadas produce un sistema multimérico estable y biocompatible con reconocimiento molecular específico.

Este trabajo evaluó la respuesta terapéutica del radiofármaco ^{177}Lu -AuNP-RGD en ratones atímicos con tumores inducidos C6 (glioma de rata) positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$ y se comparó con los conjugados ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -RGD. Se evaluó la dosis absorbida, la progresión del tamaño del tumor, la actividad metabólica (SUV, [^{18}F]FDG micro PET/CT), la radiotoxicidad renal, las características histológicas del riñón y del tumor, así como la expresión génica tumoral del VEGF y HIF-1 α (PCR en tiempo real).

De los radiofármacos evaluados, el ^{177}Lu -AuNP-RGD produjo la mayor dosis de radiación absorbida en el tumor (63.8 ± 7.9 Gy) vs los otros tratamientos. Estos resultados concuerdan con la respuesta terapéutica, en donde el ^{177}Lu -AuNP-RGD redujo significativamente ($p < 0.05$) el tamaño del tumor, la actividad metabólica de las células de cáncer, los vasos sanguíneos intratumorales y la expresión génica del VEGF en comparación con los otros radiofármacos. Lo anterior como consecuencia de la alta retención en el tumor, combinación de la terapia molecular (sistema multimérico RGD) y radioterapia (^{177}Lu). La captación en los órganos fue mínima sin inducción de toxicidad renal. El radiofármaco ^{177}Lu -AuNP-RGD muestra propiedades adecuadas para ser usado como un agente para terapia de blancos moleculares específicos.

Molecular targeting therapy has become a relevant therapeutic strategy for cancer. The principle that peptide receptors can be used successfully for *in vivo* targeting of human cancers has been proven, and radiolabeled peptides have been demonstrated to be effective in patients with malignant tumors

Peptides based on the cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) sequence have been designed to antagonize the function of $\alpha(v)\beta(3)$ integrin, thereby inhibiting angiogenesis. The conjugation of RGD peptides to radiolabeled gold nanoparticles (AuNPs) produces biocompatible and stable multimeric systems with target-specific molecular recognition.

The aim of this research was to evaluate the therapeutic response of ^{177}Lu -AuNP-RGD in athymic mice bearing $\alpha(v)\beta(3)$ -integrin-positive C6 gliomas and compare it with that of ^{177}Lu -AuNP or ^{177}Lu -RGD. The radiation absorbed dose, metabolic activity (SUV, [^{18}F]fluor-deoxy-glucose-microPET/CT), renal radiotoxicity, renal and tumoral histological characteristics as well as tumoral VEGF and HIF-1 α gene expression (by real-time polymerase chain reaction) following treatment with ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP or ^{177}Lu -RGD were assessed.

Of the radiopharmaceuticals evaluated, ^{177}Lu -AuNP-RGD delivered the highest tumor radiation absorbed dose (63.8 ± 7.9 Gy) vs other treatments. These results correlated with the observed therapeutic response, in which ^{177}Lu -AuNP-RGD significantly ($p < 0.05$) reduced tumor progression, tumor metabolic activity, intratumoral vessels and VEGF gene expression compared to the other radiopharmaceuticals. This was consequence of high tumor retention and a combination of molecular targeting therapy (multimeric RGD system) and radiotherapy (^{177}Lu). There was a low uptake in non-target organs and no induction of renal toxicity. ^{177}Lu -AuNP-RGD demonstrate properties suitable for use as an agent for molecular targeting radiotherapy.

Un radiofármaco está definido como una sustancia que contiene átomos radiactivos dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrado en los seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos (1). Los radiofármacos de tercera generación detectan blancos moleculares específicos y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos tales como los receptores y las enzimas. Es así que un radiofármaco que detecta blancos moleculares está compuesto de tres partes: el radiometal, el agente quelante bifuncional (AQB) y el fragmento bioactivo. El AQB situado entre el radionúclido y el fragmento bioactivo, coordina fuertemente al ion metálico y se une covalentemente a la biomolécula, el fragmento bioactivo lleva al radionúclido donde está el receptor en la célula blanco (2).

El ^{177}Lu tiene características favorables para ser empleado en radioterapia debido a sus propiedades nucleares como: vida media de 6.71 días; emisión de radiación beta negativa con una energía máxima de 497 keV (78 % de abundancia) con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando y emisión de un fotón gamma de 208 keV (11 % de abundancia) apropiado para la adquisición de imágenes *in vivo* en cámara gamma-SPECT (Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales) (3).

Los análogos de péptidos reguladores son moléculas desarrolladas para orientarse específicamente a células de cáncer, estos péptidos controlan y modulan funciones de casi todos los órganos principales y los procesos metabólicos. Los receptores de péptidos reguladores están sobreexpresados en numerosos tipos de células de cáncer y son estructuras proteicas que han sido usados como blancos moleculares de péptidos marcados para localizar tumores malignos primarios y sus metástasis (4-5).

Las integrinas constituyen una super-familia de glicoproteínas heterodiméricas formadas por la unión no covalente de dos cadenas (α y β) con funciones de señalización para diversas y específicas respuestas celulares (6-9). Un ligando importante para muchas integrinas es la secuencia tripeptídica RGD (10). Las integrinas con reconocimiento de la secuencia RGD como las $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ han recibido mayor atención como marcadores terapéuticos debido a su expresión en varios tipos celulares, están sobreexpresadas en

tumores sólidos, contribuyen al crecimiento tumoral, diseminación metastásica, diferenciación de células endoteliales y en la angiogénesis (11-15).

Se ha reportado que la unión de péptidos de RGD a nanopartículas (NPs), puede incrementar las uniones multivalentes de las NPs-(RGD)_n a los receptores $\alpha_v\beta_3$, incrementando la capacidad antiangiogénica del péptido (16-18).

La acumulación de los péptidos radiomarcados en los tumores podría potenciarse si decenas o cientos de éstos se conjugan a nanopartículas de entre 5 y 20 nm para tomar ventaja del efecto de mejoramiento de la permeabilidad y retención. Por lo general en un tejido normal el espacio entre células del endotelio es de alrededor de 2 nm pero, cuando el tejido se vuelve maligno, acumula nutrientes de manera que dicho espacio puede aumentar hasta 400-600 nm; además de que deja de funcionar la depuración linfática, lo que facilita la acumulación de macromoléculas por un mecanismo pasivo. Si además la macromolécula tiene en su superficie varias moléculas radiomarcadas, con reconocimiento específico por receptores sobreexpresados en las células cancerosas, puede sumarse una acumulación del radiofármaco por un mecanismo celular activo. (19-20).

Las NPs son partículas de cualquier material que contienen de 20 a 15000 átomos con dimensiones de 100 nm o menores y con características de superficie y propiedades fisicoquímicas propias que difieren del material a macro escala (21-22). La unión de decenas o centenas de moléculas de péptido a la superficie de una NP, produce un sistema multifuncional capaz de incrementar las uniones multivalentes de la NP-biomolécula a sus receptores para la obtención de imágenes moleculares *in vivo* (22). Las AuNPs son ácidos débiles y tienden a formar enlaces de carácter covalente con bases débiles como los grupos tiol y enlaces moderadamente fuertes con los grupos amino. Los residuos de lisina y cisteína representan al único ligante con el cual las proteínas se pueden unir covalentemente a las AuNPs, para formar moléculas con actividad biológica (21).

Una propiedad importante de las AuNPs es el fenómeno de resonancia del plasmón de superficie que se manifiesta como una banda de absorción en la región visible (520 nm) cuando la frecuencia del campo electromagnético es resonante con el movimiento coherente de electrones (22-27). El plasmón de resonancia puede recorrerse a la región del infrarrojo cercano (NIR) de 800 a 1200 nm. Esto es útil porque el tejido humano es

moderadamente transparente a la luz NIR. Las NPs diseñadas para absorber en el espectro NIR generan una cantidad de calor considerable que causa destrucción celular térmica irreversible (28).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes, es un proceso que ocurre durante el crecimiento del tumor (29). Actualmente se reconoce al sistema que incluye al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y a sus receptores como los principales reguladores de las células endoteliales vasculares y de la formación de nuevos vasos sanguíneos (30). El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales, promueve la migración celular, inhibe la apoptosis, promueve la angiogénesis, la permeabilización y vasodilatación (31-32). Su inhibición resulta en la disminución de la vascularización y del crecimiento del tumor. El VEGF responde a estímulos tales como la hipoxia principalmente mediante el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (33). La disminución de oxígeno resulta en la estabilización del HIF-1, el cual estimulará la expresión de un gran número de genes, entre ellos el del VEGF, que harán posible la adaptación de las células a las condiciones de hipoxia (34-36).

En este trabajo se comparó la eficacia terapéutica del multímero $^{177}\text{Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]}$ ($^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$) contra los conjugados $^{177}\text{Lu-DOTA-GGC-AuNP}$ ($^{177}\text{Lu-AuNP}$) y $^{177}\text{Lu-DOTA-E-c(RGDfK)}_2$ ($^{177}\text{Lu-RGD}$), en donde la secuencia -RGD- es el sitio biológicamente activo, la f y la K completan el ciclo, el macrociclo DOTA corresponde al ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N',N'',N'''-tetraacético, en $^{177}\text{Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]}$ la secuencia GGC corresponde a Glicina-Glicina-Cisteína en donde el fragmento GG funciona como espaciador y la C contiene al grupo tiol activo que interacciona con las AuNPs. Se determinó la actividad metabólica de las células tumorales, crecimiento del tumor e histopatología tumoral en ratones con tumores inducidos (positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$). Así mismo se evaluó la toxicidad renal mediante la determinación sérica de urea, creatinina, nitrógeno ureico y mediante análisis histopatológicos del riñón. Se determinó la capacidad antiangiogénica del c-RGD y de las AuNPs midiendo la expresión del VEGF y HIF-1 α .

La quimioterapia tradicional empleada contra el cáncer presenta importantes limitaciones debidas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, la vida media corta de los fármacos debido a una rápida depuración *in vivo* y la aparición de mecanismos de resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales. Por lo tanto, la identificación de un sistema que permita orientar selectivamente y liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor permitirá mejorar la eficiencia terapéutica, reducir la dosis administrada así como los efectos secundarios, consecuencia de una distribución inespecífica del fármaco en el organismo.

En la década pasada se han radiomarcado muchos péptidos derivados de la secuencia RGD y han sido evaluados por reconocer específicamente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Kessler y colaboradores en 1991 (37) desarrollaron el pentapéptido ciclo-Arginina-Glicina-Ácido aspártico-D-Fenilalanina-Valina el cual mostró alta afinidad y selectividad por las integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Después de extensos estudios de la relación estructura-actividad se encontró que la incorporación de RGD en un pentapéptido cíclico incrementa significativamente la afinidad y selectividad por las integrinas $\alpha_v\beta_3$, se demostró que un aminoácido en la posición 5 no tiene impacto en la afinidad por dichos receptores (38).

El monómero c-RGDyV se marcó desde 1999 por Haubner y colaboradores (39) con ^{125}I . Este compuesto relativamente lipofílico tiene rápida eliminación en el tumor y una desfavorable excreción hepatobiliar. El resultado de la alta acumulación de actividad en el hígado y el intestino limitó su posterior aplicación. La glicosilación del péptido RGD disminuyó su lipofilicidad y consecuentemente la captación hepática (40). Posteriormente se reportó el marcado de los mismos glicopéptidos con ^{18}F (41-42).

Los péptidos con reconocimiento específico de integrinas $\alpha_v\beta_3$ más usados para el marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{18}F o ^{68}Ga son c-RGDyK y c-RGDfK, como monómero o como dímero (43-49). En estos péptidos la cadena lateral de la lisina proporciona una amina primaria para el

acoplamiento al AQB. Para mejorar la eficacia se han desarrollado sistemas multiméricos de RGD y más de 30 derivados se han marcado con ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (50-53).

Puesto que la manera natural de interacción entre las integrinas y los péptidos conteniendo RGD involucra múltiples sitios de unión, la afinidad a $\alpha_v\beta_3$ de los radiofármacos basados en RGD podría mejorarse utilizando péptidos cíclicos c-RGD multivalentes. Este concepto fue reportado por primera vez por Rajopadhye y cols. (54) y por Jansen y cols. (55) al preparar el dímero [c(RGDyK)]₂. Posteriormente se reportó que los tetrámeros [c-RGD]₄ mejoran significativamente su afinidad por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ respecto al monómero c-RGD (56-60).

Zi-Bo Li y cols., en 2007, (61) marcaron péptidos de RGD con ^{18}F para obtener imágenes con PET (Tomografía por emisión de positrones) de la expresión de integrinas. Después de una inyección intravenosa se obtuvo una captación al tumor de 2.1 ± 0.4 % DI/g (porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido) a 1 h p.i. Se encontró rápida eliminación renal y hepática en un modelo de glioblastoma subcutáneo U87MG, la estabilidad metabólica fue de 75-99 % a 1 h p.i., por lo tanto tiene buena unión al tumor, buena estabilidad metabólica y una farmacocinética favorable.

Zhaofei L. y cols., en 2011, (38) compararon 2 derivados de RGD, el DOTA-3PRGD₂ y DOTA-RGD₄ administrados intravenosamente, marcados con ^{90}Y e ^{111}In , encontrando que el tetrámero tiene mayor porcentaje de unión con respecto al monómero, sin embargo ambos causan un retardo significativo en cuanto al crecimiento del tumor y demuestran que múltiples dosis mejoran la eficacia terapéutica.

Estudios recientes han demostrado que los péptidos de RGD conjugados a AuNPs producen sistemas multiméricos biocompatibles y estables con reconocimiento molecular específico (22, 62-67). La multivalencia es un principio de diseño mediante el cual matrices organizadas amplifican la fuerza de un proceso de unión, como ejemplo la unión de péptidos multiméricos a receptores específicos en una superficie celular (68).

Una investigación *in vivo* en la que se evaluó la biodistribución de AuNPs (2 y 4 nm) tras su inyección intravenosa reveló que las AuNPs son captadas por las membranas celulares por endocitosis, no se observaron otros mecanismos no-endocíticos. Independientemente de su tamaño, las AuNPs son internalizadas principalmente por las células Kupffer en el

hígado y, en menor medida, por los macrófagos existentes en otros órganos como el bazo. Las AuNPs no parecen atravesar la barrera placentaria o la barrera hematoencefálica. Es interesante destacar que no se observa acumulación de AuNPs en órganos como el riñón, cerebro, pulmón, ovarios, placenta o hígado fetal y que las AuNPs de menor tamaño (2 nm) parecen ser eliminadas no sólo por endocitosis macrófagica, sino también por simple filtración glomerular en orina (69).

Montet y cols., en 2006, (16) reportaron que la unión de péptidos RGD a integrinas ofrece un excelente sistema para estudiar la multivalencia mediada por cambios en la afinidad que surgen cuando los péptidos, conjugados en la superficie de una NP de hierro, se une a las integrinas de la superficie de la membrana celular. La IC_{50} de una NP-RGD para la adhesión endotelial fue de 1.0 nM de NP o 20.0 nM de péptido (20 péptidos por NP) y se asoció con el fuerte efecto multivalente. La unión de péptidos RGD a la nanopartícula de hierro resultó en un incremento del tiempo de vida media del péptido en sangre de 13 a 180 min. Por lo tanto el péptido RGD conjugado a NPs de hierro puede ser un potente inhibidor de la función de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ en las células endoteliales *in vivo*.

Olmedo y cols., en 2008 (65), durante el diseño del conjugado AuNP-CLPFFD-NH₂ demostraron que la secuencia peptídica, el efecto estérico, la carga y la disposición de los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos son parámetros cruciales para considerar en el diseño de AuNPs conjugadas a péptidos para aplicaciones biomédicas.

Huang y cols., en 2008 (70), demostraron que las AuNPs emiten un intenso calor cuando son estimuladas con la frecuencia correcta de la luz láser, así un cúmulo de AuNPs pueden calentar localmente un área de mil veces su tamaño.

Xiaohua y cols., en 2007 (71), demostraron que mediante el uso de las propiedades ópticas de las AuNPs se puede aumentar la foto selectividad en la terapia fototérmica. La generación de un segundo armónico convierte los fotones del NIR en fotones visibles los cuales son absorbidos por las AuNPs y su energía es convertida en calor produciendo así la destrucción fototérmica.

Surujpaul y cols., en 2008 (66), reportaron por primera vez la unión de AuNPs a un péptido cíclico. El conjugado Tyr³-octreotido (TOC)(H-D-Phe-Cys-Tyr-Trp-Lys(Boc)-Thr-Cys-Thr(ol) [puentes disulfuro: 2-7] contiene dos cadenas laterales hidrofílica y neutra en la

sexta y última posición (2 Thr); cadenas laterales hidrofóbica, neutra y aromática en la cuarta y primera posición (Phe y Trp); y una cadena lateral hidrofílica, neutra y aromática en la posición tres (Tyr). La cadena lateral de cisteína está formando un puente disulfuro y la cadena de lisina fue protegida con Boc ya que es el sitio biológicamente activo. Los análisis de espectroscopia sugieren que las AuNPs fueron funcionalizadas con TOC mediante interacciones con la amina N-terminal de la fenilalanina y posiblemente con el grupo indol del triptófano. Como resultado de estas interacciones una banda de emisión fue observada en la región NIR a 692 nm.

Morales-Avila y cols., en 2011 (72), evaluaron el comportamiento biológico de un conjugado que tiene como objetivo la obtención de imágenes moleculares de angiogénesis tumoral, el cual es un sistema multimérico de AuNPs (20 nm) conjugado con c-[RGDfK(C)] y marcadas con ^{99m}Tc . Microscopia de transmisión electrónica (TEM) y técnicas de espectroscopia demostraron que las AuNPs fueron funcionalizadas con el péptido. La pureza radioquímica fue de $96 \pm 2 \%$. El conjugado ^{99m}Tc -AuNP-RGD mostró tener reconocimiento específico por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas en células C6 y 3 h después de una administración intraperitoneal la captación en el tumor fue de $8.18 \pm 0.57 \%$ ID/g. Las imágenes en el equipo micro-SPECT/CT mostraron evidente captación en el tumor. El radiofármaco ^{99m}Tc -AuNP-RGD mostró propiedades adecuadas para su uso como un agente específico para obtención de imágenes de blancos moleculares en tumores que sobreexpresan integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Ocampo-García y cols., en 2011 (68), desarrollaron un estuche de AuNPs marcadas con ^{99m}Tc las cuales fueron conjugadas con diferentes biomoléculas como c-[RGDfK(C)], manosa y Lys³-bombesina. Estos sistemas multiméricos tienen reconocimiento específico por las células correspondientes (células C6 de glioma de rata positivas a integrinas $\alpha_v\beta_3$, células de hígado positivas a receptores de manosa y células PC3 positivas al receptor del péptido liberador de gastrina), los estuches mostraron excelente estabilidad y propiedades adecuadas para ser usados como marcadores específicos para obtención de imágenes moleculares de tumores y detección de nodos en el ganglio centinela.

Luna Gutiérrez y cols., en 2012 (73), prepararon un sistema multimérico de ^{177}Lu marcado con AuNPs y conjugado a c-[RGDfK(C)] para comparar la dosis de radiación absorbida con la del monómero y dímero de RGD marcados con ^{177}Lu en ratones con tumores

U87MG (células de glioblastoma humano) positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$. Los resultados muestran que la dosis absorbida por actividad inyectada en los tumores fue de 0.357 ± 0.052 Gy/MBq para el multímero, 0.252 ± 0.027 Gy/MBq para el dímero y 0.102 ± 0.018 Gy/MBq para el monómero. Por lo tanto, el dímero y multímero de RGD marcados con ^{177}Lu muestran propiedades adecuadas para el tratamiento de tumores que sobreexpresan $\alpha_v\beta_3$.

En la década pasada los radionúclidos más frecuentemente usados para la terapia con péptidos con los análogos de somatostatina fueron ^{111}In , ^{90}Y y ^{177}Lu . Estos radionúclidos tienen diferentes características físicas lo cual influye en los efectos de la terapia, por ejemplo, distintas partículas son emitidas con diferentes energías resultando en varios rangos de penetración en el tejido. Dichos péptidos se han conjugado con el AQB DOTA el cual forma un complejo estable con estos tres radionúclidos (74). En los estudios preclínicos donde se ha comparado ^{90}Y y ^{177}Lu se encuentra que ^{90}Y es más eficaz para los tumores grandes mientras que para ^{177}Lu ocurrieron menos recaídas cuando se trataron pequeñas lesiones (75-76).

Por otro lado, se han desarrollado diversas terapias anticancerígenas que están dirigidas a inhibir la expresión de factores proangiogénicos. Entre ellas, un gran número de agentes que inhiben la expresión y actividad del HIF-1 α . De acuerdo con su mecanismo de acción estos inhibidores pueden ser clasificados como agentes que modulan la traducción o degradación del HIF-1 α , unión al ADN y actividad transcripcional del HIF-1 α (77-78).

El aumento de VEGF es un iniciador de la angiogénesis del tumor, mientras que la trombospondina-1 puede inhibir la actividad de VEGF evitando la proliferación celular en los focos metastásicos. Por otro lado, la hipoxia incrementa la expresión de HIF-1 quien a su vez estimula la expresión de VEGF creando un medio ambiente favorable para la angiogénesis (79).

En los años 70s, Judah Folkma hipotetizó que si el tumor requería de la angiogénesis para poder crecer más allá de 1-2 mm entonces, al inhibir la angiogénesis, el tamaño tumoral debería regresar por lo menos a un tamaño de 1-2 mm (80-81). Las estrategias antiangiogénicas se han enfocado en disminuir la proliferación de las células endoteliales, prevenir el crecimiento de los vasos e inducir la regresión de los vasos ya existentes.

Entre las principales estrategias antiangiogénicas se encuentran: 1) Anticuerpos contra el VEGF, como el avastin y pegaptinib aprobado en 2004 como inhibidores del VEGF (81); 2) Anticuerpos monoclonales anti VEGFR2 como el DC101 (82) y el Anticuerpo c-p1C11 que aún está en estudio, se ha visto que el empleo de vatalanib bloquea VEGF-1,2 y 3 sin embargo no muestra aumento sustancial benéfico con la quimioterapia convencional (83); 3) VEGFs solubles que se unen a sus ligando evitando la unión con los receptores de membrana (84); 4) moléculas que reconocen e inhiben a los receptores para detener el crecimiento tumoral al bloquear la cascada de señalización de los VEGFRs como el SU66698 que ya se ha probado en protocolos de fase II y III (81); 5) esteroides antiangiogénicos como progestina, acetato de medroxiprogesterona y glucocorticoides (85); 6) inhibidores endógenos que actúan como precursores latentes activados por la proteólisis como la angiostatina y endostatina; 7) inhibidores tisulares de metaloproteasas como BB94 y batimastat. Este último ha sido de poca eficacia y con efectos secundarios modificadores de la respuesta biológica como el interferon que estimula al sistema inmune y afecta el suministro sanguíneo (81, 86-87); 8) péptidos antiadhesivos que son anticuerpos que reconocen a la integrina $\alpha_v\beta_3$, la vitaxina ha sido evaluado en estudios de fase I y mostró estabilización e incluso regresión tumoral en más del 50% de los pacientes sin presentar efectos secundarios adversos, actualmente está en estudios de fase II en tumores sólidos (88).

Sin embargo, el dirigir estrategias contra el VEGF, aunque es el principal factor angiogénico, por sí solo no es suficiente para erradicar tumores malignos debido a que muchos factores angiogénicos además de éste, contribuyen para el cambio hacia la angiogénesis patológica (83).

El Cilengitide es un pentapéptido cíclico diseñado y sintetizado en la Universidad Técnica de Múnich en colaboración con Merck-Serono (Alemania) (89). Se basa en la secuencia cíclica RGDfV, la cual fue modificada por la *N*-metilación de un enlace peptídico dando lugar al RGDf(*N-Me*)V (90), esta estrategia produce una mayor actividad antiangiogénica de la molécula y la ciclación produce un incremento en la actividad de 100 a 1000 veces más que la referida para los péptidos lineales. El Cilengitide se une e inhibe la actividad de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ inhibiendo de este modo las interacciones célula-célula, célula-matriz así como la angiogénesis, actúa como un inhibidor muy potente de la angiogénesis e

induce la apoptosis de las células endoteliales en crecimiento a través de la inhibición de la interacción de las integrinas con sus ligandos (91, 92). La inhibición de las integrinas α_v resultó en una reducción significativa de la densidad de vasos funcionales y retraso el crecimiento del tumor y las metástasis *in vivo* (93). Recientemente se ha demostrado que las integrinas $\alpha_v\beta_5$ median la metástasis y que el tratamiento con Cilengitide en las células tumorales que expresan dichas integrinas, pero no las $\alpha_v\beta_3$, impide eficazmente la formación de metástasis (94). Se ha demostrado que las concentraciones nanomolares bajas de Cilengitide estimulan el crecimiento del tumor *in vivo* mediante la promoción de la angiogénesis mediada por VEGF (95). Sin embargo las concentraciones usadas en los ensayos clínicos son muy superiores a la concentración “pro-angiogénica” (96). Además el Cilengitide mostró un aumento en la eficiencia terapéutica cuando es combinado con radioterapia o quimioterapia (97). Actualmente se encuentra en fase clínica III para el tratamiento de glioblastomas y en fase II para el tratamiento de otros tumores (98, 99).

Desde 2006, en la población femenina de edad reproductiva, el cáncer de mama es el cáncer que produce más número de muertes en comparación con otros tumores incluido el cáncer cervicouterino. Mientras que el glioma es la neoplasia primaria más frecuente del sistema nervioso central presente en cerca del 90% en pacientes mayores de 20 años (100).

El desarrollo de radiofármacos capaces de bloquear la expresión y/o actividad de integrinas $\alpha_v\beta_3$ es de interés para disminuir el crecimiento tumoral e inhibir complejos de señalización que favorecen y permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos así como el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor.

Los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ se diseñaron para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer con sobreexpresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$, tales como el cáncer de mama y el glioblastoma.

Al determinar la actividad metabólica, el crecimiento del tumor, la radiotoxicidad renal y la inhibición de VEGF tras la inyección de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$, este proyecto comprende la fase preclínica de los radiofármacos con la finalidad de dar el paso para continuar con estudios clínicos que permitan su uso como agentes que brinden un tratamiento eficaz al paciente con cánceres que sobreexpresen integrinas $\alpha_v\beta_3$.

VI. HIPÓTESIS

La administración de los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ en un modelo murino, con tumores inducidos con células C6 de glioma de rata, disminuirá la actividad metabólica de las células tumorales así como la producción de los factores angiogénicos VEGF y HIF-1 α .

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia terapéutica y la radiotoxicidad de los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ en ratones con tumores inducidos así como determinar su correlación con la inhibición de factores involucrados en la angiogénesis como el factor VEGF y el factor HIF-1 α .

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la eficacia terapéutica mediante la determinación del tamaño del tumor, usando la relación $V = \pi/6[(L) \times (a^2)]$, así como de la actividad metabólica con imagen molecular usando PET/SPECT-CT, [^{18}F]FDG.
2. Determinar la radiotoxicidad renal mediante la cuantificación de urea, creatinina, y nitrógeno ureico.
3. Evaluar la expresión tumoral de los factores angiogénicos VEGF y HIF-1 α mediante PCR en tiempo real.

a) Obtención de ^{177}Lu

El ^{177}Lu se obtuvo de ITG (Isotope Technologies Garching GmbH) con número de lote Lu-12-016-02/120185, calibrado para el 17/02/2012, 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.

b) Obtención de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$

El ciclo c[RGDfK(C)] se sintetizó y caracterizó de acuerdo al método que describe Morales-Avila y colaboradores (72). En la secuencia DOTA-GGC el macrociclo DOTA sirve como AQB para el ^{177}Lu , la secuencia GG es un espaciador y el grupo tiol de la Cisteína forma el enlace con las AuNPs. Dicha secuencia se sintetizó y caracterizó de acuerdo al método que describe Luna-Gutiérrez y colaboradores (73). Las AuNPs en agua grado inyectable (20 ± 0.2 nm, 7×10^{11} partículas/mL) se sintetizaron y caracterizaron con el método descrito por Ocampo-García y colaboradores (68).

b.1. Síntesis de c[RGDfK(C)], método descrito por Morales Avila y cols. (72)

En la molécula c[RGDfK(C)] la secuencia -RGD- es el sitio biológicamente activo, la f y la K completan el ciclo en la estructura pentapeptídica, la C es el espaciador y contiene el grupo tiol que interacciona con la superficie de las AuNPs.

La síntesis del péptido lineal se inició con la incorporación de glicina en una resina de cloruro de o-clorotritilo (con una carga de 0.9 mmol/g) en una escala de 0.07 mmoles mezclando la resina con una solución de Fmoc-Gly-OH (20.9 mg, 0.21 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (33 μL , 0.20 mmol) en diclorometano (DCM) seco en un recipiente. Después de agitar la mezcla de reacción durante 2.5 h, se retiró y se lavó la resina con DCM, seguido de la adición de 100 μL de DIPEA en 2 mL de metanol para cubrir los sitios que no han reaccionado en la resina. Después de 30 min, la resina se lavó con dimetilformamida (DMF). Luego el grupo Fmoc se removió con una solución al 20%

de piperidina en DMF. Los aminoácidos se unieron utilizando acoplamiento de un solo paso de 3 equivalentes de ácido Fmoc-amino, 2.9 equivalentes de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) e hidroxibenzotriazol (HOBt) y 6 equivalentes de DIPEA en DMF en el siguiente orden: Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH y Fmoc-Asp (OtBu)-OH, durante 2 h. El péptido RGDfK lineal se escindió de la resina con tratamiento de 5 mL de una mezcla de ácido acético, 2,2,2-trifluoroetano (TFE) y DCM (1:1:3) durante 1 h a temperatura ambiente. La resina se lavó dos veces con 5 mL de la misma mezcla y luego tres veces con DCM. Los eluyentes se combinaron y se concentraron. El exceso de ácido acético se eliminó por adiciones repetidas de hexano al residuo y se removió en el rotavapor. La ciclación cabeza-cola se llevó a cabo por adición lenta de una solución del péptido lineal en 5 mL de DCM a una solución al 50% de ácido 1-propanofosfónico anhidro (T3P) en EtOAc (200 μ L), DIPEA (200 μ L) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (1 mg) en 5 mL de DCM. Después de agitar durante toda la noche, la mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en sílica (metanol/acetato de etilo, 1:9) para dar 75 mg (PM = 1118.39, 96%) del péptido cíclico, se obtuvo como un sólido amarillo claro. El producto anterior se disolvió en 5 mL de hidrazina al 2% en DMF y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó al vacío. El péptido precipitado se aisló por centrifugación. Para el acoplamiento de Boc-Cys (Trt)-OH se hizo reaccionar el péptido cíclico con 3 equivalentes del aminoácido, 2.9 equivalentes de HBTU y HOBt y 6 equivalentes de DIPEA en DMF. El disolvente se eliminó al vacío. El péptido precipitado se aisló por centrifugación. El acoplamiento de Boc-Cys (Trt)-OH ocurrió al hacer reaccionar el péptido cíclico con 3 equivalentes del aminoácido, 2.9 equivalentes de HBTU y HOBt y 6 equivalentes de DIPEA en DMF. El disolvente se eliminó con rotavapor y el residuo se recogió en DCM y se lavó con agua. La fase orgánica recogida se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó. El producto se purificó por cromatografía de sílica (metanol / acetato etilo, 1:9). Los grupos protectores restantes se eliminaron por agitación del péptido durante 2 h con una mezcla de 95% de TFA, 2.5% de triisopropilsilano y 2.5% de agua. El disolvente se eliminó con rotavapor y el residuo se purificó por HPLC con un gradiente de agua / acetonitrilo que contiene 0.1% TFA desde 90/10 a 10/90 en 35 min y se liofilizó, dando 14 mg de péptido c[RGDfK(C)], con un rendimiento del 28%, $t_R = 9.5$ min, $m/z = 707.36$ [M+H]⁺ (calculado 707.81).

b.2. Síntesis de DOTA-GGC, método descrito por Luna-Gutiérrez y cols. (73)

b.2.1. DO3A-tris-tertBuester: El acetato bromo tert-butil (24.52g, 0.12 mol) en N,N-dimetilacetamida (DMA) se agregó lentamente a una suspensión de DMA con ciclen (7.22g, 0.04 mol) y acetato de sodio (10.31g, 0.12 mol) bajo agitación a 0 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó por 2 días a temperatura ambiente y se observó la formación de un precipitado blanco que corresponde a la sal DO3A-tris-tertBuesterHBr. Se agregó agua (grado Milli Q) hasta su completa disolución dando lugar a una solución de color amarillo claro. El pH de la solución fue ajustado a 9.0, con NaCO₃, formando un precipitado. Luego se agregó KBr (7.25 g) y la suspensión resultante se agitó por 2 días, seguido de la adición de éter (5 ml). El sólido blanco que se obtuvo corresponde a la sal DO3A-tris-tertBu ester KBr, mientras que las otras impurezas permanecieron en la solución. El sólido se filtró y después se colocó en una solución de NaOH 3M (fase acuosa) y se extrajo con diclorometano (2x, fase orgánica) para obtener DO3A-tris-tertBu éster base libre. El extracto orgánico se secó sobre K₂CO₂ anhidro y se filtró. El solvente se evaporó en un rotavapor dando lugar a 16.42 g, fue un aceite amarillo claro (rendimiento de la reacción=76%), espectrometría de masas por ionización de electrospray [M + H]⁺m/z= 516.21 (calculado 515.70).

b.2.2. DOTA-GGC: El péptido se sintetizó sobre resina de amida MBHA (Novabiochem, Merck), con una carga de resina de 0.64 mmol/g, a una escala de 0.14 mmol. La resina se colocó en un vaso de reacción con el péptido y se disolvió en DMF. Los aminoácidos se unieron utilizando acoplamiento de un solo paso de 5 equivalentes de ácido Fmoc-amino, 4.9 equivalentes de HBTU hexafluorofosfato y HOBT, y 6 equivalentes de DIPEA en DMF en el orden Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Gly-OH por 2 horas cada uno. La remoción de Fmoc se realizó por agitación de la resina con piperidina al 20% en DMF por 30 minutos después del acoplamiento de los aminoácidos. La resina se lavó exhaustivamente con DMF después de cada paso. El progreso de la reacción se monitoreó con el ensayo de ninhidrina. Después del acoplamiento del último aminoácido la resina se trató con una solución de DMF que contenía ácido bromo acético 2 M y diisopropilcarbodiimida 3.2 M, y el acoplamiento se realizó en un horno de microondas programado para entregar una potencia al 10% (2x15s). Después de lavar la resina con DMF, el vaso de reacción se trató con DO3A-tris-tertBu ester (2.64 g, 5 mmol) y DIPEA

(0.76g mmol) en DMF, y otra vez el acoplamiento se realizó en el horno de microondas como se describió anteriormente. Una vez que termino la síntesis del péptido la resina se lavó con DFM y diclorometano, y se secó con vacío. Las perlas se trataron con TFA al 95%, triisopropilsilano al 2.5% y agua al 2.5% por 2 horas para remover la cadena lateral que protege a los grupos y al péptido de la resina. La resina se filtró y el ácido proveniente del filtrado se removió con flujo de nitrógeno. El residuo se disolvió en TFA al 0.1%, y el producto se purificó por HPLC con un gradiente de agua/acetonitrilo que contenía 0.1% de TFA desde 95/5 a 80/20 en 35 min y se liofilizó para obtener 60 mg del péptido (rendimiento de la reacción 69 %), $t_R=4.4$ min, (MALDI+) $m/z=621.12$ $[M+H]^+$ (calculado 621.68).

b.3. Síntesis de AuNP de 20 nm, método descrito por Ocampo-García y cols. (68)

La solución de nanopartículas de oro se preparó aplicando el método reportado por Turkevitch en 1951 que consiste en la reducción de ácido cloroáurico (HAuCl_4) por citrato de sodio $[\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3]$ (22,101-103). El material utilizado para la síntesis se lavó en tres etapas: agua regia (3HCl:1HNO₃, v/v), agua desionizada y finalmente agua grado inyectable y se esterilizó por calor seco, en una autoclave Felisa en instalaciones certificadas para la preparación de formulaciones farmacéuticas.

Se calentaron a ebullición 100 mL de una solución 1.7 mM de citrato de sodio trihidratado con agitación constante. Se adicionaron 0.87 mL de una solución de HAuCl_4 al 1% (m/v). Se observó un cambio en el color de la solución de amarillo claro a rojo fuerte. La solución de nanopartículas se dializó durante 24 h en membranas de celulosa Spectra/Por Float-A-Lyzer G2 (100 kD) en agua grado inyectable (5 mL por membrana). Se realizaron 2 cambios de 0.5 L cada uno. La solución dializada se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.22 μm . La solución se mantuvo a 4°C en tubos Eppendorf de 50 mL.

b.3.1. Caracterización de AuNP de 20 nm: Se realizó por microscopía de transmisión electrónica (TEM) usando un microscopio Jeol JEM 2010 HT. Las muestras se prepararon evaporando una gota de la solución dializada y esterilizada sobre una rejilla de cobre cubierta con carbono. El espectro de absorción se obtuvo en un intervalo de 400 a 700 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda-Bio usando una celda de cuarzo para monitorear el plasmón de superficie a 520 nm, para AuNPs de 20 nm respectivamente.

b.4. Preparación ^{177}Lu -DOTA-GGC

5 μL de DOTA-GGC (1 mg/mL) se diluyeron con 40 μL 1 M de buffer de acetato de pH 5, a dicha solución se adicionaron 10 μL de $^{177}\text{LuCl}_3$ (~740 MBq, > 3 TBq/mg). La mezcla se incubó a 90 °C en un baño seco durante 30 min.

b.4.1. Determinación de la pureza radioquímica de ^{177}Lu -DOTA-GGC

Se determinó la pureza radioquímica, mayor a 98 %, mediante TLC usando placas de sílica gel (soporte de aluminio, Merck); se cortaron tiras de 10 cm las cuales fueron usadas como fase estacionaria, una mezcla de hidróxido de amonio:metanol:agua (1:5:10) fue la fase móvil para determinar la cantidad libre de ^{177}Lu que tiene un $R_f = 0$ y de ^{177}Lu -DOTA-GGC con $R_f = 0.4-0.5$. La pureza radioquímica también se determinó por HPLC (Ver Anexo 1) en una columna C-18 (μ -Bondapack C-18, Waters) utilizando un sistema Waters Empower acoplado a un detector de radiactividad y un gradiente agua/acetonitrilo de 0.1 % de TFA desde 95/5 (v/v) a 20/80 (v/v) durante 35 min con un flujo de 1 mL/min, $^{177}\text{LuCl}_3$ $t_R = 3-4$ min, ^{177}Lu -DOTA-GGC $t_R = 12-13$ min.

b.5. Preparación de ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]

En un vial se incubaron durante 5 min 1 mL de AuNP de 20 nm, 0.025 mL de c[RGDfK(C)] 5 μM (108 moléculas por AuNP de 20nm) y 3 μL de ^{177}Lu -DOTA-GGC 40 MBq (0.25 μg de péptido; 1.89×10^{14} moléculas; 270 moléculas por AuNP de 20 nm). No fue necesaria la purificación adicional. El número de péptidos por AuNP se calculó por UV-Vis, la cuantificación de péptidos se hizo aumentando la concentración de AuNPs de 0 a 1 nM (Ver estructura en Anexo 2).

b.6. Determinación de la pureza radioquímica de ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]

La pureza radioquímica del conjugado ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular y ultrafiltración. 0.1 mL del conjugado se cargó en una columna PD 10 y se usó agua inyectable como eluyente. El primer pico eluido corresponde al conjugado AuNP-c[RGDfK(C)] (3-4 mL), el péptido ^{177}Lu -DOTA-GGC aparece en la fracción que eluye a 5-7 mL y el $^{177}\text{LuCl}_3$ queda

atrapado en la matriz de la columna. En la ultrafiltración (Centicron YM-30 celulosa regenerada 30,000 MW, Millipore, Bedford) el ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] queda retenido en el filtro mientras que el ^{177}Lu -DOTA-GGC y el $^{177}\text{LuCl}_3$ atraviesan el filtro. En la radio-HPLC de exclusión molecular (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, agua inyectable) el t_R para el ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] fue de 4-5 min y para el ^{177}Lu -DOTA-GGC fue de 8 min. Los perfiles cromatográficos se obtuvieron con dos sistemas de detección diferentes, un detector UV-Vis y un detector de radiación, la muestra pasó primero por el detector UV-Vis y después de 0.37 min pasó por el detector de radiación. El espectro UV-Vis muestra la banda del plasmón de superficie de AuNPs a 521 nm.

c) **Obtención de ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP (^{177}Lu -AuNP)**

3 μL de ^{177}Lu -DOTA-GGC con 40 MBq (0.25 μg de péptido; 1.89×10^{14} moléculas; 270 moléculas por AuNP de 20 nm) se mezclaron con 1 mL de AuNP de 20 nm, y la mezcla se incubó por 5 min para obtener ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP. No fue necesaria la purificación adicional. (Ver estructura en Anexo 3).

c.1. Determinación de la pureza radioquímica de ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP

Se utilizó la cromatografía de exclusión molecular, la ultrafiltración y HPLC en fase reversa como métodos de control para determinar la pureza radioquímica del radiofármaco. Una muestra de ^{177}Lu -AuNP se cargó en una columna PD-10, se utilizó agua inyectable como eluyente, el primer pico eluido corresponde a ^{177}Lu -AuNP y el $^{177}\text{LuCl}_3$ permaneció atrapado en la matriz de la columna. El método de ultrafiltración se llevó a cabo en un equipo Centicron YM-30 de celulosa regenerada a 30.000 MW de corte, Millipore, el ^{177}Lu -AuNP permaneció en el filtro, mientras que $^{177}\text{LuCl}_3$ pasó a través del filtro. En la radio-HPLC los perfiles cromatográficos se obtuvieron con dos sistemas de detección diferentes, un detector UV-Vis y un detector de radiación, el espectro UV-Vis muestra la banda del plasmón de superficie de AuNPs a 521 nm.

d) Obtención de $^{177}\text{Lu-DOTA-E-c(RGDfK)}_2$ ($^{177}\text{Lu-RGD}$)

El péptido DOTA-E-c(RGDfK)₂ se sintetizó por Peptide International Inc., con una pureza mayor al 98%, la cual fue determinada por HPLC en fase reversa y espectroscopia de masas. Una alícuota de 5 µL de DOTA-E-c(RGDfK)₂ de una concentración igual a 1 mg/mL fue diluida en 50 µL de buffer de acetato 1M pH = 5, a continuación se adicionaron 10 µL de $^{177}\text{LuCl}_3$ (~370 MBq, > 3 TBq/mg, ITG). Para obtener $^{177}\text{Lu-DOTA-E-c(RGDfK)}_2$ la mezcla se incubó a 90 °C en un baño seco durante 30 min y se diluyó con 18 mL de agua grado inyectable (Ver estructura en Anexo 4).

d.1. Determinación de la pureza radioquímica de $^{177}\text{Lu-DOTA-E-c(RGDfK)}_2$

La pureza radioquímica mayor a 98 % se verificó mediante TLC y HPLC. Para la TLC se usaron placas de sílica gel (soporte de aluminio, Merck); se cortaron tiras de 10 cm las cuales se usaron como fase estacionaria, una mezcla de hidróxido de amonio:metanol:agua (1:5:10) fue la fase móvil. La pureza radioquímica también se determinó por HPLC en una columna C-18 (µ-Bondapak C-18, Waters) utilizando un sistema Waters Empower acoplado a un detector de radiactividad y un gradiente agua/acetonitrilo de 0.1 % de TFA desde 95/5 (v/v) a 20/80 (v/v) durante 35 min con un flujo de 1 mL/min.

e) Caracterización

e.1. Microscopia de transmisión electrónica (TEM)

La morfología y la distribución de tamaño de las AuNPs y DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] se analizaron por TEM en un microscopio JEOL JEM 2010 HT operado a 200KV. Las muestras se prepararon para su análisis por evaporación de una gota del producto acuoso en una rejilla de cobre cubierta de carbón para TEM.

e.2. Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

El espectro de absorción desde 400 a 700 nm se obtuvo con un espectrómetro Lambda-Bio, Perkin-Elmer utilizando una celda de cuarzo de 1 cm .La espectroscopia UV-Vis de los

nanoconjugados se midió para monitorear el desplazamiento de la banda del plasmón de superficie de las AuNPs (520 nm).

e.3. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los espectros de XPS de AuNPs, DOTA-GGC-AuNP y AuNP-c[RGDfK(C)] se adquirieron en un espectrómetro K-Alpha Thermo Scientific Waltham equipado con fuente de rayos X de MgK_{α} (1253.6 eV). La fuente se operó a 10 kV/20 mA y se calibró con Au 4f_{7/2} (84.0 eV) y Ag 3d_{5/2} (368.2 eV) de muestras en papel aluminio. Las muestras se introdujeron en una cámara de ultra alto vacío del espectrómetro (5×10^{-9} torr) y se midieron a 24 °C (temperatura ambiente). El tamaño de la mancha en el haz fue de 100 μ m. La presión no cambio durante el análisis, y 20 exploraciones de Au 4f se realizaron con un haz de energía de paso= 0.1 eV. Las energías de enlace, hacen referencia al pico C1s a 284.3 eV. A todos los espectros se les resto un fondo Shirley para llevar a cabo el ajuste del pico con una función de suma simétrica de Gauss-Lorentz (SpecSurf software) (Ver Anexo 5).

e.4. Infrarrojo lejano

Los espectros del infrarrojo lejano de los conjugados de AuNPs se adquirieron en un espectrómetro Perkin-Elmer Waltham (espectro 400) con una plataforma de reflexión total atenuada (Diamond GLADIATOR, Pike Technologies: Madison), mediante la aplicación de reflexión total atenuada con transformada de Fourier de 200 a 300 cm^{-1} (Ver Anexo 6A).

e.5. Espectroscopia Raman

Los espectros Raman de las muestras se adquirieron en un espectrómetro MicroRaman (JOBIN-Yvon-Horiba, LABRAM HR800) con un microscopio óptico (OLYMPUS BX 41) y laser de He-Ne (632.817 nm) como fuente de excitación, con un filtro D 0.6 y una micro apertura de 100 μ m de diámetro. Sobre un cubreobjeto previamente tratado (lavados en 3 pasos: solución HNO₃:HCl (1:3 v/v), agua bidestilada y agua inyectable), se depositaron alícuotas de 10 μ L de muestra y se secaron bajo atmosfera de nitrógeno a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar (Ver Anexo 6B).

f) Biodistribución y obtención del modelo biocinético

Para los estudios biocinéticos se emplearon un total de 9 ratones machos (BALBc nu/nu) con tumores inducidos con células C6 de glioma de rata, positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$. Se tuvieron los siguientes grupos (n= 3): a) $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, b) $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y c) $^{177}\text{Lu-RGD}$. Los ratones se administraron intratumoralmente con una actividad de 2 MBq/0.05 mL. Se sacrificaron a las 3, 24, 48 y 96 horas post inyección. Los ratones se disectaron y se extrajo tumor, hígado, riñones, bazo, sangre, corazón, intestino, músculo y hueso, los cuales fueron recolectados en un tubo de plástico previamente pesado. Se determinó el peso y la actividad del órgano, en un detector de Centello tipo pozo (Canberra) con 3 alícuotas de 0.5 mL del estándar diluido ($^{177}\text{Lu-AuNP-c[RGDfK(C)]}$), 0.10 mL, ~ 2 MBq), el cual representa 100% de la dosis inyectada para obtener la actividad corregida por decaimiento. Las actividades promedio se utilizaron para obtener el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) o % ID por órgano el cual se utiliza con propósitos dosimétricos (Ver resultados de biodistribución en los Anexos 7A-7C).

Para obtener el modelo biocinético en los órganos de interés (bazo, hígado, riñón y tumor) los porcentajes de dosis inyectada a diferentes tiempos se utilizó para derivar las curvas de actividad-tiempo corregidas por decaimiento de los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ y así obtener $[q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_{\text{RT}}t}]$ que representa el comportamiento biológico en cada órgano. La función $[A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_{\text{Lu-177}}t}]$ se obtuvo integrando sobre el tiempo y considerando la vida media física del ^{177}Lu ($^{177}\text{Lu} = 6.7$ días), dando el número total de desintegraciones (N) del radionúclido en la regione fuente normalizado por unidad de actividad administra (MBq). Los datos cinéticos obtenidos se ajustaron utilizando el software OLINDA/EXM (Ver modelos biocinéticos en los Anexos 8A-8D).

$$N = \int_0^{\infty} A_0 e^{-\lambda t}(t) dt.$$

g) Inducción de tumores en ratones atómicos

g.1. Modelo murino

La inducción de los tumores y la biodistribución se realizó de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los ratones atómicos machos (BALBc nu/nu) (20-22g) se colocaron en cajas estériles con camas de aserrín estéril, con temperatura, humedad y ruido constantes y periodos de luz/obscuridad de 12/12 h. El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum* (comida estándar PMI 5001). Los estudios se aprobaron por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INCMyNSZ.

g.2. Obtención de células

Las células C6 (positivas a integrinas $\alpha_v\beta_3$ de glioma de rata) se obtuvieron originalmente de la ATCC, USA por el Instituto Nacional de Cancerología cumpliendo con todas las normas vigentes de bioseguridad para su adquisición. Las células se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 85 % de humedad, en medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10 % y antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina y 100 unidades/mL de penicilina).

g.3. Inducción de tumores

Los estudios en ratones se llevaron a cabo de acuerdo a las regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el estudio fue aprobado por el comité Institucional para la seguridad y uso de animales de laboratorio del INCMyNSZ. Los tumores fueron inducidos en la cavidad supraescapular de 20 ratones atómicos machos de entre 6 y 7 semanas de edad mediante inyección subcutánea de 1.5×10^6 células C6 de glioma de rata suspendidas en 0.2 mL de buffer de fosfato salina. Los sitios de inyección se revisaron semanalmente, se midió largo y ancho del tumor con ayuda de un vernier para determinar el tamaño tumoral.

h) Grupos y controles

Se necesitaron 20 ratones con tumores inducidos que se dividieron como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos y controles

Grupo	Tratamiento
Grupo 1: control (n=5)	Sin tratamiento
Grupo 2: tratamiento 1 (n=5)	$^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$
Grupo 3: tratamiento 2 (n=5)	$^{177}\text{Lu-AuNP}$
Grupo 4: tratamiento 3 (n=5)	$^{177}\text{Lu-RGD}$

i) Régimen de dosificación

Una vez que los tumores de los ratones llegaron a una masa de 0.05 ± 0.01 g se inició el tratamiento. Los ratones se administraron intratumoralmente bajo anestesia de isoflurano al 2%. Cada grupo se trató con cada uno de los siguientes radiofármacos: a) $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, b) $^{177}\text{Lu-AuNP}$, c) $^{177}\text{Lu-RGD}$ y se tuvo un grupo control. Todos los radiofármacos se administraron con una actividad de 2 MBq/0.05 mL. Se administraron 4 dosis de cada uno de los radiofármacos en los días 1, 7, 14 y 21 con el objetivo de administrar un total de 8 MBq al final del día 23 (el tratamiento duró 23 días debido al tamaño del tumor que alcanzaron los ratones del grupo control). El crecimiento del tumor se monitoreo semanalmente, se midió el largo y ancho con un vernier para determinar el tamaño tumoral.

j) Estimación de la dosis absorbida de radiación

La estimación de la dosis absorbida de radiación, se obtuvo con el porcentaje de dosis inyectada a diferentes tiempos en el bazo, hígado, riñones y tumores de los conjugados $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ en cada órgano. Las curvas de actividad vs tiempo fueron corregidas por decaimiento $[q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}]$ el cual representa el comportamiento biológico. Las funciones $A_h(t)$ fueron obtenidas mediante la relación $[A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_{Lu-177} t}]$ el cual se integró en cada tiempo (del día 1 al 23 del

tratamiento) , dando el número total de desintegraciones (N) del radionúclido en la región fuente normalizada por unidad de actividad administra (MBq).

$$N_{fuente} = \int_{t=día\ 1}^{t=día\ 23} A_h(t) dt$$

La actividad acumulada (N) para cada órgano (hígado, bazo, riñones y tumor) se calculó para las 4 administraciones de los 23 días de tratamiento. El número total de desintegraciones se obtuvo por la integración en cada tiempo en el que los ratones fueron administrados, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$N_{fuente} = \int_1^{23} A_h(t)dt + \int_7^{23} A_h(t)dt + \int_{14}^{23} A_h(t)dt + \int_{21}^{23} A_h(t)dt$$

La dosis absorbida en el órgano se evaluó de acuerdo al formalismo MIRD (Medical internal Radiation Dose), en donde la ecuación general es la siguiente:

$$D_{blanco \leftarrow fuente} = \sum_{fuente} N_{fuente} \times DF_{blanco \leftarrow fuente}$$

Donde: $D_{blanco \leftarrow fuente}$ es el promedio de dosis absorbida en un órgano blanco por las emisiones provenientes de un órgano fuente.

$DF_{blanco \leftarrow fuente}$ es el factor de dosis.

$$DF_{blanco \leftarrow fuente} = \sum_i \Delta_i \Phi_{i(blanco \leftarrow fuente)}$$

Donde: Δ_i es la energía promedio emitida por desintegración de varios i-tipos de radiación (i-tipos de emisiones $\sum_i n_i E_i$).

Φ_i es la fracción absorbida que dependen de las propiedades de las emisiones i-tipo y del tamaño, forma y separación de los órganos fuente y blanco.

Los valores DF se calcularon de acuerdo a Miller y colaboradores (112) utilizando las fracciones absorbidas beta en modelo de ratón calculado por dos códigos de transporte de radiación Monte Carlo, MCNP4C y PEREGRINE (basados en voxel).

k) Evaluación de la eficacia terapéutica

En el día 1, 7, 14 y 23 se midió el volumen tumoral de los grupos tratados con los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ así como el grupo control mediante la siguiente relación:

$$V = (\pi/6)[(L) \times (a^2)]$$

Donde L = diámetro mayor

a = diámetro menor

La masa del tumor se calculó en gramos considerando una densidad del tumor igual a 1 g/cm³.

k.1. Determinación de la captación de los radiofármacos $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$ en el tumor

En el día 22 de tratamiento, usando un escáner SPECT/CT (Albira, ONCOVISION) se determinó la captación en el tumor de los conjugados $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-RGD}$, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2%, la imagen fue reconstruida usando el algoritmo OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization).

k.2. Determinación de la actividad metabólica

En el día 23 se determinó la actividad metabólica de las células tumorales con un equipo micro SPECT/PET/CT (Albira, ONCOVISION). Los ratones fueron inyectados en la vena caudal con 9 MBq de [^{18}F]FDG en 100 μL de PBS bajo anestesia de isoflurano al 2%, una hora más tarde los ratones se llevaron al cuarto de escaneo y se fijaron en el equipo micro SPECT/PET/CT en posición decúbito ventral, el proceso de obtención de imágenes duró aproximadamente 7.5 minutos para cada ratón. A partir de la dosis de [^{18}F]FDG y el peso de cada ratón se determinó el SUV (Standardized Uptake Value) mediante el software PMOD Data Analysis, bajo la siguiente fórmula:

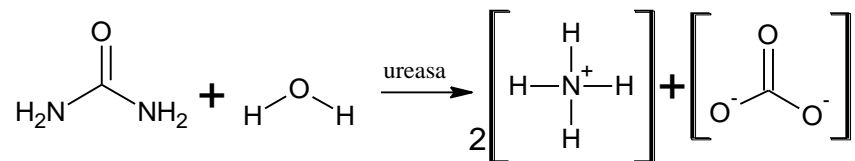
$$\text{SUV} = \frac{(\text{Bq/g})}{(\text{Actividad inyectada (Bq)/ peso del ratón (g)})}$$

1) Evaluación de la radiotoxicidad

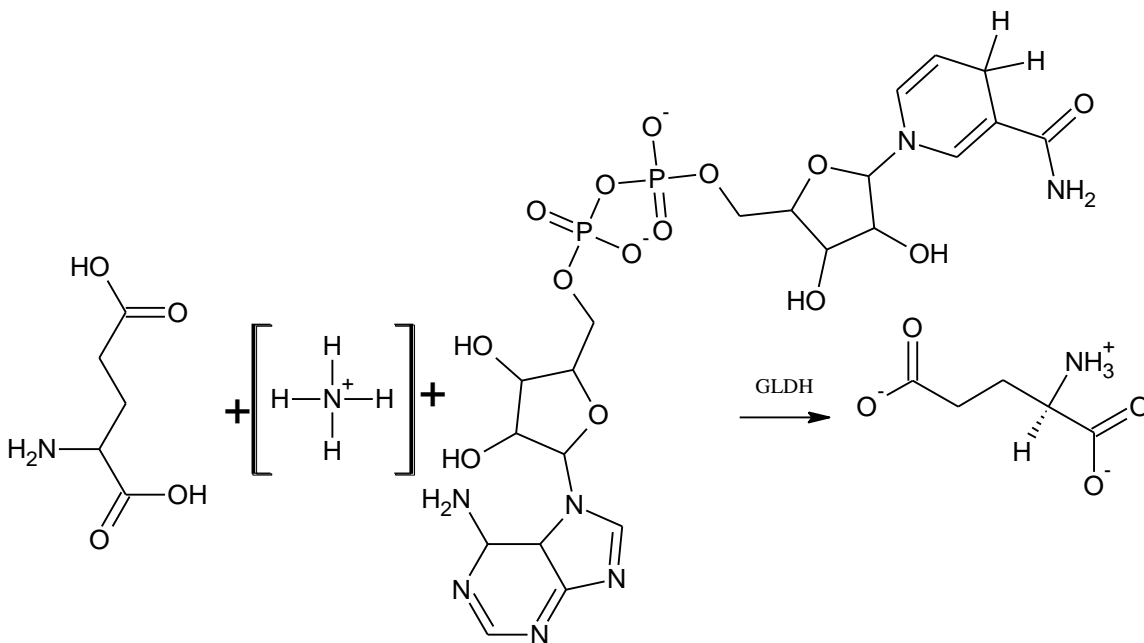
En el día 23 del tratamiento se sacrificaron los ratones, por punción cardiaca se extrajo sangre total la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para obtener el suero y determinar la concentración de los analitos urea, creatinina y nitrógeno ureico. Las determinaciones se hicieron en el analizador automatizado MODULAR ANALITICS SWA, MODULO P, HITACHI, Roche.

1.1. Determinación de urea y nitrógeno ureico (BUN)

El método enzimático que se utilizó fue una cinética de punto final, desarrollado por Talke y Schubert, que emplea el sistema urea/glutamato-deshidrogenasa (GLDH) para determinar la concentración de urea. Siguiendo el siguiente principio:



A continuación, el amoníaco formado reacciona con el α -cetoglutarato y el NADH bajo la acción de la GLDH. La reducción de la absorbancia debida al consumo del NADH se mide cinéticamente.

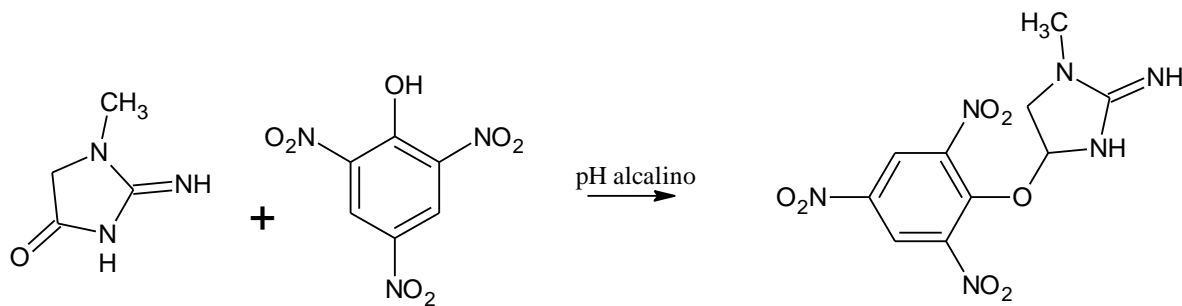


Posteriormente el analizador calcula automáticamente la concentración de nitrógeno ureico en cada muestra mediante la relación:

$$\text{mg/dL urea} \times 0.467 = \text{mg/dL de BUN}$$

1.2. Determinación de creatinina

Es una determinación enzimática que se basa en el método de Jaffé con picrato alcalino, la prueba es cinética colorimétrica y se basa en el siguiente principio:



En un medio alcalino, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina. Se lee la absorbancia a 500 nm después de 30 segundos (A_1) y después de 90 segundos (A_2). La concentración de creatinina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{(A_2 - A_1) \text{ muestra}}{(A_2 - A_1) \text{ patrón}} \times \text{Concentración del patrón} = \text{mg/dL de creatinina}$$

m) Evaluación de la inhibición de los factores angiogénicos Factor de Crecimiento: VEGF y HIF-1 α .

m.1. Extracción de los tumores

En el día 23 del experimento, los ratones se sacrificaron y se realizó la extracción del tumor el cual fue dividido en dos partes, la primera se homogeneizó en Trizol (para extracción de ARN) con una homogeneizador Polytron, BioSpect Products y las muestras se almacenaron inmediatamente a -70 °C hasta su procesamiento; y la segunda mitad se fijó en formaldehído y se usó para las pruebas histopatológicas.

m.2. Extracción de ARN: Método del Trizol

Una vez que la muestra fue conservada en Trizol, se homogeneizó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación del tejido. Al homogeneizado se adicionaron 200 μL de cloroformo para separar el ARN del resto del material celular (se mezcló). Se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min, se separó la fase superior y se depositó en otro tubo eppendorf limpio y estéril. Para precipitar el ARN, se adicionaron 500 μL isopropanol, la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 min, pasado el tiempo se mezcló en el vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 20 min. Se recuperó el botón decantando el sobrenadante, el botón se lavó adicionando 1 mL de etanol al 75 % en agua tratada con DEPC y se mezcló, se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 min y se decantó el sobrenadante, se dejó secar el botón. Una vez seco, el botón se resuspendió adicionando 100 μL de agua tratada con DEPC (la muestra se conservó a 4 °C). Para hacer la lectura, se depositaron 2 μL de la solución de ARN en el pocillo del espectrofotómetro para determinar su absorbancia a 260 nm y a 280 nm y determinar la concentración de la muestra. Se considera una muestra viable cuando la relación de absorbancia 260/280 está entre 1.5 y 2.0, se utilizó el software Take 3, espectrofotómetro Bioteck.

m.3. Retrotranscripción

En un tubo eppendorf estéril se colocaron 3 μg del ARN extraído previamente para cada muestra, 1 μL de oligo dT (5' T T T T T T T T T T T T T T 3') y cantidad suficiente para un volumen final de 15 μL de agua DEPC. Se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 min en el termociclador Veriti, Applied Biosystem y se dejó enfriar a 4 °C. A cada tubo se le adicionaron 7 μL del MIX. El MIX está compuesto por 91.3 μL de buffer 5X RT, 11 μL de inhibidor de RNAsas (40 U/ μL), 44 μL de desoxirribonucleótidos (dNTP's, 10 mM) y 7.7 μL de la enzima retrotranscriptasa (RT, 20 U/ μL). Al control negativo no se adicionó RT. Las condiciones para la retrotranscripción en el Termociclador Veriti de Applied Biosystems se muestran en la Tabla 2. El ADNc se conservó a -20 °C hasta ser usado nuevamente.

Tabla 2. Condiciones del termociclador para la retrotranscripción.

Etapas	Fases	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Preparación	Desnaturalización	65	10
	Enfriamiento	4	1
Síntesis de ADNc	Anclaje de oligoDT	55	45
	Inactivación	85	5
Enfriamiento	Enfriamiento	4	1

m.4. Protocolos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se descongeló y homogeneizó el ADNc obtenido previamente. Los oligos para VEGF, HIF-1 α y Tsp-1 (sintetizados por Invitrogen) se reconstituyeron en agua bidestilada a fin de prepararlos en una concentración de 50 μ M (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia y concentración de los oligos.

Oligo	Secuencia
Oligo upp rTrombospondina	5'-ATG GGA CAT CTG CTC TGT CA-3'
Oligo low rTrombospondina	5'-TTG CAG AGT CGG CTA CGT C-3'
Oligo upp HIF-1 α	5'-CAT GAT GGC TCC CTT TTT CA-3'
Oligo low HIF-1 α	5'-CAT AGT AGG GGC ACG GTC AC-3'
Oligo upp rVEGF	5'-CGG AGA GCA ACG TCA CTA TG-3'
Oligo low rVEGF	5'-TGG TCT GCA TTC ACA TCT GC-3'

A partir de las soluciones anteriores se prepararon alícuotas con una concentración 20 μ M se procedió a hacer la PCR-TR en el termociclador LightCycler® 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim). En la Tabla 4, 5, 6 y 7 se muestran los protocolos para la PCR de la β -Actina, VEGF, HIF-1 α y Tsp-1 respectivamente.

Tabla 4. Protocolo de PCR, β -Actina

β-Actina	Volumen para una prueba (μL)	Volumen para 20 pruebas (μL)
H ₂ O bidestilada	7.2	144
Sonda # 69	0.1	2
Oligo upp β -Actina 20 μ M	0.1	2
Oligo low β -Actina 20 μ M	0.1	2
TaqMan Master 5X	1.5	30
Volumen total	N/A	180
Volumen por capilar	N/A	9
Volumen ADNc	1	1 c/m
Volumen final por capilar	N/A	10

Tabla 5. Protocolo de PCR, VEGF

VEGF	Volumen para una prueba (μL)	Volumen para 20 pruebas (μL)
H ₂ O bidestilada	7.2	144
Sonda # 4	0.1	2
Oligo upp VEGF 20 μ M	0.1	2
Oligo low VEGF 20 μ M	0.1	2
TaqMan Master 5X	1.5	30
Volumen total	N/A	180
Volumen por capilar	N/A	9
Volumen ADNc	1	1 c/m
Volumen final por capilar	N/A	10

Tabla 6. Protocolo de PCR, HIF-1 α

HIF-1α.	Volumen para una prueba (μL)	Volumen para 20 pruebas (μL)
H ₂ O bidestilada	7.2	144
Sonda # 18	0.1	2
Oligo upp HIF-1 α 20 μ M	0.1	2
Oligo low HIF-1 α 20 μ M	0.1	2
TaqMan Master 5X	1.5	30
Volumen total	N/A	180
Volumen por capilar	N/A	9
Volumen ADNc	1	1 c/m
Volumen final por capilar	N/A	10

Tabla 7. Protocolo, PCR, Trombospondina-1.

Trombospondina-1	Volumen para una prueba (µL)	Volumen para 20 pruebas (µL)
H ₂ O bidestilada	7.2	144
Sonda # 25	0.1	2
Oligo upp Tsp-1 20 µM	0.1	2
Oligo low Tsp-1 20 µM	0.1	2
TaqMan Master 5X	1.5	30
Volumen total	N/A	180
Volumen por capilar	N/A	9
Volumen ADNc	1	1 c/m
Volumen final por capilar	N/A	10

Una vez llenos los capilares, se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 min y posteriormente se introdujeron en el termociclador Light Cycler Roche y se inició la reacción bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 8. Se calculó la concentración relativa del gen problema vs la del gen constitutivo (β -actina) mediante el software de Light Cycler Roche (Ver Anexo 9)

Tabla 8. Condiciones del termociclador para la PCR

Etapas	Fases	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación de sonda	Desnaturalización	95	10 min
PCR	Desnaturalización	95	10 s
	Alineamiento	60	30 s
	Extensión	72	1 s
	Enfriamiento	4	1min
45 Ciclos			
Longitud de onda: 530nm			

n) **Evaluación histopatológica.**

El análisis histopatológico se hizo con el propósito de evaluar la presencia de vasos sanguíneos en los tumores así como la presencia de daño renal. Las muestras de los tumores y los riñones se fijaron en una solución neutra de formaldehído al 10% durante 24 horas,

posteriormente fueron lavados con etanol al 70 % y embebidos en parafina. Se cortaron porciones de 4 μm de espesor los cuales se colocaron en un portaobjetos y se secaron en una estufa a 37 °C. Se retiró la parafina de cada uno de los cortes con xileno y se rehidrataron en alcohol para finalmente teñirlas con hematoxilina de Meyer/eosina (Ver Anexo 10).

o) Análisis Estadístico.

Las diferencias entre los grupos de tratamiento se determinaron con la prueba t-Student, la significancia fue definida como $p < 0.05$.

CAPÍTULO II

“Molecular Targeting Radiotherapy with cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to ¹⁷⁷Lu Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice”

Andrea Vilchis-Juárez, Guillermina Ferro-Flores, Clara Santos-Cuevas, Enrique Morales-Avila, Blanca Ocampo-García, Lorenza Díaz-Nieto, Myrna Luna-Gutiérrez, Nallely Jiménez-Mancilla, Martha Pedraza-López, Leobardo Gómez-Oliván

Revista: Journal of Biomedical Nanotechnology

Aceptado: el 16 de mayo de 2013

Factor de impacto: 5.256

Molecular Targeting Radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to ¹⁷⁷Lu-Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice

Andrea Vilchis-Juárez^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores^{1,*}, Clara Santos-Cuevas¹, Enrique Morales-Avila², Blanca Ocampo-García¹, Lorenza Díaz-Nieto³, Myrna Luna-Gutiérrez^{1,2}, Nallely Jiménez-Mancilla^{1,2}, Martha Pedraza-López³, and Leobardo Gómez-Oliván²

¹Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, C.P. 52750, Mexico

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

³Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., 14000, Mexico

Peptides based on the cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) sequence have been designed to antagonize the function of $\alpha(v)\beta(3)$ integrin, thereby inhibiting angiogenesis. The conjugation of RGD peptides to radiolabeled gold nanoparticles (AuNP) produces biocompatible and stable multimeric systems with target-specific molecular recognition. The aim of this research was to evaluate the therapeutic response of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD in athymic mice bearing $\alpha(v)\beta(3)$ -integrin-positive C6 gliomas and compare it with that of ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD. The radiation absorbed dose, metabolic activity (SUV, [¹⁸F]fluor-deoxy-glucose-microPET/CT), histological characteristics and VEGF gene expression (by real-time polymerase chain reaction) in tumor tissues following treatment with ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD were assessed. Of the radiopharmaceuticals evaluated, ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD delivered the highest tumor radiation absorbed dose (63.8 ± 7.9 Gy). These results correlated with the observed therapeutic response, in which ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD significantly ($p < 0.05$) induced less tumor progression, less tumor metabolic activity, fewer intratumoral vessels and less VEGF gene expression than the other radiopharmaceuticals, a consequence of high tumor retention and a combination of molecular targeting therapy (multimeric RGD system) and radiotherapy (¹⁷⁷Lu). There was a low uptake in non-target organs and no induction of renal toxicity. ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles conjugated to cyclo-RGDfK(C) demonstrate properties suitable for use as an agent for molecular targeting radiotherapy.

KEYWORDS: Radiolabeled Gold Nanospheres, RGD Peptides, Lutetium-177, Targeted Radiotherapy.

INTRODUCTION

Molecular targeting therapy has become a relevant therapeutic strategy for cancer.^{1,2} The principle that peptide receptors can be used successfully for *in vivo* targeting of human cancers has been proven, and radiolabeled peptides have been demonstrated to be effective in patients with malignant tumors.³⁻⁵ The effectiveness of targeted radiotherapy depends primarily on the absorbed-dose rate and the total absorbed dose delivered to the tumor and to normal tissues. The dose and its rate depend on the physical

properties of the radionuclide, the injected activity and the kinetics of uptake and clearance of radioactivity within the tumor and normal tissue/cells.⁶

Angiogenesis is a physiological process involving the growth of new blood vessels. Angiogenesis is a requirement for tumor growth and metastasis and is stimulated by signal proteins such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) and cell adhesion receptors, including integrins. The $\alpha(v)\beta(3)$ integrin, a transmembrane protein consisting of two noncovalently bound subunits (α and β), is over-expressed on activated endothelial cells in the tumor neovasculature and on the cell membrane of various tumor cell types such as ovarian cancer, neuroblastoma, glioblastoma, breast cancer and melanoma cells. Based on the Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide sequence a series of

*Author to whom correspondence should be addressed.
Emails: ferro_flores@yahoo.com.mx, guillermina.ferro@inin.gob.mx
Received: 20 March 2013
Accepted: 16 May 2013

small peptides have been designed to antagonize the function of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and to inhibit angiogenesis.⁷ Radiolabeled RGD peptides have been reported as radiopharmaceuticals with high affinity and selectivity for the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin; therefore, these peptides have potential for use in the early detection of rapidly growing tumors and noninvasive visualization of tumor metastasis in cancer patients.^{8–12}

Gold nanoparticles can be used to prepare multivalent pharmaceuticals.^{13–15} Recently we demonstrated that covalent conjugation of 100 molecules of cyclo-RGDfK(C) to the surface of one radiolabeled gold nanosphere (20 nm, gold-thiol bond) produces a biocompatible and stable multimeric system with target-specific molecular recognition *in vitro* and *in vivo*.^{16–19} Due to passive and active-targeting mechanisms, the radiolabeled multimeric and multivalent system exhibit higher tumor uptake than does a RGD-monomer or -dimer.^{16, 17}

Lutetium-177 (¹⁷⁷Lu) is a radionuclide with a half-life of 6.71 d, a β_{\max} emission of 0.497 MeV (78%) and γ radiation of 0.208 MeV (11%) and has been used successfully for radiotherapy with efficient cross-fire effect in cancer cells.^{3–5, 20}

If cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to ¹⁷⁷Lu-gold nanoparticles (¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD) are retained in tumors by both passive and active-targeting mechanisms, the total dose (RGD and ¹⁷⁷Lu molecules) delivered to the tumor would be significantly higher than that produced by ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD, reducing the tumor angiogenic activity and increasing the effectiveness of molecular targeting radiotherapy.

The aim of this research was to evaluate the therapeutic response of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD in athymic nude mice bearing $\alpha(v)\beta(3)$ -integrin-positive C6 gliomas and compare the radiation absorbed dose, metabolic activity, histological characteristics and VEGF gene expression in tumor tissues following treatment with ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD.

METHODS

Design and Synthesis of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)](¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD)

In the c[RGDfK(C)] molecule, the sequence-Arg-Gly-Asp(-RGD-) acts as the active biological site, the D-Phe (*f*) and Lys (*K*) residues complete the cyclic and pentapeptide structure, and Cys (*C*) is the spacer and active thiol group that interacts with the gold nanoparticle surface (Fig. 1). The c[RGDfK(C)] was synthesized and characterized according to the method described by Morales-Avila et al.¹⁶ In the DOTA-GGC (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N',N'',N'''*-tetraacetic-Gly-Gly-Cys) molecule, the GG sequence is the spacer, cysteine (active thiol group) is used to interact with the gold nanoparticle surface and DOTA is used as the lutetium-177 chelator (Fig. 1). The DOTA-GGC was synthesized and characterized

according to the method described by Luna-Gutierrez et al.¹⁷

Gold nanoparticles (AuNP) in injectable-grade water (20 ± 2 nm, 7×10^{11} particles/mL) were synthesized as described by Ocampo-García et al.¹⁹

Preparation of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC: A 5 μ L aliquot of DOTA-GGC (1 mg/mL) was diluted with 40 μ L of 1 M acetate buffer at pH 5, followed by the addition of 10 μ L of a ¹⁷⁷LuCl₃ (~ 740 MBq, > 3 TBq/mg, ITG Isotope Technologies Garching GmbH, Germany) solution. The mixture was incubated at 90 °C in a block heater for 30 min. All solutions were prepared using deionized water. A radiochemical purity of $> 98\%$ was verified by TLC silica gel plates (aluminum backing, Merck); 10-cm strips were used as the stationary phase, and ammonium hydroxide:methanol:water (1:5:10) was used as the mobile phase to determine the amount of free ¹⁷⁷Lu ($R_f = 0$) and ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC ($R_f = 0.4–0.5$). Radiochemical purity was also determined by reversed-phase HPLC on a C-18 column (μ -Bondapak C-18, Waters) using a Waters Empower system with an in-line radioactivity detector and a gradient of water/acetonitrile containing 0.1% TFA from 95/5 (v/v) to 20/80 (v/v) over 35 min at a flow rate of 1 mL/min (¹⁷⁷LuCl₃ $t_R = 3–4$ min; ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC $t_R = 12–13$ min).

Preparation of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]: To 1 mL of AuNP (20 nm), 0.025 mL of c[RGDfK(C)] (5 μ M; 108 molecules per 20 nm nanoparticle) was added, followed by 3 μ L (40 MBq) of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC (0.25 μ g of peptide; 1.89×10^{14} molecules; 270 molecules per 20 nm AuNP), and the mixture was stirred for 5 min to form the ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] system (Fig. 1). No further purification was required because we have found that the maximum number of peptides that can be bound to one AuNP (20 nm) is between 520 and 1701 depending of the peptide structure.^{16, 19} The number of peptides per nanoparticle was calculated by UV-Vis titration of peptides (8 μ M) using increasing gold nanoparticle concentration (from 0 to 1 nM).^{16, 19}

Radiochemical Purity of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD: Size-exclusion chromatography and ultrafiltration were used as radiochemical control methods for the final radiopharmaceutical solution. A 0.1 mL sample of ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] was loaded onto a PD-10 column and injectable water was used as the eluent. The first radioactive and red eluted peak (3.0–4.0 mL) corresponded to radiolabeled AuNP-c[RGDfK(C)]. The free radiolabeled peptide (¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC) appeared in the fraction that eluted at 5.0–7.0 mL, and ¹⁷⁷LuCl₃ remained trapped in the column matrix. Upon ultrafiltration (Centricron YM-30 regenerated cellulose 30,000 MW cut off, Millipore, Bedford, MA, USA), the ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)] remained in the filter, while free ¹⁷⁷Lu-DOTA-GGC and ¹⁷⁷LuCl₃ passed through the filter. In the radio-HPLC size exclusion system (ProteinPak 300SW, Waters, 1 mL/min, injectable water),

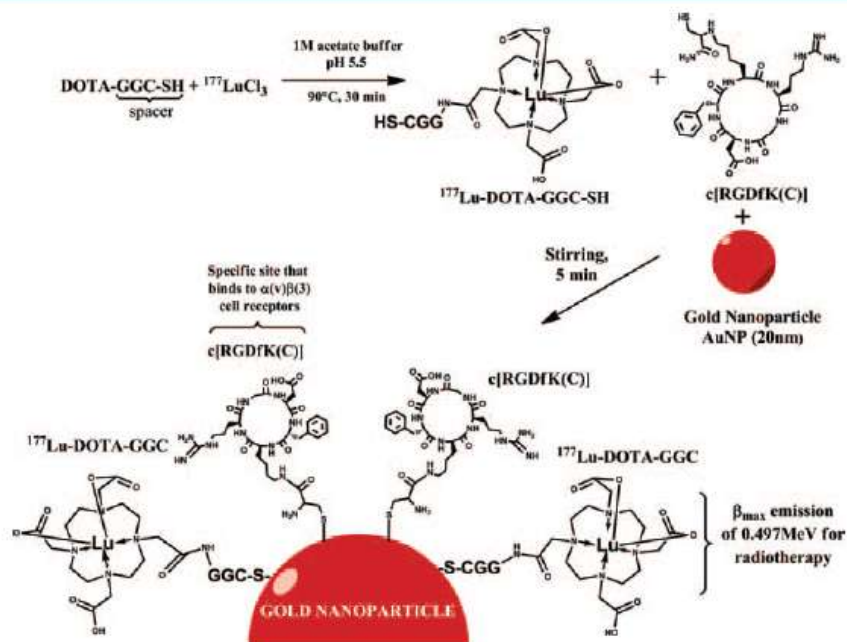


Figure 1. Overall scheme of ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDFK(C)] (^{177}Lu -AuNP-RGD) preparation.

the t_{RS} for the ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDFK(C)] and ^{177}Lu -DOTA-GGC were 4–5 and 8 min, respectively (Fig. 2). Chromatographic profiles were obtained using two different detector systems, the UV-Vis detector and a radiometric detector. The sample first passed by the UV-Vis detector (photodiode array) and after 0.37 min (0.37 mL, 1 mL/min) it passed by the radioactive detector. Correspondence of retention times of the peaks of interest in the chromatogram is commonly accepted as a

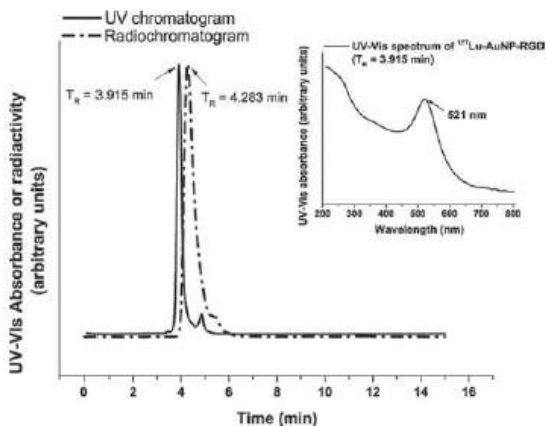


Figure 2. Size-exclusion HPLC chromatogram (520 nm; continuous line) and HPLC radiochromatogram (dotted line) of the ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP-c[RGDFK(C)] (^{177}Lu -AuNP-RGD) conjugate. UV-Vis spectrum of the compound with retention time at 3.915 min (inset).

J. Biomed. Nanotechnol. 9, 1–12, 2013

proof of the chemical identity of the radiopharmaceutical. The UV-Vis spectrum, assigned to the peak at 4–5 min using the photodiode array of the system, exhibited the AuNP surface plasmon band at 521 nm. Minor peaks corresponded to minor ^{177}Lu -AuNP-RGD-sizes. (Fig. 2).

Preparation of ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP (^{177}Lu -AuNP)

Three μL (40 MBq) of ^{177}Lu -DOTA-GGC (0.25 μg of peptide; 1.89×10^{14} molecules; 270 molecules per 20 nm AuNP) was added to 1 mL of AuNP (20 nm), and the mixture was stirred for 5 min to form the ^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP system. No further purification was performed. Radiochemical purity was evaluated as described above for ^{177}Lu -AuNP-RGD.

Chemical Characterization

The characterization of the DOTA-GGC and c[RGDFK(C)] conjugated to the gold nanoparticle surface by far infrared (FIR), UV-Vis, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Raman spectroscopy was previously reported in detail.^{16–19}

Transmission Electron Microscopy (TEM): AuNP, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -AuNP-RGD were characterized in size and shape by TEM using a JEOL JEM 2010 HT microscope operated at 200 kV. The samples were prepared for analysis by evaporating a drop of the aqueous product onto a carbon-coated TEM copper grid.

Particle size and zeta potential: AuNP, ^{177}Lu -AuNP or ^{177}Lu -AuNP-RGD were measured ($n = 5$) using

the particle size (dynamic light scattering = DLS) and Z potential Nanotracer-analyzer (Nanotracer Wave, Model MN401, Microtrac, FL, USA).

Preparation of ^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK)₂ (^{177}Lu -RGD)

DOTA-E-c(RGDfK)₂ was synthesized by Peptide International Inc. (Kentucky, USA) with a purity of > 98% as analyzed by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) and mass spectroscopy. A 5 μL aliquot of DOTA-E-c(RGDfK)₂ (1 mg/mL) was diluted with 50 μL of 1 M acetate buffer at pH 5, followed by the addition of 10 μL of the $^{177}\text{LuCl}_3$ (~370 MBq, > 3 TBq/mg, ITG Isotope Technologies Garching GmbH, Germany) solution. Each mixture was incubated at 90 °C in a block heater for 30 min and diluted to 18 mL with injectable-grade water. A radiochemical purity of > 98% was verified by TLC and HPLC as described above for ^{177}Lu -DOTA-GGC.

Cell Culture

The C6 rat cell line was originally obtained from ATCC (Atlanta, GA, USA). The cells were routinely cultured at 37 °C, with 5% CO₂ and 85% humidity in minimum essential medium eagle (MEM, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 units/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin).

Solid-Phase $\alpha(v)\beta(3)$ Binding Assay

Microtiter 96-well vinyl assay plates (Corning, NY, USA) were coated with 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of purified human integrin $\alpha(v)\beta(3)$ solution (150 ng/mL, Chemicon-Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) in coating buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ and 1 mM MnCl₂) for 17 h at 4 °C. The plates were washed twice with binding buffer (0.1% bovine serum albumin (BSA) in coating buffer). The wells were blocked for 2 h with 200 μL of blocking buffer (1% BSA in coating buffer). The plates were washed twice with binding buffer. Then, 100 μL of binding buffer containing 10 kBq of ^{177}Lu -AuNP-RGD or ^{177}Lu -RGD and appropriate dilutions of c(RGDfK) (from 10,000 nM to 0.001 nM in binding buffer, Bachem-USA) were incubated in the wells at 37 °C for 1 h. After incubation, the plates were washed three times with binding buffer. The wells were cut out and counted in a gamma counter. The IC₅₀ values of the RGD peptides were calculated by nonlinear regression analysis ($n = 5$).

In Vitro Cell Proliferation After ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD Treatments

C6 cells suspended in fresh medium were incubated in a 96-well plate at a density of 1×10^3 cells/well. The cells were cultured for 24 h at 37 °C with 5% CO₂ and 85% humidity. The growth medium was removed, and the cells

were exposed for 2 h (at 37 °C, with 5% CO₂ and 85% humidity) to one of the following treatments ($n = 6$):

- 100 μL of ^{177}Lu -AuNP-RGD (5 kBq) and 100 μL of PBS, pH 7,
- 100 μL of ^{177}Lu -AuNP (5 kBq) and 100 μL of PBS, pH 7,
- 100 μL of ^{177}Lu -RGD (5 kBq) and 100 μL of PBS, pH 7 or
- no treatment.

After 2 h, the solution in each well was removed and replaced with fresh culture medium. The cells were maintained for 3 days at 37 °C with 5% CO₂ and 85% humidity. After that, the percentage of cell proliferation in each well was evaluated by the spectrophotometric measurement of cell viability as a function of mitochondrial dehydrogenase activity, which involves the cleavage of the tetrazolium ring of XTT (sodium 3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis[4-methoxy-6-nitro]benzene sulfonic acid hydrate) in viable cells to yield orange formazan crystals that are dissolved in acidified isopropanol (XTT kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The resulting absorbance of the orange solution was measured at 480 nm in a microplate absorbance reader (EpochTM, BioTek, VT, USA). The absorbance of the untreated cells was considered as 100% of living C6 cells (or 100% proliferation).

Induction of C6 Tumors In Athymic Mice

Tumor uptake studies in mice were performed according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm 062-ZOO-1999. The study was approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals ("Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán").

Athymic male mice (20–22 g) were kept in sterile cages with bedding of wood-shavings, constant temperature, humidity, noise and 12:12 light periods. Water and feed (standard PMI 5001 feed) were given *ad libitum*.

Glioma tumors were induced by subcutaneous injection of C6 cells (1.5×10^6) suspended in 0.2 mL of phosphate-buffered saline into the upper back of twenty 6–7-week-old nude mice. Injection sites were observed at regular intervals for tumor formation and progression.

Therapeutic Protocol

Four groups ($n = 5$, total mice = 20) of athymic nude mice bearing C6 gliomas (tumor size 0.05 ± 0.01 g) were used. Each group was treated with one of the following radiopharmaceuticals: (a) ^{177}Lu -AuNP-RGD or (b) ^{177}Lu -AuNP or (c) ^{177}Lu -RGD. There was an untreated control group. All radiopharmaceuticals (four administrations of 2 MBq/0.05 mL; in the case of ^{177}Lu -AuNP-RGD and ^{177}Lu -RGD $\sim 3 \times 10^{12}$ molecules of c-RGD) were injected intratumorally in mice under 2% isoflurane anesthesia. Doses were administered at day 1, 7, 14 and 21, for a total of four doses. Tumor growth was monitored weekly, the

length (L) and width (a) were measured with calipers and the volume was determined as $V = \pi/6 * (L) \times (a^2)$. Considering a tumor density of 1 g/cm^3 , the tumor mass in grams was calculated. After 23 days, the mice were sacrificed and tumors and kidneys were dissected and prepared for histopathological or PCR studies as described below. Blood samples were also obtained for creatinine and urea quantification.

Biokinetic Studies

To evaluate biokinetics, the radiopharmaceuticals ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD were administered intratumorally in mice with induced C6 tumors (0.05 mL, ~2 MBq). Mice were sacrificed at 3, 24, 48 and 96 h post-administration ($n = 3$ at each time, total mice = 12). Whole liver, heart, spleen, lung, kidneys and tumor as well as samples of blood, intestines, bone and muscle were placed into pre-weighed plastic test tubes. The activity was determined in a well-type scintillation detector (Auto In-V-tron 4010, Nuclear Medical laboratories Inc., CA, USA) along with $3 \times 0.05 \text{ mL}$ aliquots of the standard (~2 MBq) representing 100% of the injected dose to obtain the activity corrected by decay. Mean activities were used to obtain the percentage of the injected dose per organ (%ID). The time activity curves corrected by decay [$q_h(t) = A_h(t)e^{\lambda R^t}$] (biological behavior) for ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-RGD or ¹⁷⁷Lu-AuNP were calculated using the %ID at different times.

Radiation Absorbed Dose Assessment

The $A_h(t)$ functions [$A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_{Lu-177}t}$] obtained from the biokinetics studies were integrated to obtain the total number of disintegrations (N) in the main source regions (liver, spleen, kidneys and tumor) during the entire treatment:

$$N_{\text{source}} = \int_{t=0}^{t=23 \text{ d}} A_h(t) dt + \int_{t=7 \text{ d}}^{t=23 \text{ d}} A_h(t) dt + \int_{t=14 \text{ d}}^{t=23 \text{ d}} A_h(t) dt + \int_{t=21 \text{ d}}^{t=23 \text{ d}} A_h(t) dt$$

The absorbed dose to organs was evaluated according to the general equation:

$$\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_{\text{sources}} N_{\text{source}} \times DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$$

where $\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is the mean absorbed dose to a target organ from a source organ and $DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is a dose factor:

$$DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_i \Delta_i \Phi_{i(\text{target} \leftarrow \text{source})}$$

The Δ_i terms are the mean energy emitted per disintegration for the various i -type radiations (i -type emissions, $\sum n_i E_i$). The Φ_i terms are the absorbed fractions that depend on the properties of the i -type emission and the size, shape and separation of the source and target organs.

DF values were calculated according to Miller et al.²¹ using the beta-absorbed fractions in a mouse model calculated by two Monte Carlo radiation transport codes, MCNP4C and PEREGRINE (voxel-based).

¹⁷⁷Lu-SPECT/CT Imaging

Single photon emission computed tomography (SPECT) and X-ray computed tomography (CT) images were acquired 24 h after the last injection (at 22 days of treatment) using a micro-SPECT/CT scanner (Albira, ONCOVISION, Spain) to verify the tumor uptake of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-AuNP or ¹⁷⁷Lu-RGD. Mice under 2% isoflurane anesthesia were placed in the prone position and whole body imaging was performed. The micro-SPECT field of view was 60 mm, a symmetric 20% window was set at 208 keV and pinhole collimators were used to acquire a 3D SPECT image with a total of 64 projections of 30 s, over 360°. The image dataset was then reconstructed using the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm with standard mode parameter as provided by manufacturer. CT parameters were 35 kV sure voltage, 700 μA current and 600 micro-CT projections.

Standardized Uptake Value (SUV) of [¹⁸F]FDG In Tumors with PET/CT: Tumor Metabolic Activity

[¹⁸F]FDG (2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose)-positron emission tomography (PET) and X-ray CT imaging were performed using a micro-PET/CT scanner (Albira, ONCOVISION, Spain). The images were acquired at the end of the treatments (after 23 days). The micro-PET field of view was 60 mm. Mice were injected in the lateral tail vein with 9 MBq of [¹⁸F]FDG in 100 μL PBS under 2% isoflurane anesthesia. After a resting period of 1 h the mice were transferred to the scanning room, placed in a prone position and the whole body imaging was performed. The PET acquisition time was 7.5 min. The CT parameters were those described above. From the [¹⁸F]FDG dose and weight of each mouse, the mean standardized uptake value ($n = 5$) [mean SUV = (Bq/g)/(injected activity, Bq/body weight, g)] was calculated using PMOD Data Analysis Software (PMOD technologies).

Creatinine, Urea and BUN Quantification

Blood samples obtained at the end of the treatments were used to quantify creatinine, urea and urea nitrogen (BUN) in order to evaluate kidney function because renal toxicity is the primary obstacle to radiopeptide therapy.²² Creatinine was measured titrimetrically using the conventional picrate method. Serum urea and BUN were quantified by an enzymatic *in vitro* assay using the coupled urease/glutamate dehydrogenase (GLDH) enzyme system.

Histopathological Evaluation

Tumors and kidneys samples were fixed in neutral 10% formaldehyde for 24 h, washed in 70% ethanol and

Table I. Primers and probes used in the VEGF gene expression assessment in tumor tissues by real time-PCR analysis.

Gen/Accession number	Upper primer	Lower primer	Amplicon (nt)	Probe number
β -Actin/NM_031144.2	tgcctagacttcgagcaag	ggcagctcatagctctctcc	72	69
VEGF/AY702972.1	cggagagcaacgtcactatg	tggtctgcattcacactctgc	104	4

Note: *From the universal probe library (Roche).

embedded in paraffin. Sections of 4 μ m thickness were placed on slides and dried in an oven at 37 °C. Sections were dewaxed in xylene, rehydrated in a series of graded alcohols, and finally stained with Meyer's hematoxylin/eosin and coverslipped.

Evaluation of VEGF Expression In Tumors by Real-Time PCR

All the oligonucleotides for real-time polymerase chain reaction (qPCR) assays were obtained from Invitrogen (CA, USA). The TaqMan Master reaction, TaqMan probes, capillaries and the reverse transcription (RT) system were from Roche (Roche Applied Science, IN, USA).

Excised tumors were homogenized in 1 mL of Trizol reagent with a Polytron homogenizer (BioSpec Products, Inc.). Total RNA was then extracted following the manufacturer's instructions. Three μ g of total RNA was reverse transcribed with the Transcriptor RT system. Real-time PCR was performed with the LightCycler[®] 2.0 from Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 45 amplification cycles consisting of 10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 1 s at 72 °C. Primers sequences, corresponding probe numbers and the sizes of the resulting amplicons are given in Table I. Gene expression of the housekeeping gene β -actin was used as an internal control and the results were expressed as a relative concentration (RC) of β -actin expression.

Statistical Analysis

Differences between the treatment groups were evaluated with Student's *t*-test. (Significance was defined as $p < 0.05$.)

RESULTS

Chemical Characterization and In Vitro Evaluation

¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-RGD and ¹⁷⁷Lu-AuNP were obtained with radiochemical purities of > 92%. The TEM images of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD and ¹⁷⁷Lu-AuNP showed monodisperse solutions (Fig. 3). The increase in the hydrodynamic diameter of the particle by the peptide conjugation-effect was observed by TEM as a low electronic density around the gold nanoparticle due to the poor interaction of the electron beam with the peptide molecules (low electron density), in contrast to the strong scattering

of the electron beam when it interacted with the metallic nanoparticles (Fig. 3). The average particle hydrodynamic diameters determined by DLS were 26.6 ± 8.7 nm, 25.6 ± 9.4 nm and 23.8 ± 7.6 nm for ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, ¹⁷⁷Lu-AuNP and AuNP, respectively (Fig. 3). The Z potential of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD was -64.6 ± 2.8 mV and that of ¹⁷⁷Lu-AuNP was -56.9 ± 3.1 mV, versus -22.2 ± 1.7 mV for the AuNP, indicating that the peptide functionalization (both, DOTA-GGC and c[RGDfK(C)]) conferred a high colloidal stability to the nanosystem.²³

The *in vitro* affinity, which was determined by a competitive binding assay, indicated that the concentration of c[RGDfK] required to displace 50% of the ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD ($IC_{50} = 10.2 \pm 1.1$ nM) or ¹⁷⁷Lu-RGD ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.4$ nM) from the receptor was the same order of magnitude for both, demonstrating a high *in vitro* affinity for the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin for both conjugates. However, the amount of c[RGDfK] required to displace ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD from the $\alpha(v)\beta(3)$ protein was twice of that necessary to displace ¹⁷⁷Lu-RGD, which may be attributed to the multivalent effect of the AuNP system.^{8,9,24}

As shown in Figure 4, ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD significantly inhibited C6 cell proliferation ($3.62 \pm 1.07\%$) with respect to that of ¹⁷⁷Lu-AuNP ($6.32 \pm 1.16\%$) and ¹⁷⁷Lu-RGD ($29.67 \pm 2.82\%$), which was also attributed to the greater *in vitro* C6 cell internalization as a result of multivalency.

Bioinertics, Radiation Absorbed Dose and Therapeutic Response

After each of the four intratumoral administrations, the mean tumor uptakes 3 h post injection were $68.1 \pm 7.1\%$ ID (¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD), $48.2 \pm 5.5\%$ ID (¹⁷⁷Lu-AuNP) and $26.8 \pm 2.9\%$ ID (¹⁷⁷Lu-RGD), with a high tumor retention for the radiolabeled nanoparticles. The tumor retention of ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD at 96 h ($34.7 \pm 4.3\%$ ID) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of ¹⁷⁷Lu-AuNP ($15.5 \pm 1.7\%$ ID), whereas ¹⁷⁷Lu-RGD exhibited the highest tumor clearance ($5.7 \pm 0.8\%$ ID). Uptake occurred mainly in the kidneys and liver, as well as in the spleen, with negligible uptake in other organs. The mean tumor residence times were 61.6 ± 5.8 h (¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD), 38.7 ± 4.1 h (¹⁷⁷Lu-AuNP) and 17.3 ± 2.4 h (¹⁷⁷Lu-RGD), while the mean kidney residence times were 0.88 ± 0.11 h (¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD), 0.72 ± 0.10 h (¹⁷⁷Lu-AuNP) and 1.20 ± 0.24 h (¹⁷⁷Lu-RGD). Figure 5 shows the total radiation absorbed doses to the kidney, liver and spleen that were received during the different treatment protocols. The kidneys are the major dose-limiting

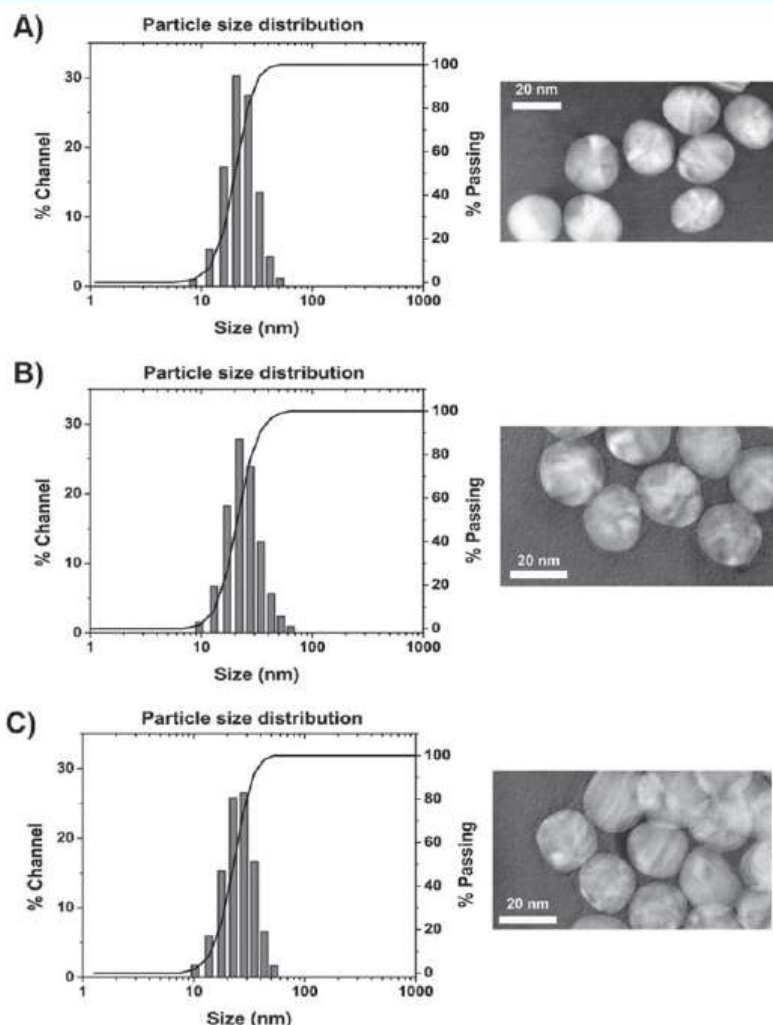


Figure 3. TEM image and size distribution of (A) AuNP, (B) ^{177}Lu -AuNP and (C) ^{177}Lu -AuNP-RGD.

organ because of the tubular re-absorption and retention of radioactivity, which may lead to radiation nephropathy.^{22, 25} The maximum tolerated dose to the kidneys is 25–30 Gy and the dose in our study was less than 1.5 Gy in the three ^{177}Lu treatments.²²

The tumor size progression for all ^{177}Lu -conjugates was significantly lower ($p < 0.05$) after 23 days with respect to that of the control group (Fig. 6). At 23 days, tumor size in the ^{177}Lu -AuNP-RGD group was 27 times smaller than that of the controls and twelve-fold and three-fold smaller than in the ^{177}Lu -RGD and ^{177}Lu -AuNP groups, respectively (Fig. 6). These tumor size data correlate with the doses delivered to the tumor in the following order: ^{177}Lu -AuNP-RGD (63.8 ± 7.9 Gy), ^{177}Lu -AuNP (38.3 ± 4.2 Gy) and ^{177}Lu -RGD (16.6 ± 1.3 Gy) (Fig. 6). The experimental protocol was completed at 23 days because the control

mice presented tumor sizes as large as 3 g, therefore, sacrifice was necessary.

Figure 7 shows the ^{177}Lu -micro-SPECT/CT images at 24 h after the last injection (at 22 days of treatment), in which the differences in tumor sizes and radiopharmaceutical accumulation in cancer tissues as well as the negligible uptake in non-target organs are visible. The tumor area in which no radioactivity is observed is necrotic tissue. It is important to mention that in advanced stages, the histopathological features of glioma are extensive necrotic foci surrounded by tumor cells, while in less-advanced neoplasms the necrosis occurs sparsely. Because ^{177}Lu -AuNP-RGD induced less tumor progression than the other radiopharmaceuticals, its tumor uptake in the micro-SPECT/CT image was more homogeneous indicating less necrosis.

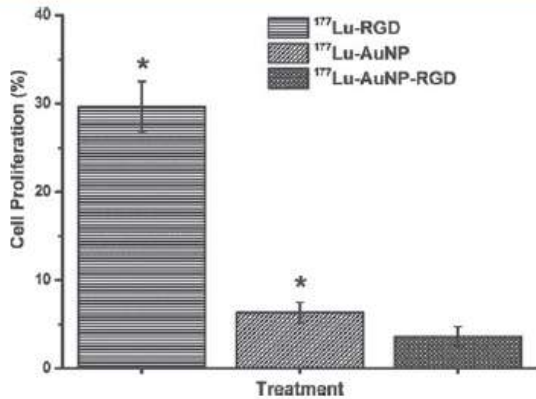


Figure 4. Effect of the ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD on *in vitro* C6 cell proliferation. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) versus ^{177}Lu -AuNP-RGD.

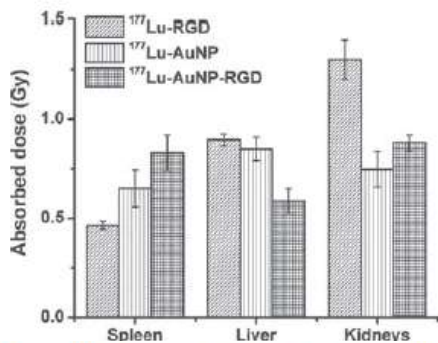


Figure 5. Radiation absorbed doses of ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD to the spleen, liver and kidney induced in mice after 23 days of treatment.

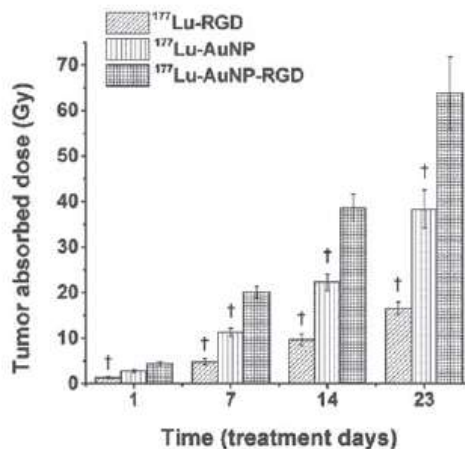
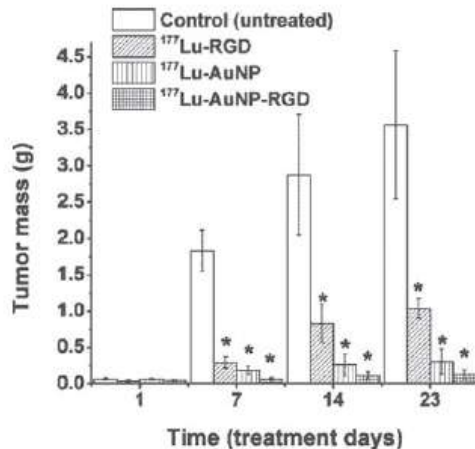


Figure 6. Tumor size progression for ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD groups at different days of the treatment (left). The average radiation absorbed doses of ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD delivered to C6 tumors (right). *Statistically significant difference ($p < 0.05$) versus control group. †Statistically significant difference ($p < 0.05$) versus ^{177}Lu -AuNP-RGD group.

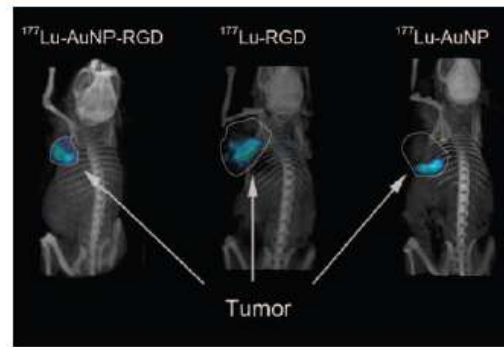


Figure 7. micro-SPECT/CT images of ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD at 24 h after the last injection (at 22 days of treatment). The tumor areas in which no radioactivity is observed is necrotic tissue. Extensive necrotic foci are present in advanced stages of glioblastomas and in less-advanced neoplasms necrosis occurs sparsely. ^{177}Lu -AuNP-RGD tumor uptake is more homogeneous indicating less necrotic tissue.

Tumor Metabolic Activity

High accumulation of [^{18}F]FDG in the tumor and consequently high SUV values represent high metabolic activity in viable tumor cells. As shown in Table II, the SUV values of the groups treated with ^{177}Lu -radiopharmaceuticals were significantly lower than those of the control group ($p < 0.05$), while the SUV of the ^{177}Lu -AuNP-RGD group was significantly lower than that of ^{177}Lu -AuNP and ^{177}Lu -RGD groups ($p < 0.05$) (Fig. 8).

Histopathological Studies

Microscopic histological characteristics that define C6 gliomas were observed in tumors implanted in mice.

Table II. Tumor metabolic activity (^{18}F FDG standard uptake value, SUV), VEGF gene expression in tumor tissues (relative concentration versus β -actin) and urea, creatinine and urea nitrogen (BUN) serum concentrations in mice bearing C6 gliomas after 23 days of treatment with ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -RGD or ^{177}Lu -AuNP (mean \pm standard deviation).

Treatment group	SUV	VEGF (RC)	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)	BUN (mg/dL)
^{177}Lu -AuNP-RGD	0.335 \pm 0.099*	0.012 \pm 0.006*	0.230 \pm 0.026	77.933 \pm 7.497	30.417 \pm 3.502
^{177}Lu -AuNP	0.584 \pm 0.107*†	0.040 \pm 0.012†	0.163 \pm 0.050	67.025 \pm 7.562	31.320 \pm 3.534
^{177}Lu -RGD	2.740 \pm 0.260*†	0.037 \pm 0.006†	0.180 \pm 0.036	59.267 \pm 5.292	32.993 \pm 2.433
Control	6.539 \pm 0.052	0.070 \pm 0.028	0.200 \pm 0.057	63.550 \pm 3.894	29.698 \pm 1.821

Notes: *Statistically significant difference ($p < 0.05$) versus control (untreated group); †Statistically significant difference ($p < 0.05$) versus ^{177}Lu -AuNP-RGD group.

including giant cells and pleomorphic cell elements, mostly with vesicular nuclei and abundant eosinophil cytoplasm, mitotic forms and atypical nuclei. The following characteristics were observed in the different treatment groups.

^{177}Lu -AuNP-RGD: Tumors were delimited by a weak necrotic (N) area in the periphery (Fig. 9(A)); intratumoral vessels (V) observed in the necrotic zone were scarce and thinner than in other groups, with non-significant thick-wall (Figs. 9(B) and (C)); no inflammatory infiltrate was observed, and no detritus was formed in the tumor tissues.

^{177}Lu -RGD: Necrotic areas were surrounded and limited to the tumor periphery (Fig. 9(D)). Glomeruloid epithelial proliferations were occasionally present (Fig. 9(E)). Diffuse inflammatory infiltrate and cellular detritus were observed predominantly in necrotic sites, and intratumoral vessels were dispersed and occasional (Fig. 9(F)).

^{177}Lu -AuNP: Intratumoral thick-walled vessels were observed. Necrotic areas were dispersed in the periphery and within the tumor (Figs. 9(G) and (I)). In some cases, detritus accumulation and diffuse inflammatory infiltrate were present (Fig. 9(H)).

Control group: Extensive necrotic areas with pseudopalisading sections and thick-walled capillaries were observed

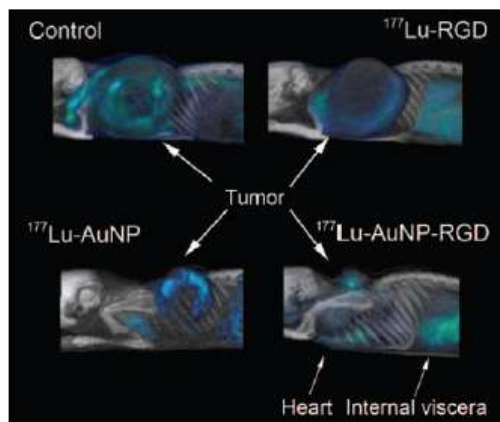


Figure 8. ^{18}F FDG (2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose)-micro PET/CT images of the control (untreated mouse), ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -RGD and ^{177}Lu -AuNP groups at 23 days of treatment. High accumulation of ^{18}F FDG in the tumor represent high metabolic activity in the viable tumor cells.

(Figs. 9(J), (L)). The necrotic area exhibited more intratumoral vessels than in the ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -RGD or ^{177}Lu -AuNP groups. The vessel morphology was irregular in shape and size (Fig. 9(K)), and inflammatory infiltrate with an accumulation of cellular detritus was also observed (Fig. 9(L)).

No cytopathological damage was observed in kidneys. The glomerulus, proximal tube and distal tube exhibited no sign of necrosis or of damage any kind.

VEGF gene expression in tumor tissues. Real-time PCR analysis revealed that all treatments tended to reduce VEGF gene expression in tumor cells, although the effect in the ^{177}Lu -RGD group was not significant versus controls (Table II). However, treatment with ^{177}Lu -AuNP-RGD exerted the strongest and significant inhibition of VEGF gene expression when compared to the controls ($p < 0.05$). As ^{177}Lu -AuNP-RGD affinity for the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin was demonstrated, the significant reduction in VEGF gene expression can be directly related to the $\alpha(v)\beta(3)$ blocking.²⁶

Creatinine, urea and BUN quantification. Serum levels of creatinine, urea and BUN in the treatment groups were not statistically significant different with respect to control levels ($p > 0.05$) (Table II). This result correlates with the calculated low radiation absorbed dose to the kidneys, therefore, no renal toxicity was observed.

DISCUSSION

As expected, the radiopharmaceutical that yielded the greatest uptake and retention in tumors was ^{177}Lu -AuNP-RGD. The effects of this radiopharmaceutical can be attributed to passive and active-targeting mechanisms as well as multimeric and multivalent properties.⁸ Consequently, the radiolabeled multimeric system delivered a greater radiation absorbed dose in tumors than did ^{177}Lu -AuNP or ^{177}Lu -RGD. The cRGD dose was also greater than that of ^{177}Lu -RGD, as ^{177}Lu -AuNP-RGD and ^{177}Lu -RGD were injected with the same cRGD concentration ($\sim 3 \times 10^{12}$ molecules of cRGD/50 μL). These results correlated with the observed therapeutic response in which ^{177}Lu -AuNP-RGD was the radiopharmaceutical that induced significantly less tumor progression, less tumor metabolic activity, fewer intratumoral vessels and reduced VEGF gene expression.

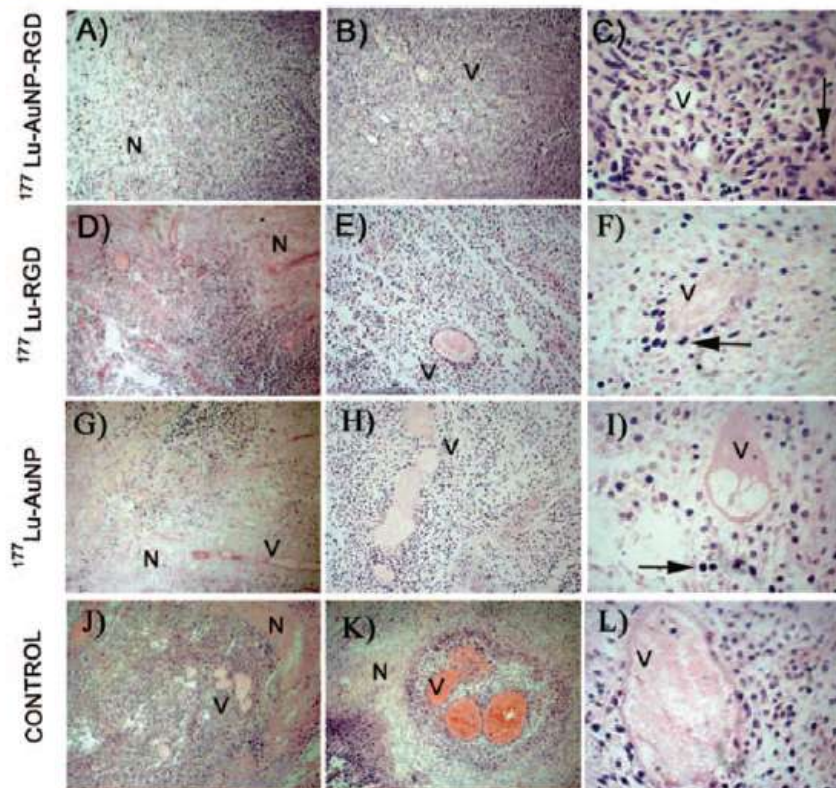


Figure 9. Three microscopic views ((A), (D); (G), (B), (E), (H), (J), (K): $\times 100$; (C), (F), (I), (L): $\times 200$) of tumor histopathology with ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -RGD or ^{177}Lu -AuNP after 23 days of treatment. The control is a tumor from an untreated mouse. Less necrosis (N) and less vascular proliferation (V) in the ^{177}Lu -treatments against the control are observed. Nuclear pleomorphism is indicated by arrows.

A peptide-nanoparticle conjugate bearing cRGD peptides provides a surface for simultaneous multiple interactions with the cell surface, giving rise to multivalent effects (defined as an affinity enhancement). Poethko et al.²⁴ reported that the minimum linker length is approximately 3.5 nm for the simultaneous binding of two c(RGD) motifs in the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin. In the ^{177}Lu -AuNP-RGD system, the longest distance between two RGD motifs was calculated to be 11 nm, which is sufficiently long for the motifs to bind to adjacent $\alpha(v)\beta(3)$ integrins simultaneously.^{8,12} The increase of peptide multiplicity in ^{177}Lu -AuNP-RGD may be at least partly responsible for the enhancement in tumor uptake (by an active-targeting mechanism) with respect to ^{177}Lu -RGD (^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK)₂), in which the distance between the RGD molecules is 2.8 nm.¹²

Because the aim of this study was to evaluate and compare the therapeutic response, no tumor ablation was induced. However, in agreement with the radiation absorbed doses obtained in the non-target organs, the ^{177}Lu -AuNP-RGD dose could be increased ten-fold without exceeding the maximum tolerated radiation dose

(MTD) to the kidneys (MTD = 25–30 Gy) or liver (MTD = 30–40 Gy), increasing the therapeutic efficacy and likely yielding complete tumor remission.^{22,25}

The results indicated that ^{177}Lu -AuNP-RGD exerted the strongest and most significant inhibition of VEGF gene expression when compared to the controls ($p < 0.05$), potentially due to the multivalent RGD system, which may antagonize the function of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin, thereby inhibiting angiogenesis.²⁶ Cyclic RGD peptides have previously been reported to have limited activity as single agents in the treatment of glioblastoma, but when added to standard radiochemotherapy, appear to prolong progression-free and increase the overall survival in patients with newly diagnosed glioblastomas.⁷ Therefore, the observed effect of ^{177}Lu -AuNP-RGD on VEGF gene expression could be due to the combined molecular targeting therapy (multimeric and multivalent RGD system) and radiotherapy (^{177}Lu) found in this one particular pharmaceutical.

Several trials have shown a significant improvement in clinical outcome when radiotherapy, chemotherapy or both were carried out under hyperthermic conditions in patients with advanced solid tumors such as cervical cancer.^{27,28}

Hyperthermia increases the efficacy of radiotherapy by improving tumor oxygenation and interfering with DNA repair mechanisms.²⁷ In combination with chemotherapy, hyperthermia increases the drug concentration in the tumor area.²⁷ However, current techniques for hyperthermia induction display low spatial selectivity for the tissues that are heated. Lasers have been used for inducing hyperthermia, and spatial selectivity can be improved by adding gold nanoparticles to the tissue to be treated. By exposing nanoparticles to laser irradiation, it is possible to heat a localized area in tumors without any harmful heating of surrounding healthy tissues. The multifunctional ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD system prepared in this study, could also be used in photothermal cancer therapy using short NIR laser pulses to generate a second harmonic or a two-photon absorption process.²⁹ Second harmonic generation converts the NIR photons (800 nm) into visible photons (400 nm), which could be absorbed by the ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD nanospheres through surface plasmon and electron interband transition from the d band to the sp band with the consequent conversion of their energy into heat. NIR photons could also be directly absorbed and converted into heat through a nonlinear two-photon absorption process due to an aggregated alignment of the nanoparticles bound to cancer cells.^{29, 30}

If all the properties of the radiolabeled multifunctional system could be applied in nanomedicine, ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD could be potentially useful for the specific imaging of malignant tumors during treatment (SPECT imaging), for molecular targeting therapy/radiotherapy (multimeric RGD peptides plus high β -particle energy delivered per unit of targeted mass) and for photothermal therapy (localized heating). For therapeutic applications in humans, nanoparticles would have to be administered by an intratumoral injection or via a selective artery to avoid high uptake by organs of the reticuloendothelial system because of the colloidal nature of the nanoparticles.³¹ Injection of the multimeric system into an artery of the affected organ would permit high uptake to a tumor and potentially to micrometastases or individual cancer cells.

CONCLUSIONS

¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles conjugated to cyclo-RGDfK(C) significantly decreased glioma tumor progression in mice through the effect of a combined molecular targeting therapy/radiotherapy. The inhibition of VEGF gene expression, involved in the angiogenesis process, indicated a molecular response. [¹⁸F]fluor-deoxy-glucose-microPET/CT images showed a significant decrease in tumor metabolic activity. Therefore, ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD demonstrates properties suitable for use as an agent for molecular targeting radiotherapy.

Conflict of Interest

There are no conflicts of interest.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Acknowledgment: This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT-SEP-CB-2010-01-150942).

REFERENCES

1. D. L. Morse and R. J. Gillies, Molecular imaging and targeted therapies. *Biochem. Pharmacol.* 80, 731 (2010).
2. M. Patel, M. A. Vogelbaum, G. H. Barnett, R. Jalali, and M. S. Ahluwalia, Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 21, 1247 (2012).
3. J. Kunikowska, L. Króllicki, A. Hubalewska-Dydejczyk, R. Mikołajczak, A. Sowa-Staszczak, and D. Pawlak, Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with ⁹⁰Y-DOTATATE and tandem ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTATATE: Which is a better therapy option?. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38, 1788 (2011).
4. R. Valkema, S. A. Pauwels, L. K. Kvols, D. J. Kwekkeboom, F. Jamar, M. de Jong, R. Barone, S. Walrand, P. P. Kooij, W. H. Bakker, J. Lasher, and E. P. Krenning, Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with ⁹⁰Y-DOTA⁰, Tyr³-octreotide and ¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³-octreotate. *J. Nucl. Med.* 46, 83S (2005).
5. L. Bodei, M. Cremonesi, C. M. Grana, N. Fazio, S. Iodice, S. M. Baio, M. Bartolomei, D. Lombardo, M. E. Ferrari, M. Sansovini, M. Chinol, and G. Paganelli, Peptide receptor radionuclide therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: The IEO phase I-II study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38, 2125 (2011).
6. G. Ferro-Flores and C. A. Murphy, Pharmacokinetics and Dosimetry of ¹⁸⁸Re-pharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1389 (2008).
7. G. Tabatabai, J. C. Tonn, R. Stupp, and M. Weller, The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2402 (2011).
8. S. Liu, Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin α v β 3 targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol. Pharmaceutics* 3, 472 (2006).
9. S. Liu, Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin α v β 3-targeted radiotracers: Maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjugate Chem.* 20, 2199 (2009).
10. R. Haubner and C. Decristoforo, Radiolabeled RGD peptides and peptidomimetics for tumor targeting. *Front. Biosci.* 14, 872 (2009).
11. P. M. Mitrasinovic, Advances in α (v) β (3) integrin targeting cancer therapy and imaging with radiolabeled RGD peptides. *Curr. Radiopharm.* 2, 214 (2009).
12. X. Montet, M. Funovics, K. Montet-Abou, R. Weissleder, and J. Lee, Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. *J. Med. Chem.* 49, 6087 (2006).
13. C. Huang, Q. Bao, D. Hunting, Y. Zheng, and L. Sanchez, Conformation-dependent DNA damage induced by gold nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 856 (2013).
14. J. H. An, B. K. Oh, and J. W. Choi, Detection of tyrosine hydroxylase in dopaminergic neuron cell using gold nanoparticles-based barcode DNA. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 639 (2013).
15. Y. Qu, Y. Huang, and X. Lu, Proteomic analysis of molecular biocompatibility of gold nanoparticles to human dermal fibroblasts-fetal. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 40 (2013).
16. E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, L. M. De León-Rodríguez, C. L. Santos-Cuevas, R. García-Becerra, L. A. Medina, and L. Gómez-Oliván, Multimeric System of ^{99m}Tc-labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDfK(C)] for Molecular Imaging of Tumor α (v) β (3) expression. *Bioconjugate Chem.* 22, 913 (2011).

17. M. Luna-Gutiérrez, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, N. Jiménez-Mancilla, E. Morales-Avila, L. de León Rodríguez, and K. Isaac-Olive, ¹⁷⁷Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 50, 140 (2012).
18. E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, and L. Gómez-Oliván, Engineered Multifunctional RGD-Gold Nanoparticles for the Detection of Tumour specific $\alpha(v)\beta(3)$ Expression: Chemical Characterisation and Ecotoxicological Risk Assessment. *J. Biomed. Nanotechnol.* 8, 991 (2012).
19. B. E. Ocampo-García, G. Ferro-Flores, E. Morales-Avila, and F. de M. Ramírez, Kit for Preparation of Multimeric Receptor-Specific ^{99m}Tc-Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles. *Nucl. Med. Comm.* 32, 1095 (2011).
20. J. Rodríguez-Cortés, C. A. Murphy, G. Ferro-Flores, M. Pedraza-Lopez, and E. Murphy-Stack, Biokinetics and dosimetry with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE in athymic mice with induced pancreatic malignant tumours: Preclinical studies. *Radiat. Eff. Defects Solids* 162, 791 (2007).
21. W. H. Miller, C. Hartmann-Stantar, D. Fisher, M. A. Descalle, T. Daly, J. Lehmann, M. R. Lewis, T. Hoffman, J. Smith, P. D. Situ, and W. A. Volkert, Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re, ¹⁶⁶Ho, ¹⁴⁹Pm, ⁶⁴Cu, and ¹⁷⁷Lu radionuclides. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20, 436 (2005).
22. L. Bodei, M. Cremonesi, M. Ferrari, M. Pacifici, C. M. Grana, M. Bartolomei, S. M. Baio, M. Sansovini, and G. Paganelli, Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with ⁹⁰Y-DOTATOC and ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: The role of associated risk factors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 1847 (2008).
23. I. Olmedo, E. Araya, F. Sanz, E. Medina, J. Arbiol, and P. Toledo, How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils. *Bioconjugate Chem.* 19, 1154 (2008).
24. T. Poethko, G. Thumshirn, U. Hersel, F. Rau, R. Haubner, M. Schwaiger, H. Kessler, and H. J. Wester, Improved tumor uptake, tumor retention and tumor/background ratios of pegylated RGD multimers. *J. Nucl. Med.* 44, 46P (2003).
25. E. Vejt, M. Jong, J. Wetzels, R. Masereeuw, M. Melis, W. J. Oyen, M. Gotthardt, and O. C. Boerman, Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: Mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J. Nucl. Med.* 51, 1049 (2010).
26. C. F. Montenegro, C. L. Salla-Pontes, J. U. Ribeiro, A. Z. Machado, R. F. Ramos, C. C. Figueiredo, V. Morandi, and H. S. Selistre-de-Araujo, Blocking $\alpha v \beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie* 94, 1812 (2012).
27. M. Franckena, R. De Wit, A. C. Ansink, A. Notenboom, R. A. Canters, D. Fatehi, G. C. Van Rhoon, and J. Van Der Zee, Weekly systemic cisplatin plus locoregional hyperthermia: An effective treatment for patients with previously irradiated recurrent cervical carcinoma in a previously irradiated area. *Int. J. Hyperthermia* 23, 443 (2007).
28. M. Franckena, L. C. Lutgens, P. C. Koper, C. E. Kleynen, E. M. van der Steen-Banasik, J. J. Jobsen, J. W. Leer, C. L. Creutzberg, M. F. Dielwart, Y. van Norden, R. A. Canters, G. C. van Rhoon, and J. van der Zee, Radiotherapy and hyperthermia for treatment of primary locally advanced cervix cancer: Results in 378 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73, 242 (2009).
29. X. Huang, W. Qian, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers Surg. Med.* 39, 747 (2007).
30. H. Mendoza-Nava, G. Ferro-Flores, B. Ocampo-García, J. Serment-Guerrero, C. Santos-Cuevas, N. Jiménez-Mancilla, M. Luna-Gutiérrez, and M. A. Camacho-López, Laser heating of gold nanospheres functionalized with octreotide: *In vitro* effect on HeLa cell viability. *Photomed. Laser Surg.* 31, 17 (2013).
31. N. Chanda, V. Kattumuri, R. Shukla, A. Zambre, K. Katti, A. Upendran, R. R. Kulkarni, P. Kan, G. M. Fent, S. W. Casteel, C. J. Smith, E. Boote, J. D. Robertson, C. Cutler, J. R. Lever, K. V. Katti, and R. Kannan, Bombesin functionalized gold nanoparticles show *in vitro* and *in vivo* cancer receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8760 (2010).

XI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La media del diámetro hidrodinámico así como el potencial Z indican que el péptido fue funcionalizado a las nanopartículas de oro.

La captación en el tumor a las 3 h, el tiempo de retención a las 96 h y el tiempo de residencia fue mayor para el radiofármaco $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ lo cual puede ser atribuido a los mecanismos de captación activos y pasivos así como a las interacciones multivalentes entre las moléculas de RGD conjugadas a las AuNP y los receptores $\alpha_v\beta_3$.

En tiempo de residencia en el riñón para los tratamientos con $^{177}\text{Lu-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ no sobrepasa el umbral de tolerancia del mismo lo cual evita nefropatía por reabsorción o retención de la radiactividad, lo cual concuerda con los resultados de las concentraciones de urea, creatinina, BUN y los resultados histopatológicos en donde no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos y el grupo control.

La dosis liberada en el tumor, para el radiofármaco $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ fue mayor con respecto a los otros dos tratamientos, dando lugar a un tumor 27 veces más pequeño y con menos actividad metabólica de los células tumorales que los grupos tratados con $^{177}\text{Lu-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y el grupo control, lo cual se explica por la combinación entre radioterapia y terapia de blancos moleculares. Los resultados histopatológicos muestran un área necrótica menor, menos y más pequeños vasos sanguíneos con respecto a los otros grupos debido al efecto antiangiogénico del c-RGD y la capacidad de las AuNP para inhibir la expresión del VEGF.

El sistema multimérico $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ resultó ser un radiofármaco que disminuye significativamente el crecimiento del glioma en un modelo murino, a través de la combinación de radioterapia y terapia de blancos moleculares, por sus propiedades teranósticas puede ser utilizado para el tratamiento de cánceres con sobreexpresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ y permite obtener imágenes moleculares para monitorear el tratamiento mediante el sistema SPECT/CT.

1. Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine; American Pharmacist Association: Washington DC, 2004: 256-277.
2. Tisato F, Bolzati C, Porchia M, Refosco F. Mass Spectrometry Reviews, 2004; 23: 309.
3. J. Crudo, N. Nevares. Second research co-ordination meeting of the CRP on “Development of therapeutic radiopharmaceutical based on ^{177}Lu for radionuclide therapy” (Research contract ARG-14060). Div. Radiofarmacia, Centro Atómico Ezeiza, Comisión Nacional de Energía Atómica. Bs. As. Argentina. 2008.
4. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. J. Nucl. Med. 2008; 49: 1735-38.
5. Reubi JC, Waser B. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. Eur. J. Nucl. Med. 2003; 30: 781- 93.
6. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Coming to grips with integrin binding to ligands. Curr. Opin. Cell Biol. 2002; 14: 641–651.
7. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 2002; 110: 673–687.
8. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. J. Biol. Chem. 2000; 275: 21785–21788.
9. Humphries MJ. Integrin structure. Biochem. Soc. Trans. 2000; 28: 311–339.
10. Ruoslathi E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 1987; 238: 491–497.
11. Eliceiri BP, Cheresh DA. Role of Rv integrins during angiogenesis. Cancer J. 2000; 13: 245–249.
12. Burke PA, De Nardo SJ, Miers LA, Lamborn KL, Matzku S, De Nardo GL. Cilengitide targeting of $\text{Rv}\beta 3$ integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. Cancer Res. 2002; 62: 4263–4272.

13. Haubner R, Finsinger D, Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the alpha- (V)beta(3) integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1997; 36: 1374–1389.
14. Mitjans F, Meyer T, Fittschen C, Goodman S, Jonczyk A, Marshall JF, Reyes G, Piulats J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *Int. J. Cancer* 2000; 87: 716–723.
15. MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA, Laug W. E. Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha 31(v) integrin antagonist. *Neurosurgery* 2001; 48: 151–157.
16. Montet X, Funovics M, Montet-Abou K, Weissleder R, Lee J. Multivalent Effects of RGD Peptides Obtained by Nanoparticle Display. *J. Med. Chem.* 2006; 49(20): 6087-6093.
17. Mulder WJ, Koole MR, Brandwijk RJ, Storm G, Chin PT, Strijkers GJ, Mello- Donega C, Nicolay K., Griffioen AW. Quantum Dots with a Paramagnetic Coating as a Bimodal Molecular Imaging Probe. *Nano letters.* 2006; 6(1): 1-6.
18. Cai W, Chen X. Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. *Nature Protocols.* 2008; 3(1): 89-96.
19. Ghosh P, Han G, De M, Kyu-Kim C, Rotello V. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 1307-1315.
20. Maeda A, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release.* 2000; 65: 271-284.
21. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1289-306.
22. Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, Ramírez F de M, Gutiérrez-Wing C, Arteaga de Murphy C, Santos-Cuevas CL. Chapter 11 "Gold Nanoparticles Conjugated to Peptides" in "Colloids in Biotechnology" Ed. Taylor and Francis/CRC Press. London, 2010, p. 231-252).
23. M. C. Daniel, D. Astruc. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. 2004; 104: 293-346.

24. Hutter E, Fendle JH. Exploitation of localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Material*. 2004; 16: 1685-1706.
25. El-Sayed S. Link and M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*. 1999; 103: 4212-4217.
26. Huang X, El-Sayed. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res*. 2010; 1: 13–28.
27. Kogan MJ, Olmedo I, Hosta L, Guerrero AR, Cruz LJ, Albericio R. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications, *Nanomedicine*. 2007; 2: 287-306.
28. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Hals NJ. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003; 100: 13549-13554.
29. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10.
30. Martínez-Esquerro JD, Martínez LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFR como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Instituto Nacional de Cancerología. Cancerología* 2006; 1: 83-96.
31. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506.
32. Manetti F, Botta M. Small-molecule inhibitors of fibroblast growth factor receptor (FGFR) tyrosine kinases (TK). *Curr. Pharm. Des*. 2003; 9: 567–581.
33. Shibuya M. Structure and function of VEGF/ VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35.
34. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35:71-103.
35. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006; 93:E73-E80.
36. Clottes E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy. *Bull Cancer* 2005; 92:119-127.

37. Aumailley MM, Gurrath G, Muller J, Calvete R, Timpl H, Kessler: Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* 1991; 91: 50-54.
38. Zhaofei L, Jiyun S, Bing J, Zilin Y, Yan L, Huiyun Z, Fang L, Jie T, Xiaoyuan C, Shuang L, Fan W. Two ⁹⁰Y-Labeled Multimeric RGD Peptides RGD4 and 3PRGD2 for Integrin Targeted Radionuclide Therapy. *Molecular Pharmaceutics.* 2011; 8: 591–599.
39. Haubner R, Wester HJ, Reuning U. Radiolabelled alfavbeta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* 1999; 40: 1061-71.
40. Haubner, R.; Wester, H.J.; Burkhart, F. Glycosylated RGDcontaining peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J. Nucl. Med.*, 2001; 42: 326-36.
41. Haubner. R.; Kuhnast, B.; Mang, C. [¹⁸F]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconjug. Chem.*, 2004; 15: 61-9.
42. Haubner, R.; Wester, H.J.; Weber, W.A. Non-invasive imaging of avb3 integrin expression using ¹⁸F-labelled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1781-5.
43. Morrison MS, Ricketts SA, Barnett J, Cuthbertson A, Tessier J, Wedge SR. Use of a Novel Arg-Gly-Asp Radioligand, ¹⁸F-AH111585, to determine changes in tumor vascularity after antitumor therapy. *J. Nucl. Med.* 2009; 50: 116-22.
44. Yoshimoto M, Ogawa K, Washiyama K, Shikano N, Mori H, Amano R, Kawai K. alfavbeta3 integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *Int. J. Cancer.* 2008; 123: 709-715.
45. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee YS, Kim YJ, Cheon GJ, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: ⁶⁸Galabeled c(RGDyK)–isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 830-36.
46. Li ZB, Chen K, Chen X. ⁶⁸Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2008; 35: 1100-08.

47. Kenny LM, Coombes RC, Oulie I, Contractor KB, Miller M, Spinks TJ, et al. Phase I Trial of the positron-emitting arg-gly-asp (RGD) peptide radioligand ¹⁸F-AH111585 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 879-86.
48. Liu Z, Yan Y, Chin FT, Wang F, Chen X. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using ¹⁸F-labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer ¹⁸F-FB-PEG3-Glu-RGD-BBN. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 425-32.
49. Liu Z, Niu G, Wang F, Chen X. (⁶⁸Ga)-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2009; 36: 1483-94.
50. Scottelius M, Wester HJ. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods*, 2009; 48: 161-77.
51. Haubner R, Decristoforo C. Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Front. Biosci.*, 2009; 14: 872-86.
52. Mitrasinovic PM. Advances in avb3 integrin-targeting cancer therapy and imaging with radiolabeled RGD peptides. *Curr. Radiopharm.* 2009; 2: 214-19.
53. Zaccaro L, Del Gatto A, Pedone C, Saviano M. Peptides for tumour therapy and diagnosis: Current status and future directions. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16: 780-95.
54. Rajopadhye M. RP593, a ^{99m}Tc-labeled avb3/avb5 antagonist, rapidly detects spontaneous tumors in mice and dogs. *J. Nucl. Med.* 2000; 41: 34.
55. Janssen M, Oyen WJG, Massuger LFAG, Frielink C, Dijkgraaf I, Edwards DS, et al. Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2002;17(6):641-6.
56. Poethko, T. Improved tumor uptake, tumor retention and tumor/background ratios of pegylated RGD multimers. *J. Nucl. Med.* 2003;44:46P.
57. Dijkgraaf I, Yim CB, Franssen GM, Schuit RC, Luurtsema G, Liu S, et al. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ integrin expression in tumours with ⁶⁸Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011;38(1):128-37.
58. Thumshirn G, Hersel U, Goodman SL, Kessler H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: Solid-phase peptide synthesis and

- chemoselective oxime ligation. *Chemistry - A European Journal*. 2003;9(12):2717-25.
59. Liu S, Hsieh WY, Jiang Y, Kim YS, Sreerama SG, Chen X, et al. Evaluation of a ^{99m}Tc-labeled cyclic RGD tetramer for noninvasive imaging integrin $\alpha\beta 3$ -positive breast cancer. *Bioconjugate Chemistry*. 2007; 18(2): 438-46.
 60. Wu Y, Zhang X, Xiong Z, Cheng Z, Fisher DR, Liu S, et al. microPET imaging of glioma integrin $\alpha\beta 3$ expression using ⁶⁴Cu-labeled tetrameric RGD peptide. *Journal of Nuclear Medicine*. 2005; 46(10): 1707-18.
 61. Zi-Bo L, Zhanhong W, Kai C, Frederick TC, Xiaoyuan C. Click Chemistry for ¹⁸F-Labeling of RGD Peptides and microPET Imaging of Tumor Integrin $\alpha\beta 3$ Expression. *Bioconjugate Chem*. 2007; 18: 1987–1994.
 62. Levy R, Thanh NTK, Doty RC, Hussain I, Nichols R, Schiffrin DJ. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126: 10076-10084.
 63. De la Fuente JM, Berry CC. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjugate Chem*. 2005; 16: 1176–1180.
 64. Porta F, Speranza G, Krpetic Z, Santo VD, Francescato P, Scari G. Gold nanoparticles capped by peptides. *Mater. Sci. Eng., B* 2007;140: 187–194.
 65. Olmedo I, Araya E, Sanz F, Medina E, Arbiol J, Toledo P. How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils. *Bioconjugate Chem*. 2008; 19: 1154–1163.
 66. Surujpaul PP, Gutierrez-Wing C, Ocampo-Garcia B, Ramirez FM., Arteaga de Murphy C, Pedraza-Lopez M, Camacho-Lopez MA, Ferro-Flores, G. Gold nanoparticles conjugated to [Tyr³]octreotide peptide. *Biophys. Chem*. 2008; 138: 83–90.
 67. Mendoza-Sanchez AN, Ferro-Flores G, Ocampo-Garcia BE, Morales-Avila E, Ramirez FM., Leon-Rodriguez LM, Santos-Cuevas CL, Medina LA, Rojas-Calderon EL, Camacho-Lopez MA. Lys³-bombesin conjugated to ^{99m}Tclabeled gold nanoparticles for in vivo gastrin releasing peptide-receptor imaging. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2010; 6: 375–384.

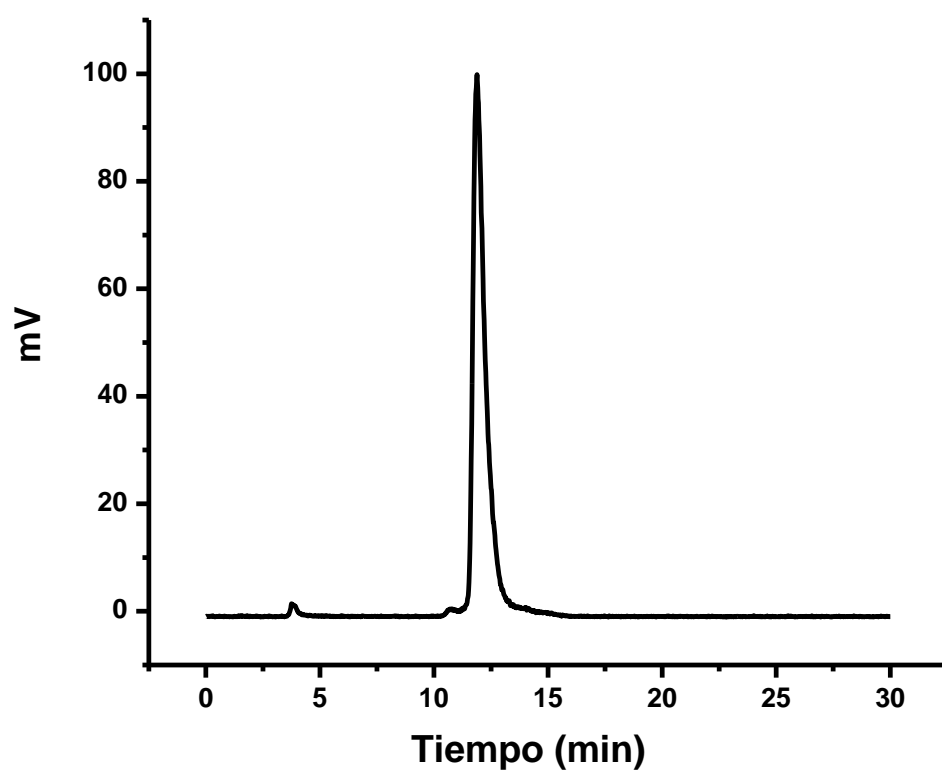
68. Ocampo-Garcia BE, Ramirez FM, Ferro-Flores G, Leon-Rodriguez LM, Santos-Cuevas CL, Morales-Avila E, Arteaga de Murphy C, Pedraza-Lopez M, Medina L A, Camacho-Lopez MA. 99mTc-labeled gold nanoparticles capped with HYNICpeptide/ mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl. Med. Biol.* 2011; 38: 1–11.
69. Tore G, Tore S, Kirsten S. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*. 2011; 6: 176 – 185.
70. Xiaohua H, Prashant K, Jain IH, El-Sayed. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*. 2008;23:217–228.
71. Xiaohua H, Wei Q, Ivan H, Mostafa A. The Potential Use of the Enhanced Nonlinear Properties of Gold Nanospheres in Photothermal Cancer Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007;39:747–753..
72. Morales AE, Ferro FG, Ocampo GB, León de RL, Santos CC, García BR, Medina L, Gómez OL. Multimeric System of 99mTc-Labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDfK(C)] for Molecular Imaging of Tumor $\alpha(v)\beta(3)$ Expression. *Bioconjugate Chem*. 2011; 22: 913–922.
73. Luna GM, Ferro FG, Ocampo GB, Jiménez MN, Morales AE, De León RL, Issac OK. 177Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins. *J. Label Compd. Radiopharm*. 2012; 50: 140–148.
74. Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom D, De Jong M, Krenning E. Peptide receptor radionuclide therapy. *El Sevier*. 2007; 21 (1): 111-129.
75. de Jong M, Valkema R, Jamar F et al. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Seminars in Nuclear Medicine* 2002; 32: 133–140.
76. de Jong M, Breeman WAP, Valkema R et al. Combination Radionuclide Therapy Using 177Lu- and 90Y-Labeled Somatostatin Analogs. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46(supplement 1): 13S–17S.
77. Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol. Cancer Res*. 2006; 4: 601-605.
78. Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2003; 2: 803-811.

79. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005; 94:209-231.
80. Zetter B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med.* 1998; 49: 407-424.
81. Ferrara N, Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005; 438: 967-974.
82. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ: Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 5209-5218.
83. Carmeliet P: Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936.
84. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(17): 11393–11398.
85. Pietras R, Weinberg O: Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *eCAM* 2005; 2(1): 49–57.
86. Zetter B: Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407-424.
87. Folkman J: Fundamental concepts of the angiogenesis process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-651.
88. Zhu Z, Witte L: Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs* 1999; 17: 195-212.
89. Jonczyk A, Goodman S, Diefenbach B, Sutter A, Hölzemann G, Kessler H, Dechantsreiter M. Preparation of cyclic peptides as integrin inhibitors. DE 19534177; EP 0770622; JP 1997132593; US 6001961.
90. Bach II AC, Eyermann CJ, Gross JD, Bower MJ, Harlow RL, Weber PC, DeGrado W F. Structural studies of a family of high affinity ligands for GPIIb/IIIa. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; 116: 3207–3219.
91. Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, Barsky L, Weinberg KI, Laug WE. Alpha v-integrin antagonist EMD 121974 induces

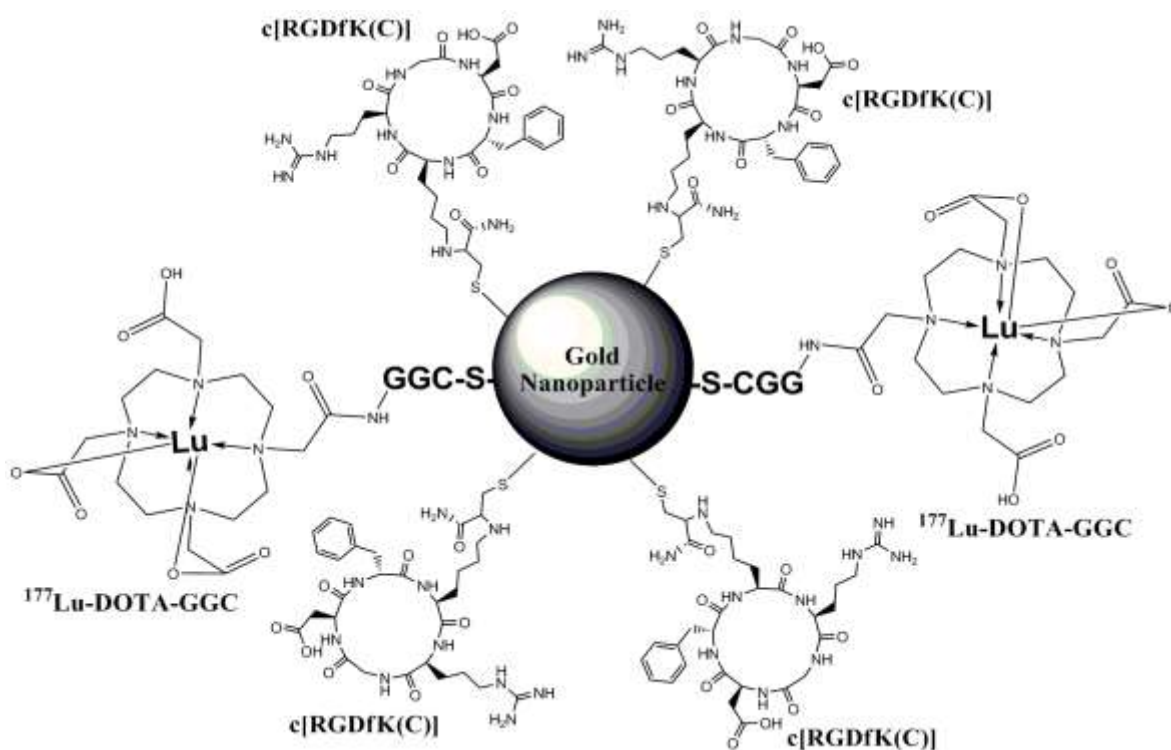
- apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int. J. Cancer.* 2002; 98: 690–697.
- 92.** Paolillo M, Russo MA, Serra M, Colombo L, Schinelli S. Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2009; 9: 1439–1446.
- 93.** Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo . *Br. J. Cancer.* 2002; 86: 788–795.
- 94.** Monnier Y, Farmer P, Bieler G, Imaizumi N, Sengstag T, Alghisi GC, Stehle JC, Ciaroni L, Andrejevic-Blant S, Moeckli R, Mirimanoff RO, Goodman SL, Delorenzi M, Ruegg C. CYR61 and $\alpha\beta 5$ integrin cooperate to promote invasion and metastasis of tumors growing in preirradiated stroma. *Cancer Res.* 2008; 68: 7323–7331.
- 95.** Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodivala-Dilke KM. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat. Med.* 2009; 15: 392–400.
- 96.** Weller M, Reardon D, Nabors B, Stupp R. Will integrin inhibitors have proangiogenic effects in the clinic? *Nat. Med.* 2009; 15: 726–726.
- 97.** Tabatabai G, Weller M, Nabors B, Picard M, Reardon D, Mikkelsen T, Ruegg C, Stupp R. Targeting integrins in malignant glioma. *Target. Oncol.* 2010; 5: 175–181.
- 98.** Nabors BL, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittemer SM, Colevas D, Grossman S A. A phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1651–1657.
- 99.** Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittemer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors L B. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 5610–5617.

100. Knaul F, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *SaludPublicaMex* 51 suppl. 2009; 2: S335-S344.
101. G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, Vol. 241, págs. 20–22.
102. J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B*, 110. 2006: 15700-15707.
103. J. Polte, T. Torsten Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A. F. Thunemann, and R. Kraehnert. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. *J. Am. Chem. Soc.*, 132. 2010: 1296–1301.
104. Miller WH, Hartmann-Siantar C, Fisher D, Descalle MA, Daly T, Lehmann J, et al. Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for ^{90}Y , ^{188}Re , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{64}Cu , and ^{177}Lu radionuclides. *Cancer Biother Radiopharm* 2005;20:436-49.

ANEXO 1: Radiocromatograma en HPLC - Fase Reversa de ^{177}Lu -DOTA-GGC: Se observa que $^{177}\text{LuCl}_3$ $t_R = 3.5$ min, ^{177}Lu -DOTA-GGC $t_R = 12.4$ min.



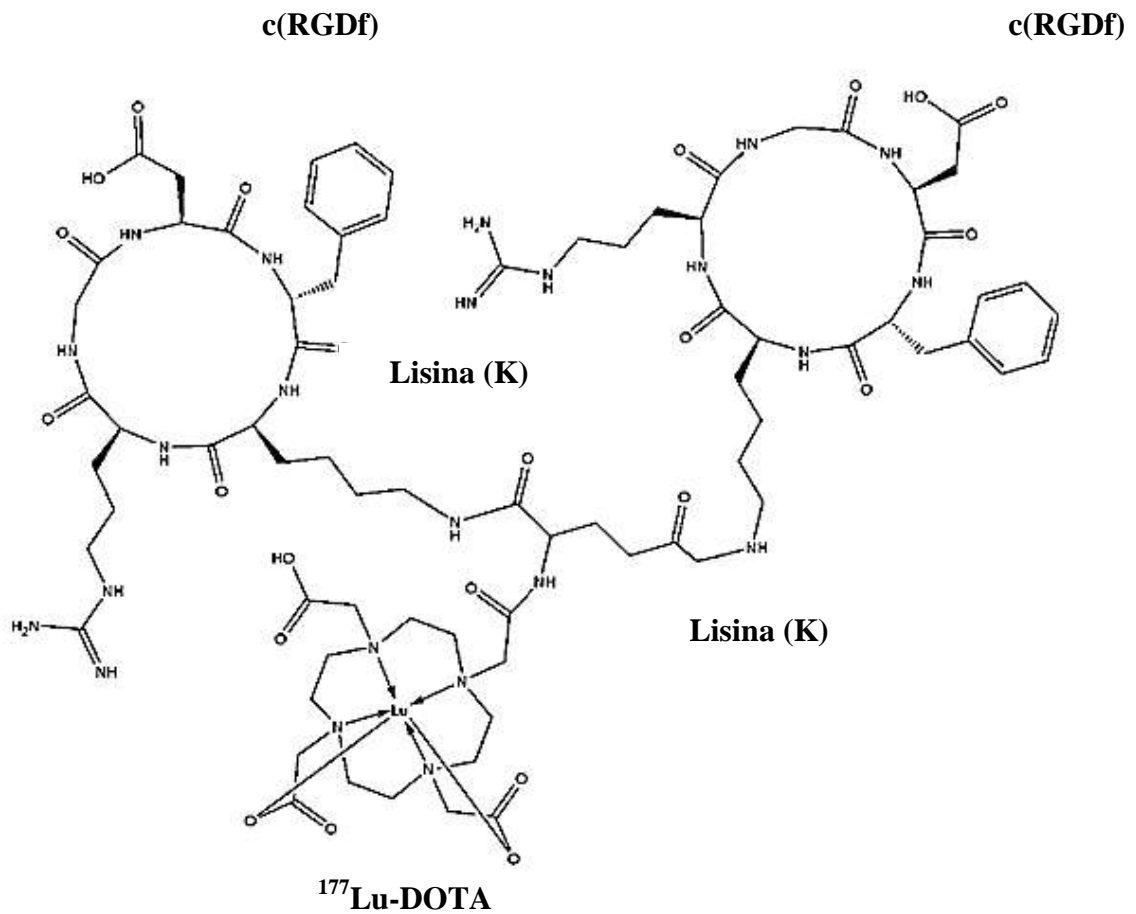
ANEXO 2: Estructura de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ ($^{177}\text{Lu-DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfK(C)]$). La secuencia Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) es el sitio biológicamente activo, la fenilalanina (f) y la lisina (K) completan la estructura pentapeptídica, la secuencia GG sirve como espaciador, la cisteína (C) tiene el grupo tiol activo que interacciona con la superficie de las AuNP formando un enlace covalente, el DOTA es usado como quelante para el ^{177}Lu .



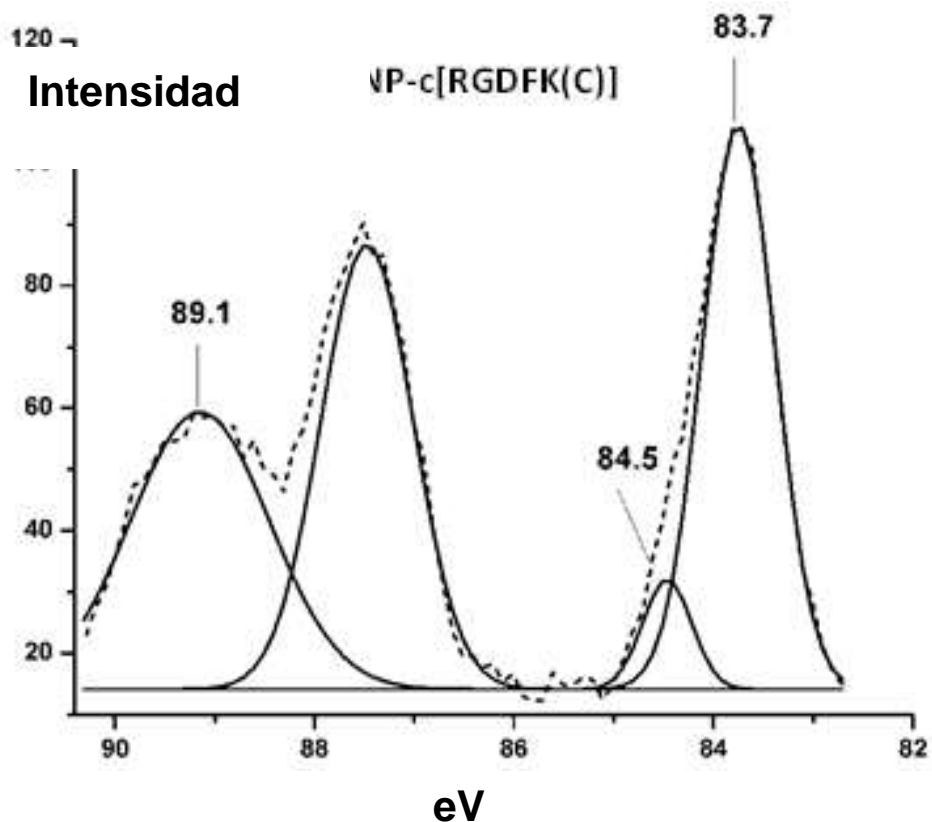
ANEXO 3: Estructura de ^{177}Lu -AuNP (^{177}Lu -DOTA-GGC-AuNP). Este conjugado no tiene el sitio activo RGD, se utilizó con el objetivo de evaluar la respuesta terapéutica a las AuNPs pues se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir por sí mismas la angiogénesis.



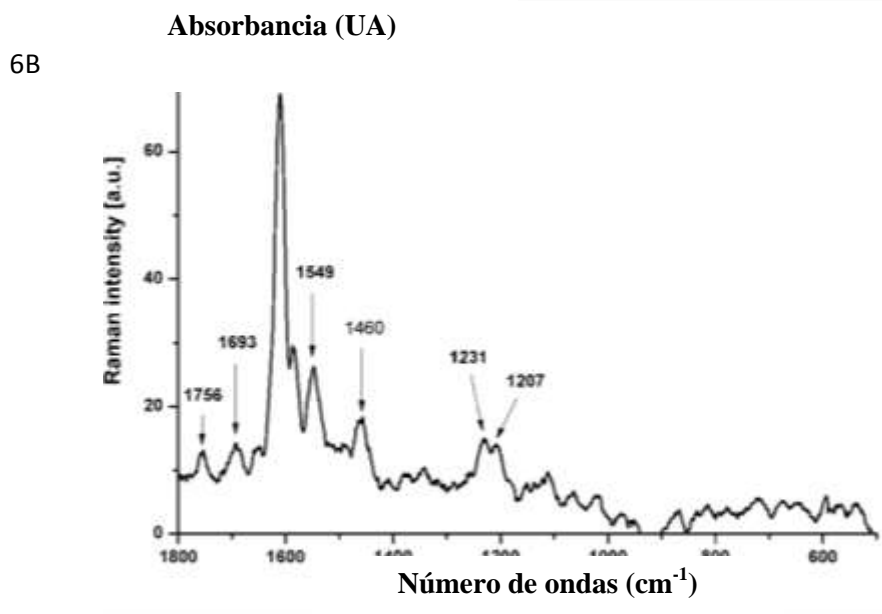
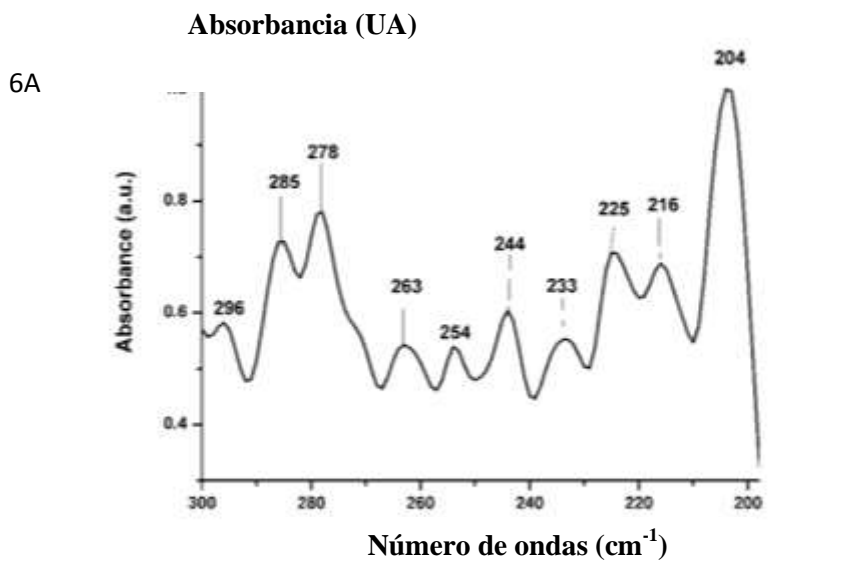
ANEXO 4: Estructura de $^{177}\text{Lu-RGD}$ ($^{177}\text{Lu-DOTA-E-c(RGDfK)}_2$). Se muestra la estructura del dímero, donde la secuencia RGD es el sitio activo, la (f) completa el ciclo, la K sirve como espaciador entre las dos moléculas, el DOTA se une covalentemente al radionúclido metálico y lo une al ciclo RGD.



ANEXO 5: Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS). El espectro de DOTA-GGC-AuNP-c[RGDfKC] muestra dos picos adicionales con respecto a AuNP-citrato 89.1 eV y 84.5 eV con un cambio positivo debido a los átomos con diferentes estados de oxidación.



ANEXO 6A: Espectroscopia del Infrarrojo Lejano, tanto el c[RGDfK(C)]-AuNP como DOTA-GGC-AuNP muestran una banda característica a $279 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ la cual fue representa el enlace Au-S. 6B: Espectroscopia Raman. Las AuNP funcionalizadas con c[RGDfK(C)] dan un espectro Raman en la región $1800\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$. Algunas bandas bien definidas fueron observadas en la frecuencia vibracional de esta región asociadas con los principales grupos funcionales vistos en el espectro de c[RGDfK(C)], pero ellos son característicos de AuNP- c[RGDfK(C)] debido a los cambios alto o bajos de energía y al incremento en la intensidad de las bandas.



En los Anexos 7A-7B se muestran los resultados biocinéticos de cada una de las administraciones IT a las 3, 24, 48 y 72h. ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD mostró mayor retención en el tumor que los otros radiofármacos.

ANEXO 7A: Biodistribución en ratones con tumores inducidos con la línea celular C6 (positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$) después de la administración intra-tumoral de ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD, expresada como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido(% ID/g++) o por ciento de dosis inyectada por órgano (%ID+) (media \pm SD, n=3).

Tissue	3 h	24 h	48 h	96 h
Sangre ⁺⁺	0.13 \pm 0.04	0.09 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
Corazón ⁺	0.04 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Corazón ⁺⁺	0.26 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Pulmón ⁺	0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Pulmón ⁺⁺	0.43 \pm 0.07	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Hígado ⁺	0.56 \pm 0.04	0.60 \pm 0.03	0.46 \pm 0.03	0.22 \pm 0.00
Hígado ⁺⁺	0.42 \pm 0.03	0.45 \pm 0.02	0.34 \pm 0.01	0.16 \pm 0.00
Bazo ⁺	1.33 \pm 0.09	1.08 \pm 0.26	0.72 \pm 0.07	0.28 \pm 0.04
Bazo ⁺⁺	14.77 \pm 0.99	12.00 \pm 2.88	8.00 \pm 0.77	3.11 \pm 0.44
Riñones ⁺	0.87 \pm 0.07	0.75 \pm 0.09	0.63 \pm 0.01	0.51 \pm 0.03
Riñones ⁺⁺	3.03 \pm 0.24	2.61 \pm 0.31	2.19 \pm 0.03	1.77 \pm 0.10
Intestino ⁺⁺	0.19 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
Músculo ⁺⁺	0.27 \pm 0.05	0.10 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Hueso ⁺⁺	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
C6 Tumor (Peso promedio = 0.5 g)	68.10 \pm 7.1	63.54 \pm 4.13	49.29 \pm 3.81	34.78 \pm 4.30

ANEXO 7B: Biodistribución en ratones con tumores inducidos con la línea celular C6 (positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$) después de la administración intra-tumoral de ^{177}Lu -AuNP, expresada como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido(% ID/g++) o por ciento de dosis inyectada por órgano (%ID+) (media \pm SD, n=3).

Tissue	3 h	24 h	48 h	96 h
Sangre ⁺⁺	0.17 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
Corazón ⁺	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Corazón ⁺⁺	0.06 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Pulmón ⁺	0.05 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Pulmón ⁺⁺	0.35 \pm 0.08	0.10 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Hígado ⁺	1.20 \pm 0.12	0.94 \pm 0.09	0.74 \pm 0.05	0.39 \pm 0.02
Hígado ⁺⁺	0.90 \pm 0.09	0.70 \pm 0.06	0.55 \pm 0.03	0.29 \pm 0.01
Bazo ⁺	0.70 \pm 0.06	0.73 \pm 0.08	0.56 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01
Bazo ⁺⁺	7.77 \pm 0.66	8.10 \pm 0.88	6.20 \pm 0.22	3.66 \pm 0.11
Riñones ⁺	0.81 \pm 0.03	0.70 \pm 0.04	0.56 \pm 0.02	0.41 \pm 0.00
Riñones ⁺⁺	2.82 \pm 0.10	2.43 \pm 0.13	1.95 \pm 0.06	1.46 \pm 0.02
Intestino ⁺⁺	0.01 \pm 0.51	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Músculo ⁺⁺	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Hueso ⁺⁺	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C6 Tumor (Peso promedio = 0.5 g)	48.15 \pm 5.50	35.72 \pm 2.88	24.25 \pm 1.96	15.50 \pm 1.70

ANEXO 7C: Biodistribución en ratones con tumores inducidos con la línea celular C6 (positivos a integrinas $\alpha_v\beta_3$) después de la administración intra-tumoral de ^{177}Lu -RGD, expresada como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido(% ID/g++) o por ciento de dosis inyectada por órgano (%ID+) (media \pm SD, n=3).

Tissue	3 h	24 h	48 h	96 h
Sangre ⁺⁺	0.21 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Corazón ⁺	0.04 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Corazón ⁺⁺	0.26 \pm 0.02	0.26 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Pulmón ⁺	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Pulmón ⁺⁺	0.21 \pm 0.06	0.21 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02
Hígado ⁺	0.71 \pm 0.08	0.62 \pm 0.06	0.54 \pm 0.03	0.39 \pm 0.01
Hígado ⁺⁺	0.53 \pm 0.05	0.46 \pm 0.04	0.40 \pm 0.02	0.30 \pm 0.00
Bazo ⁺	0.58 \pm 0.04	0.45 \pm 0.04	0.38 \pm 0.02	0.25 \pm 0.01
Bazo ⁺⁺	6.44 \pm 0.44	5.00 \pm 0.44	4.22 \pm 0.22	2.77 \pm 0.11
Riñones ⁺	1.84 \pm 0.11	1.49 \pm 0.13	1.10 \pm 0.09	0.60 \pm 0.07
Riñones ⁺⁺	6.41 \pm 0.38	5.19 \pm 0.45	3.83 \pm 0.31	2.09 \pm 0.24
Intestino ⁺⁺	0.21 \pm 0.09	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
Músculo ⁺⁺	0.04 \pm 0.00	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Hueso ⁺⁺	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C6 Tumor (Peso promedio = 0.5 g)	26.80 \pm 2.90	14.11 \pm 2.11	8.03 \pm 1.01	5.70 \pm 0.80

En los Anexos 8A – 8D se muestra el modelo biocinético obtenido con el software OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment). Se observa que el número de desintegraciones es mayor en el tumor para $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ debido al mayor tiempo de residencia del fármaco en comparación con los otros radioconjugados; además del tumor la unión ocurre principalmente en el hígado, riñones y bazo pero sin superar la dosis máxima tolerada.

ANEXO 8A: Modelo biocinético de $^{177}\text{Lu-RGD}$, $^{177}\text{Lu-AuNP}$ y $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ en el tumor.

Radiofármaco	Modelo Biocinético	(Número total de desintegraciones)
$^{177}\text{Lu-RGD}$	$* q_h(t) = 6.15e^{-4.8E-9} + 22.9e^{-4.6E-2}$ $A_h(t) = 6.15e^{-4.2E-3} + 22.9e^{-5E-2}$	$\int_1^{23} A_h(t) dt + \int_7^{23} A_h(t) dt + \int_{14}^{23} A_h(t) dt + \int_{21}^{23} A_h(t) dt$ 4.033E11
$^{177}\text{Lu-AuNP}$	$* q_h(t) = 38.9e^{-2.3E-2} + 12.1e^{-9.8E-9}$ $A_h(t) = 38.9e^{-2.7E-2} + 12.1e^{-4.2E-3}$	9.319E11
$^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$	$* q_h(t) = 68.4e^{-7.3E-3} + 3.16e^{-7.5E-3}$ $A_h(t) = 68.4e^{-1.1E-2} + 3.16e^{-1.1E-2}$	1.553E12

* $q_h(t)$ = actividad corregida por decaimiento, comportamiento biológico [$q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}$]

ANEXO 8B: Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en el bazo.

$$\int_1^{23} A_h(t) dt + \int_7^{23} A_h(t) dt + \int_{14}^{23} A_h(t) dt + \int_{21}^{23} A_h(t) dt$$

Radiofármaco	Modelo biocinético	(Número total de desintegraciones)
^{177}Lu -RGD	$* q_h(t) = 1.71e^{7.48} + 0.584e^{9.1E-3}$ $A_h(t) = 1.71e^{7.48} + 0.584e^{1.3E-2}$	1.129E10
^{177}Lu -AuNP	$* q_h(t)$ $= -0.769e^{0.41} + 0.951e^{1.1E-2}$ $A_h(t)$ $= -0.769e^{0.42} + 0.951e^{1.52E-2}$	1.578E10
^{177}Lu -AuNP-RGD	$* q_h(t) = 1.73e^{7.22} + 1.44e^{1.49E-2}$ $A_h(t) = 1.73e^{7.22} + 1.44e^{1.91E-2}$	2.028E10

* $q_h(t)$ = actividad corregida por decaimiento, comportamiento biológico [$q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}$]

ANEXO 8C: Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en el hígado.

$$\int_1^{23} A_h(t) dt + \int_7^{23} A_h(t) dt + \int_{14}^{23} A_h(t) dt + \int_{21}^{23} A_h(t) dt$$

Radiofármaco	Modelo Biocinético	(Número total de desintegraciones)
^{177}Lu -RGD	$* q_h(t) = 2.03e^{6.61} + 0.725e^{6.37E-3}$ $A_h(t) = 2.03e^{6.61} + 0.725e^{1.06E-2}$	1.696E10
^{177}Lu -AuNP	$* q_h(t) = 0.787e^{1.89} + 1.25e^{1.16E-2}$ $A_h(t) = 0.787e^{1.89} + 1.25e^{1.58E-2}$	2.085E10
^{177}Lu -AuNP-RGD	$* q_h(t)$ $= -0.503e^{6.86E-2} + 0.972e^{1.16E-2}$ $A_h(t)$ $= -0.503e^{7.28E-2} + 0.972e^{-1.58E-2}$	1.413E10

* $q_h(t)$ = actividad corregida por decaimiento, comportamiento biológico [$q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}$]

ANEXO 8D: Modelo biocinético de ^{177}Lu -RGD, ^{177}Lu -AuNP y ^{177}Lu -AuNP-RGD en los riñones.

$$\int_1^{23} A_h(t)dt + \int_7^{23} A_h(t)dt + \int_{14}^{23} A_h(t)dt + \int_{21}^{23} A_h(t)dt$$

Radiofármaco	Modelo biocinético	(Número total de desintegraciones)
^{177}Lu -RGD	$* q_h(t) = 1.71e^{6.21} + 1.93e^{1.18E-2}$ $A_h(t) = 1.71e^{6.21} + 1.93e^{1.60E-2}$	3.174E10
^{177}Lu -AuNP	$* q_h(t) = 3.37e^{2.59} + 0.827e^{7.51E-3}$ $A_h(t) = 3.37e^{2.59} + 0.827e^{1.17E-2}$	1.807E10
^{177}Lu -AuNP-RGD	$* q_h(t) = 0.384e^{0.72} + 0.84e^{5.37E-3}$ $A_h(t) = 0.384 e^{0.73} + 0.84e^{9.64E-3}$	2.132E10

* $q_h(t)$ = actividad corregida por decaimiento, comportamiento biológico [$q_h(t) = A_h(t)e^{-\lambda_R t}$]

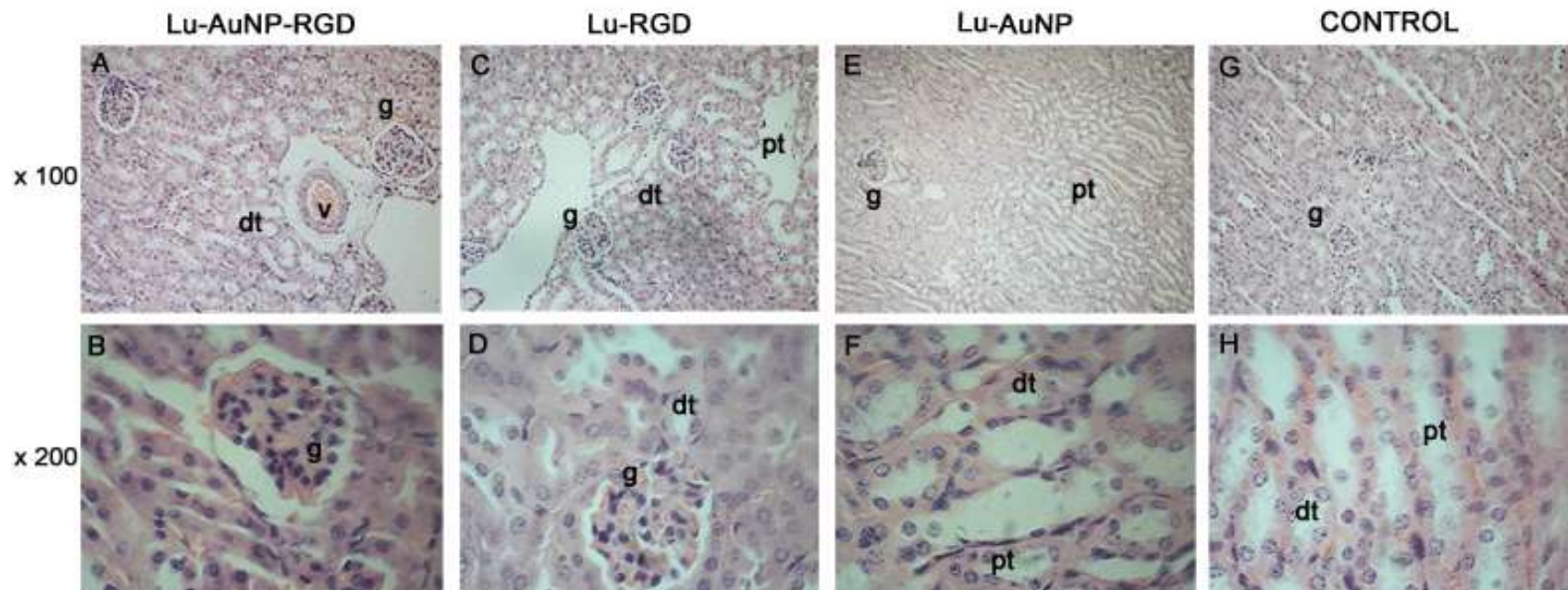
ANEXO 9: Concentraciones relativas de VEGF, HIF-1 α y Trombospondina-1 determinadas mediante PCR en Tiempo Real.

Tratamiento	VEGF (CR)	HIF-1α (CR)	Trombospondina-1 (CR)
¹⁷⁷ Lu-AuNP-RGD	0.012 \pm 0.000*	0.0069 \pm 0.002	0.0019 \pm 0.000
¹⁷⁷ Lu-AuNP	0.040 \pm 0.010†	0.0120 \pm 0.004	0.0026 \pm 0.000
¹⁷⁷ Lu-RGD	0.037 \pm 0.000†	0.0085 \pm 0.000	0.0046 \pm 0.001
Control	0.070 \pm 0.028	0.0091 \pm 0.001	0.0029 \pm 0.001

* Diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) vs grupo control.

† Diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) vs ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD

ANEXO 10: Resultados histopatológicos del riñón después del tratamiento con ^{177}Lu -AuNP-RGD, ^{177}Lu -RGD y ^{177}Lu -AuNP, no se observa necrosis ni daño renal en ningún grupo de tratamiento, los resultados son apoyados por la determinación sérica de urea, creatinina y nitrógeno ureico en las cuales no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados y el grupo control; lo cual puede explicarse porque en ningún tratamiento se supera la máxima dosis tolerada del riñón que es de entre 25-30 Gy, y la dosis en los riñones en el presente estudio fue menor a 1.5 Gy en los tres tratamientos.



g = glomérulo, dt = túbulo distal, pt = túbulo proximal.