



Universidad
de Navarra

Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

**Radiomarcage de nanopartículas de
albúmina con radiometales (tecnecio-99m,
galio-67, zirconio-89) y estudio de su
biodistribución mediante imagen molecular**

Memoria presentada por D^a María De Arcocha Torres
para obtener el Grado de Doctor

Pamplona, 2020

D. **Iván Peñuelas Sánchez**, Profesor Titular de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra,

CERTIFICA:

Que Dña. **María De Arcocha Torres** ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis doctoral titulado “Radiomarcaje de nanopartículas de albúmina con radiometales (tecnecio-99m, galio-67, zirconio-89) y estudio de su biodistribución mediante imagen molecular”.

El resultado de sus investigaciones queda expuesto en esta memoria, que una vez revisada reúne los requisitos de calidad y originalidad requeridos por la ley.

Por ello, doy mi conformidad para su presentación y defensa con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo la presente certificación.

Iván Peñuelas Sánchez

Dña. **Gemma Quincoces Fernández**, radiofarmacéutica de la Unidad de Radiofarmacia de la Clínica Universidad de Navarra,

CERTIFICA:

Que Dña. **María De Arcocha Torres** ha realizado bajo su co-dirección el trabajo de tesis doctoral titulado “Radiomarcaje de nanopartículas de albúmina con radiometales (tecnecio-99m, galio-67, zirconio-89) y estudio de su biodistribución mediante imagen molecular”.

El resultado de sus investigaciones queda expuesto en esta memoria, que una vez revisada reúne los requisitos de calidad y originalidad requeridos por la ley.

Por ello, doy mi conformidad para su presentación y defensa con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo la presente certificación.

Gemma Quincoces Fernández

“Me enseñaron que el camino del progreso no es rápido ni fácil”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente el apoyo de todas las personas que han colaborado en la elaboración del presente trabajo, y muy especialmente:

Al Dr. Iván Peñuelas, Director de esta Tesis Doctoral, por embarcarme en esta aventura. Gracias por la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo, así como todos los medios puestos a mi alcance para poder llevarlo a cabo. Siempre has sido mi referente profesional y para mí es un orgullo ser tu doctoranda.

A la Dra. Gemma Quincoces, co-directora de esta Tesis Doctoral, por su apoyo constante durante la realización de la misma. Gracias por tener siempre una palabra de ánimo cuando la he necesitado. Gracias por todos los momentos vividos, porque desde que nos conocimos tuvimos una conexión especial, que con el paso del tiempo se ha convertido en una gran amistad que espero dure para siempre.

Quiero agradecer de manera muy especial y sincera al verdadero promotor de esta tesis, el Dr. Ignacio Banzo, Jefe del Servicio de Medicina Nuclear del HUMV. Gracias por tu paciencia y apoyo infinito, por tener una palabra de ánimo, un abrazo o una regañina siempre que lo necesito. Gracias por ser el mejor jefe y amigo que se puede tener.

A la Dra. Isabel Martínez, mi “maripuri”. Gracias por estar siempre conmigo, celebrando los buenos momentos y llorando en los no tan buenos.

Al personal del Servicio de Medicina Nuclear de la Clínica Universidad de Navarra, por permitirme hacer allí parte de este trabajo. Gracias por hacerme sentir una más cada vez que estoy allí.

A la Dra. María Collantes y a Margarita Ecay, de la Unidad de Investigación MicroPet de la Clínica Universidad de Navarra, por su inestimable ayuda en el manejo de los animales y la adquisición de imágenes.

Al personal del Departamento de Tecnología y Química Farmacéutica de la Universidad de Navarra, especialmente al Dr. Juan Manuel Irache y la Dra. Ana Luisa Martínez López, por abrirme las puertas de su departamento y brindarme toda la ayuda necesaria.

A todos mis compañeros del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, por apoyarme y animarme durante todo este proceso.

A mis amigos, en especial a mi amiga Marta, por estar ahí siempre que la necesito, a pesar del tiempo y la distancia.

A todas aquellas personas que de una manera u otra me han animado y ayudado durante la elaboración de este trabajo.

Por último quiero expresar mi agradecimiento a lo más importante de mi vida, mi familia.

A mis sobrinos, Gonzalo y Marta porque pase lo que pase siempre conseguís sacarme una sonrisa.

A mi hermano Manolo, por ser un referente para mí, ya que eres sin duda la mejor persona que me encontraré en mi vida.

A mi tía Mari, porque sé que hubieras estado en primera fila como la tía más orgullosa del mundo.

A mi cuñada y al resto de mi familia, por su apoyo durante la elaboración de esta tesis.

A mis padres, porque gracias a ellos soy como soy. Gracias por los valores que me habéis transmitido, por apoyarme y animarme siempre.

A mi padre, gracias por hacerme sentir siempre que eras el padre más orgulloso de mundo. Aunque no estés aquí te siento siempre conmigo.

A mi madre, por ser, junto con mi padre, lo más importante de mi vida. La bondad, el amor a la familia y una inquebrantable fuerza de voluntad te caracterizan. Todo el mundo cree que su madre es la mejor, sin duda, no te conocen.

A mi familia, en especial a mi padre

“Solo se muere cuando se olvida, y yo nunca te olvido”

Coco

TABLA DE CONTENIDO

I.	ABREVIATURAS	23
II.	INTRODUCCIÓN	29
1	RADIOFARMACIA Y RADIOFÁRMACOS	31
2	RADIOFARMACIA DEL TECNECIO-99M	37
	2.1 RADIOQUÍMICA DEL TECNECIO-99M	37
	2.2 RADIOFÁRMACOS MARCADOS CON TECNECIO-99M	42
3	RADIOFARMACIA DEL GALIO	46
	3.1 RADIOQUÍMICA DEL GALIO	46
	3.2 RADIOFÁRMACOS MARCADOS CON GALIO-67	48
4	RADIOFARMACIA DEL ZIRCONIO-89	50
	4.1 RADIOQUÍMICA DEL ZIRCONIO-89	50
	4.2 RADIOFÁRMACOS MARCADOS CON ZIRCONIO-89	52
5	TÉCNICAS DE RADIOMARCAJE CON QUELANTES BIFUNCIONALES ...	55
	5.1 QUELANTES BIFUNCIONALES	55
	5.1.1 <i>Ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)</i>	57
	5.1.2 <i>Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA)</i>	58
	5.1.3 <i>Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA)</i>	59
	5.1.4 <i>Deféroxamina (DFO)</i>	61
	5.2 UNIÓN DEL QUELANTE A LA MOLÉCULA DE INTERÉS	62
6	TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR	64
	6.1 TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA POR EMISIÓN DE FOTÓN ÚNICO (SPECT)	66
	6.2 TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)	68
7	NANOTECNOLOGÍA E IMAGEN MOLECULAR	72
	7.1 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA	72
	7.2 NANOPARTÍCULAS PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	77

7.3 NANOPARTÍCULAS MARCADAS CON RADIOISÓTOPOS RADIACTIVOS	80
7.3.1 <i>Marcaje de nanopartículas con tecnecio-99m</i>	83
7.3.2 <i>Marcaje de nanopartículas con galio-67</i>	83
7.3.3 <i>Marcaje de nanopartículas con zirconio-89</i>	84
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	87
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
1 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M.....	93
1.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	93
1.2 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M	96
1.2.1 <i>Optimización de la concentración de cloruro de estaño</i>	96
1.2.2 <i>Marcaje de nanopartículas con tecnecio-99m</i>	97
1.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD IN VITRO.....	99
1.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN IN VIVO	100
1.5. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN EX VIVO	102
2 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67	103
2.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON NOTA.....	103
2.1.1 <i>Conjugación de la albúmina con NOTA</i>	103
2.1.2 <i>Preparación de las nanopartículas de albúmina modificadas con NOTA</i>	105
2.2 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67.	106
2.2.1 <i>Conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67</i>	106
2.2.2 <i>Marcaje con galio-67 y purificación de las nanopartículas</i>	108
2.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD <i>IN VITRO</i>	110
2.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i>	111
2.5 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>EX VIVO</i>	112
2.6 MARCAJE CON GALIO-67 DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ALBÚMINA NO MODIFICADAS CON NOTA.....	112
3 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON ZIRCONIO-89	114
3.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	114
3.1.1 <i>Conjugación de la albúmina con DFO</i>	114

3.1.2 Preparación de las nanopartículas de albúmina modificada con DFO	115
3.2 MARCAJE CON GALIO-67 DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	117
3.2.1 Estudios de estabilidad de las nanopartículas marcadas	118
3.3 MARCAJE CON ZIRCONIO-89 DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	118
V. RESULTADOS	121
1 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M	123
1.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	123
1.2 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M	124
1.2.1 Optimización de la concentración de cloruro de estaño	124
1.2.2 Optimización del tiempo de marcaje	126
1.2.3 Optimización de la temperatura de incubación	127
1.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD IN VITRO	129
1.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN IN VIVO	133
1.5 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN EX VIVO	134
2 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67	136
2.1 OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON NOTA	136
2.1.1 Conjugación de la albúmina con el NOTA	136
2.1.2 Preparación de las nanopartículas de albúmina modificada con NOTA	138
2.2 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67	140
2.2.1 Conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67	140
2.2.2 Marcaje con galio-67 y purificación de las nanopartículas	141
2.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD IN VITRO	143
2.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN IN VIVO	146
2.5 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN EX VIVO	148
2.6 MARCAJE CON GALIO-67 DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ALBÚMINA NO MODIFICADAS CON NOTA	149
3 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON ZIRCONIO-89	150
3.1 OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	150
3.2 MARCAJE CON GALIO-67 DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	151

3.2.1	<i>Estudios de estabilidad de las nanopartículas modificadas con DFO marcadas con galio-67</i>	152
3.3	MARCAJE CON ZIRCONIO-89 DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS CON DFO	155
VI.	DISCUSIÓN	157
VII.	CONCLUSIONES	173
VIII.	ANEXOS	177
	ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS:	179
	COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS A CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS:	179
IX.	INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	191
	FIGURAS.....	193
	TABLAS.....	197
X.	BIBLIOGRAFÍA	201

I. ABREVIATURAS

[¹¹C]C-colina: [metil-¹¹C]colina

[¹¹C]C-flumazenil: Etil 8-fluoro-5[¹¹C]metil-6-oxo-4H-imidaz[1,5-a][1,4]benzodiazepina-3-carboxilato

[¹¹C]C-PIB: N-Methyl-[¹¹C]-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiasole

[¹⁸F]FDG: 2-[¹⁸F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa

[⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC: [⁶⁸Ga]DOTA-edotreotida

[^{99m}Tc]Tc-IDA: [^{99m}Tc]Tc-ácido N-(3-bromo-2,4,6-trimetilfenilcarbamoil metil)-iminodiacético,

[^{99m}Tc]Tc-MAG-3: [^{99m}Tc]Tc-mercaptoacetiltriglicina

[^{99m}Tc]Tc-DTPA: [^{99m}Tc]Tc-ácido dietilentriaminopentaacético

[^{99m}Tc]Tc-DMSA: [^{99m}Tc]Tc-ácido dimercaptosuccínico

[^{99m}Tc]Tc-MAA: [^{99m}Tc]Tc-macroagregados de albúmina

[^{99m}Tc]Tc-ECD: [^{99m}Tc]Tc-dímero de etilencisteína

[^{99m}Tc]Tc-HMPAO: [^{99m}Tc]Tc-hexametil propilen amino oxima

[^{99m}Tc]Tc-PYP: [^{99m}Tc]Tc-pirofosfato

[^{99m}Tc]Tc-MIBI: [^{99m}Tc]Tc-metoxi-isobutil-isonitrilo

[^{99m}Tc]Tc-DPD: [^{99m}Tc]Tc-Ácido 3,3-difosfono-1,2-propanodicarboxílico

[^{99m}Tc]NaTcO₄: pertecnetato sódico de tecnecio-99m

[¹²³I/¹³¹I]MIBG: Yodo-123/yodo-131-metayodobenzilguanidina

3,4,3-(Li-1,2-HOPO): N,N'-1,4-Butanodilbis(N-(3-(((1,6-dihidro-1-hidroxi-6-oxo-2-piridinil)carbonil)amino)propil)-1,6-dihidro-1-hidroxi-6-oxo-2-piridincarboxamida

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BFCA: Agente quelante bifuncional

DFO: Deferoxamina

DLS: Dispersión dinámica de la luz

DS: Desviación estándar

DOTA: Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

DOTAGA: Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano,1-(ácido glutárico)-4,7,10-triacético

DTPA: Ácido dietiltri Aminopentaacético

EDDA: Ácido N,N-etilendiaminodiacético

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GANTREZ AN-119: Copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico

GMN₂: Polímero conjugado de Gantrez AN-119-manosamina

GPM₂: Polímero conjugado de Gantrez AN-119-polietilenglicol 2000

GTM₂: Polímero conjugado de Gantrez AN-119-tiamina

HEPES: Ácido 4-(hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HPMC: Hidroxi-propil-metil-celulosa

HYNIC: Hidrazinonicotinamida

NP: Nanopartícula

NOTA: Ácido 1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-triacético

NODAGA: Ácido 1,4,7-triazaciclononan(ácido glutárico)-4,7-triacético

NOTA-p-Bn-SCN: Ácido 2-S-(4-isotiociantobencil)-1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-triacético

PDI: Índice de polidispersión

PET: Tomografía por emisión de positrones

p-NCS-Bz-DFO: N1-hidroxi-N1-(5-(4-(hidroxi(5-(3-(4-isotiocianatofenil)tioureido)pentil)amino)-4-oxobutanamido)pentil)-N4-(5-(N-hidroxiacetamido)pentil)succinamida

PRQ: Pureza radioquímica

Radio-TLC: Radiocromatografía en capa fina

Rf: factor de retención

RMN: Resonancia magnética nuclear

RO: Alcoxi

RO₂: Peroxi

SnCl₂: Cloruro de estaño

SPECT: Tomografía por emisión de fotón único

T_{1/2}: Periodo de semidesintegración

TC: Tomografía computerizada

VOI: Volumen de interés

II.INTRODUCCIÓN

En este capítulo se hace una breve introducción sobre la radiofarmacia, la radioquímica del tecnecio-99, galio-67 y zirconio-89 y los radiofármacos marcados con estos radioisótopos. También se hace un repaso sobre las técnicas de imagen molecular y el empleo de nanopartículas (NP) como sistemas para la administración de radiofármacos

1 RADIOFARMACIA Y RADIOFÁRMACOS

La **Radiofarmacia** es una ciencia que estudia los aspectos farmacéuticos, químicos, bioquímicos, biológicos y físicos de los radiofármacos, aplicando dichos conocimientos en los procesos de diseño, producción, preparación, control de calidad y dispensación, tanto en su vertiente asistencial (diagnóstica y terapéutica) como en investigación (1).

Un **radiofármaco** es cualquier producto que cuando está preparado para su uso, con finalidad diagnóstica o terapéutica, contiene uno o más radionucleidos (radioisótopos radiactivos). La finalidad diagnóstica o terapéutica del mismo depende del tipo de desintegración del radioisótopo empleado.

La **Medicina Nuclear** es la especialidad médica que utiliza los radiofármacos para el diagnóstico, tratamiento e investigación de enfermedades. Se basa en la administración de los radiofármacos por diferentes vías y la posterior visualización de su biodistribución en el organismo mediante la utilización de un aparato detector de radiación.

Desde el punto de vista estructural, los radiofármacos son compuestos que poseen en su constitución algún átomo radiactivo. Su estructura química puede ser muy diversa, pudiendo tratarse de simples átomos radiactivos o compuestos radiomarcados. El marcaje de compuestos se basa en la asociación de un radionucleido y una molécula orgánica o inorgánica que se dirige de forma selectiva hacia una diana específica en respuesta a condiciones fisiológicas o fisiopatológicas concretas (2).

La emisión radiactiva ha de ser adecuada en función de su utilidad diagnóstica (emisión gamma, captura de electrones, emisión de positrones) o terapéutica (emisión alfa y beta). En el caso de los radiofármacos de uso diagnóstico la emisión radiactiva debe ser lo suficientemente penetrante para poder ser detectada desde el exterior del cuerpo del sujeto de estudio, y adecuada a los equipos de detección empleados en la práctica clínica.

En la tabla 1 se detallan los radionucleidos más utilizados en radiofarmacia y sus principales características.

RN	Emisión	Energía principal* (KeV)	Periodo de semidesintegración ($T_{1/2}$)	Utilidad
Tecnecio-99m	Gamma	140	6 horas	Diagnóstica
Galio-67	Gamma	93	3,2 días	Diagnóstica
Talio-201	Gamma	70	3,05 días	Diagnóstica
Indio-111	Gamma	245	2,83 días	Diagnóstica
Yodo-123	Gamma	159	13,1 horas	Diagnóstica
Yodo-125	Gamma	27	60,1 días	Diagnóstica

Yodo-131	Beta/Gamma	606/364	8 días	Diagnóstico/ Terapia
Itrio-90	Beta	2.284	2,67 días	Terapia
Radio-223	Alfa/Gamma	5.715/84	11,4 días	Terapia
Actinio-225	Alfa	5.935	10 días	Terapia
Renio-186	Beta	1077	3,78 días	Terapia
Lutecio-177	Beta/Gamma	497/208	6,7 días	Terapia
Erbio-169	Beta	350	9,4 días	Terapia
Estroncio-89	Beta	1.460	50,5 días	Terapia
Samario-153	Beta/Gamma	702/103	1,95 días	Terapia
Carbono-11	Emisión positrones	960	20,4 min	Diagnóstica
Flúor-18	Emisión positrones	634	109,8 min	Diagnóstica
Nitrógeno-13	Emisión positrones	1190	9,98 min	Diagnóstica
Oxígeno-15	Emisión positrones	1723	2,05 min	Diagnóstica
Galio-68	Emisión positrones	1900	68 min	Diagnóstica

Zirconio-89	Emisión positrones	897	78,4 horas	Diagnóstica
-------------	--------------------	-----	------------	-------------

*Máxima en el caso de partículas

RN: Radionucleido. KeV: Kiloelectronvoltio

Tabla 1. Radionucleidos empleados en radiofarmacia y sus principales características

La vida media efectiva del radiofármaco es la combinación de la vida media biológica (tiempo necesario para que la mitad del radiofármaco desaparezca del organismo debido a procesos biológicos como la absorción, distribución, metabolización, excreción, etc..) y la vida media física (tiempo necesario para que la mitad de los átomos de una sustancia radiactiva se desintegren, y la actividad de la misma se reduzca a la mitad). Los radiofármacos empleados en diagnóstico han de tener una vida media efectiva relativamente corta, idealmente de 1 a 1,5 veces el tiempo necesario para realizar el estudio, con el fin de minimizar la radiación al paciente. Sin embargo, en los radiofármacos de uso terapéutico interesa que su vida media efectiva sea más larga (días) con el fin de obtener el efecto terapéutico deseado.

La radiación inherente al radiofármaco es un efecto inevitable para el paciente por lo que antes de su administración hay que valorar la relación coste/beneficio. El radiofármaco ideal es aquel que presenta una dosis absorbida alta en el órgano diana cuando se quiere conseguir un efecto terapéutico y una dosis efectiva baja en su aplicación diagnóstica.

El tipo de desintegración del radionucleido debe ser adecuado a su uso. Los radiofármacos destinados a un uso diagnóstico deben decaer mediante emisión gamma, captura de electrones o emisión de positrones, con una energía adecuada para poder ser detectada por los equipos de imagen y sin emisión de partículas alfa o beta. Los radiofármacos empleados con fines terapéuticos deben emitir partículas alfa o beta con el fin de producir daños biológicos que lleven finalmente a la muerte celular.

Una vez administrados al paciente, cada radiofármaco tiene afinidad por un determinado órgano o tejido, localizándose en él mediante diferentes mecanismos. Estos mecanismos de localización son muy variados como puede verse en la tabla 2.

Mecanismo de localización	Radiofármacos
Transporte activo	$[^{131}\text{I}]\text{-NaI}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, $[^{131}\text{I}]\text{I-norcolesterol}$, $[^{123}\text{I}/^{131}\text{I}]\text{MIBG}$, $[^{201}\text{Tl}]$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-IDA}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG-3}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-DTPA}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-DMSA}$
Bloqueo capilar	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAA}$
Secuestro celular	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-hematíes}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-plaquetas}$
Difusión pasiva	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-PYP}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MIBI}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-glucoheptonato}$
Fagocitosis	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-coloides}$
Adsorción físico-química	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-HDP}$, $[^{18}\text{F}]\text{fluoruro de sodio}$
Unión a transportadores	$[^{11}\text{C}]\text{C-dihidotetrabenazina}$, $[^{18}\text{F}]\text{DPA-714}$
Quimiotaxis	$[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO-leucocitos}$
Sustrato metabólico	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$
Unión a receptores	$[^{123}\text{I}]\text{Iobenguano}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-octreótido}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-octreótido}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$, $[^{11}\text{C}]\text{C-flumazenil}$, $[\text{metil-}^{11}\text{C}]\text{racloprida}$
Metabolismo aminoácidos	$[^{11}\text{C}]\text{C-colina}$, $\text{L-}[\text{metil-}^{11}\text{C}]\text{metionina}$

Unión a proteínas	$[^{11}\text{C}]\text{C-PIB}$, $[^{18}\text{F}]\text{flutemetamol}$, $[^{18}\text{F}]\text{florbetaben}$, $[^{18}\text{F}]\text{florbetapir}$
-------------------	---

Tabla 2. Mecanismo de localización de los radiofármacos

2 RADIOFARMACIA DEL TECNECIO-99M

2.1 Radioquímica del tecnecio-99m

El tecnecio es un elemento con símbolo químico Tc y número atómico 43 perteneciente al grupo VIIB de la tabla periódica. Fue descubierto en 1937 por Perrier y Segré en una placa de molibdeno previamente irradiada con deuterones, perteneciente a un deflector del ciclotrón de Berkeley (UCLA) (3). Su nombre proviene del griego τεχνητος, que significa “artificial”, ya que fue el primer elemento obtenido de esta forma.

El **tecnecio-99m** es un isótopo metaestable, es decir, su núcleo permanece excitado durante un periodo prolongado de tiempo antes de emitir un fotón gamma, regresando al estado más estable tecnecio-99. Se obtiene a partir del decaimiento radiactivo del molibdeno-99, obtenido por fisión nuclear del uranio-235.

El tecnecio-99m es el radioisótopo más utilizado en medicina nuclear ya que sus características físicas y químicas lo hacen muy adecuado para su uso clínico. Su periodo de semidesintegración de 6 horas y la radiación gamma de baja energía (140 KeV), permiten la obtención de imágenes de alta calidad con una baja tasa de irradiación del paciente. Además, se obtiene fácilmente, de forma estéril y apirógena, mediante la utilización de un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m (figura 1).

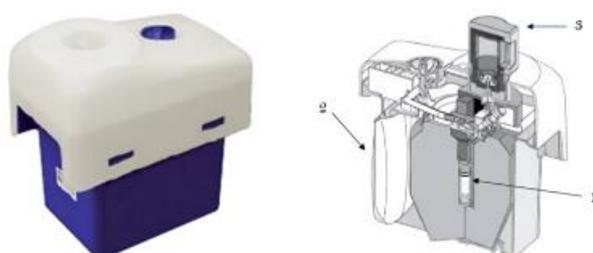


Figura 1. Imagen de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ comercial (Tekcis®, Curium Pharma) visto por fuera y por dentro. Los principales componentes del generador son la columna de alúmina donde se encuentra embebido el ^{99}Mo (1), la bolsa de solución salina para la elución (2) y el vial de vacío con su contenedor plomado para la elución del tecnecio-99m (3).

El **generador** es un sistema que incorpora un radionucleido (padre) que en su desintegración radiactiva origina otro radionucleido (hijo), que se utiliza como parte integrante de un radiofármaco.

El generador de molibdeno-99/tecnecio-99m es un sistema compuesto por un radionucleido padre con un periodo de semidesintegración largo (molibdeno-99, $T_{1/2} = 2,75$ días), que se desintegra para dar lugar a un radionucleido hijo con un periodo de semidesintegración corto (tecnecio-99m, $T_{1/2} = 6$ horas), en la forma química de pertecnetato de sodio ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$), donde el tecnecio-99m se encuentra en estado de oxidación VII. En la figura 2 se muestra el esquema de desintegración del molibdeno-99.

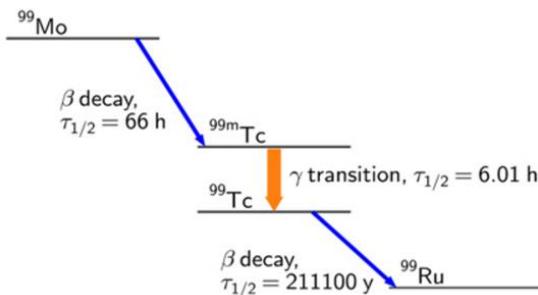


Figura 2. Esquema de desintegración del Molibdeno-99

El tecnecio-99m presenta 8 estados de oxidación que van del (VII) al (-I), siendo los más estables el (VII), (V), (IV), (III), (I) y 0.

El mayor estado de oxidación es el (VII) y corresponde al anión pertechnetato ($^{99}\text{TcO}_4^-$), que se obtiene a partir de la elución con suero fisiológico de un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m.

Los estados de oxidación más importantes en la química del tecnecio-99m son el (I), (III) y (V) por lo que se requiere la reducción a un estado de oxidación menor del $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ obtenido a partir del generador. Para ello se recurre a la adición de un agente reductor.

En la década de los 70 se emplearon como agentes reductores el ácido ascórbico o el cloruro ferroso (4, 5). El ácido ascórbico provoca una reducción incompleta del $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$, requiriéndose una etapa de purificación previa a su administración al paciente, mientras que el cloruro ferroso requiere un pH ácido para que se produzca la reducción. Posteriormente, se desarrollaron agentes reductores más fuertes como el ditionito sódico (6, 7) y el borohidruro de sodio (8, 9), que pueden ser utilizados a pH alcalino y no requieren de una etapa de purificación.

En la actualidad, el agente reductor más comúnmente utilizado es el cloruro de estaño (SnCl_2) (figura 3), que es una sal no tóxica y estable frente a la liofilización y la atmósfera inerte presente en las formulaciones comerciales. El grado de reducción depende de diversos factores: oxígeno presente, la relación estequiométrica estaño/tecnecio-99m, las condiciones de reacción, la presencia de un quelante y la naturaleza química del mismo.

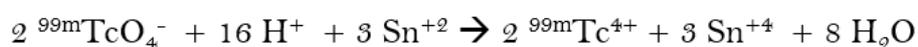


Figura 3. Reacción de reducción de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ empleando como agente reductor el SnCl_2

La concentración de átomos de tecnecio-99m en el eluido es baja, del orden nanomolar, por lo que la cantidad de sal de estaño necesaria para su completa reducción es baja. A pesar de ello, en las formulaciones comerciales, el SnCl_2 se añade en exceso con el fin de asegurar la reducción total, siendo la relación entre los iones del estaño y los átomos de tecnecio de 10^4 a 10^6 veces superior a la necesaria para que se produzca la reducción (10, 11).

También pueden emplearse otras sales de estaño como el citrato de estaño, fluoruro de estaño o el tartrato de estaño (12).

En general, el rendimiento de los marcajes con tecnecio-99m es superior al 90%, pero en ocasiones este porcentaje se ve reducido por la aparición de las siguientes impurezas:

1. Tecnecio-99m libre: la presencia de oxígeno del aire en el interior del vial provoca la oxidación del agente reductor disminuyendo su disponibilidad para reducir el tecnecio-99m. Además, una elevada concentración de tecnecio-99m en presencia de oxígeno puede dar lugar a una reacción de radiólisis con agua u otros componentes del vial produciendo radicales

libres hidroxilo (OH), alcoxi (RO) y peroxi (RO₂), que pueden producir la radiólisis de los radiofármacos incrementando la cantidad de tecnecio-99m libre. La aparición de esta impureza se puede minimizar añadiendo un exceso de agente reductor, eliminando el oxígeno mediante la inyección de nitrógeno para obtener una atmósfera inerte, o mediante la adición de agentes antioxidantes como los ácidos ascórbico y genticónico (13).

2. Tecnecio reducido o hidrolizado: el tecnecio-99m reducido puede sufrir un fenómeno de hidrólisis en soluciones acuosas dando lugar a diferentes especies hidrolizadas (figura 4). Dicha hidrólisis puede competir con el proceso de quelación reduciendo su rendimiento. Los compuestos de estaño empleados como agentes reductores también pueden sufrir este fenómeno de hidrólisis cuando se encuentran en solución acuosa a un pH de 6-7 dando lugar a la formación de coloides insolubles, que se unen posteriormente al tecnecio-99m reducido, comprometiendo el marcaje del quelante. Para prevenir el fenómeno de hidrólisis se recomienda añadir un medio ácido para prevenir la hidrólisis del estaño antes de la reducción del tecnecio-99m y un exceso de quelante para garantizar la reacción de marcaje (13).

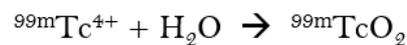


Figura 4. Reacción de formación de ^{99m}Tc reducido hidrolizado

2.2 Radiofármacos marcados con tecnecio-99m

La mayoría de los radiofármacos empleados en medicina nuclear tienen finalidad diagnóstica, de los cuales al menos el 80 % están marcados con tecnecio-99m; en su mayor parte son compuestos de coordinación (14).

Los ligandos típicos para la formación de complejos con tecnecio-99m suelen tener un grupo dador de electrones tales como la amida, amina, tiol, fosfina, oxima o isonitrilo, dando lugar a compuestos monodentados. En ocasiones pueden tener dos o más grupos dadores, formando complejos bidentados o polidentados (15).

Generalmente, son complejos metálicos que se preparan mediante la reducción del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ a un estado de oxidación menor.

Según su diseño, los radiofármacos marcados con tecnecio-99m se dividen en tres categorías (figura 5):

1. Radiofármacos de primera generación: son compuestos marcados que son captados por distintos órganos sin un receptor específico, aprovechando en ocasiones procesos fisiológicos para visualizar su distribución biológica en el organismo.
2. Radiofármacos de segunda generación: son el resultado del desarrollo de compuestos de coordinación bien caracterizados donde el metal se une a un ligando con una geometría bien definida, como los complejos Tc(V)-oxo. Su biodistribución depende de sus características fisicoquímicas (carga total, peso molecular, forma y lipofilia).
3. Radiofármacos de tercera generación: permiten la obtención de imágenes de dianas moleculares específicas. Se utiliza un quelante bifuncional (BFCA) que se localiza entre el tecnecio-99m y un fragmento bioactivo, que puede ser un péptido, proteína, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y oligonucleótidos (16).

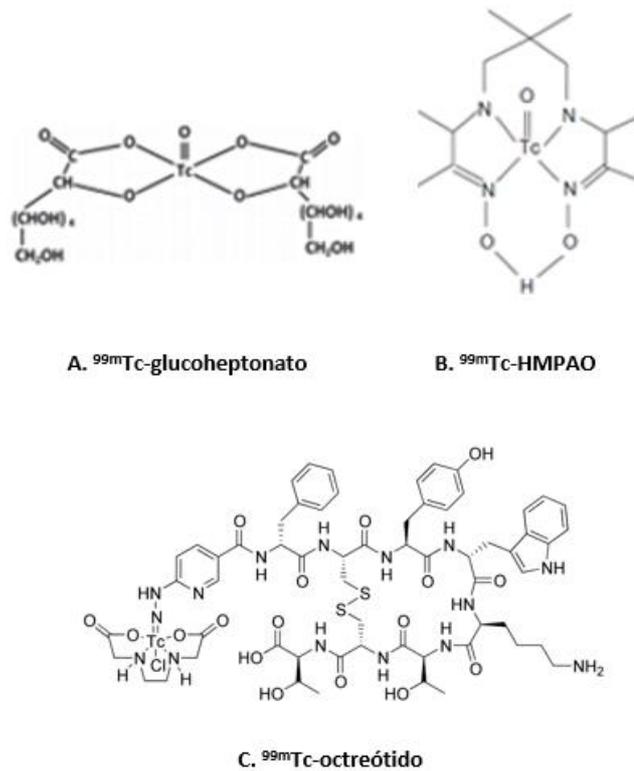


Figura 5. Estructura química de un radiofármaco tecneciado de primera generación (A), segunda generación (B) y tercera generación (C)

En la práctica clínica, el marcaje de los radiofármacos con tecnecio-99m se lleva a cabo en Unidades de Radiofarmacia mediante un procedimiento de preparación extemporánea, la cual se suministra inmediatamente después de su preparación.

Generalmente se utilizan **equipos reactivos** comerciales que se componen de uno o varios viales que contienen todos los reactivos necesarios para el marcaje: la molécula que se desea marcar, el agente reductor, el quelante, el buffer para ajustar el pH y aditivos como agentes antimicrobianos, excipientes y antioxidantes.

Es importante que los viales tengan una atmósfera inerte (vacío o inyección de nitrógeno) ya que la presencia de oxígeno en el vial puede causar la oxidación del ión estannoso (Sn^{+2}) a estánnico (Sn^{+4}), disminuyendo la cantidad disponible para la reducción del $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$. Asimismo, el tecnecio-99 reducido puede reoxidarse y convertirse de nuevo en $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$, por lo que la cantidad de tecnecio-99m reducido disponible puede no ser suficiente para el marcaje completo del ligando.

Además, los equipos reactivos se encuentran liofilizados lo que incrementa su estabilidad y la posibilidad de producirlos de forma industrial.

El marcaje de compuestos químicos con tecnecio-99m puede ser directo o indirecto. El marcaje directo se lleva a cabo mediante la inyección en el vial de la cantidad necesaria de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$, obtenido de un generador. En general, el marcaje se lleva a cabo a temperatura ambiente aunque hay radiofármacos que requieren un incremento de la temperatura para su correcto marcaje ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MIBI}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG-3}$)

El marcaje indirecto requiere un proceso de transquelación. En primer lugar, el tecnecio-99m reducido reacciona con un ligando débil para posteriormente reaccionar con un ligando fuerte capaz de desplazar al ligando débil, formándose un complejo tecnecio99m-ligando más estable (ejm; $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG-3}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-ECD}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-tetrofosmina}$). Este método se emplea en el caso de quelantes poco solubles en agua, que requieren calentamiento o largos procesos de tiempo para disolverse.

El marcaje de péptidos y proteínas con tecnecio-99m también puede ser directo o indirecto. El marcaje directo se enfoca al empleo de agentes oxidantes o reductores que generan especies electrofílicas de los átomos radiactivos, que posteriormente reaccionan con el grupo funcional del péptido. Este método se aplica sólo a proteínas o a sus fragmentos (17).

El marcaje indirecto involucra el uso de BFCA. En este caso el radiofármaco se obtiene por reducción directa del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ en presencia del conjugado BFCA-peptido.

El BFCA ideal es aquel capaz de formar un complejo estable con el tecnecio-99m con un elevado rendimiento y una muy baja concentración del mismo (18). Los BFCA más utilizados en el marcaje con tecnecio son la hidrazinonicotinamida (HYNIC) y el diaminaditiol (N_2S_2), ya que han mostrado una elevada eficiencia en el marcaje de pequeños péptidos (18).

Generalmente, la conjugación del péptido se produce a través de la reacción entre un grupo amino primario del péptido y un grupo éster o isotiocianato del BFCA, o entre un grupo sulfhidrilo del péptido y un grupo maleimida del BFCA (figura 6) (18).

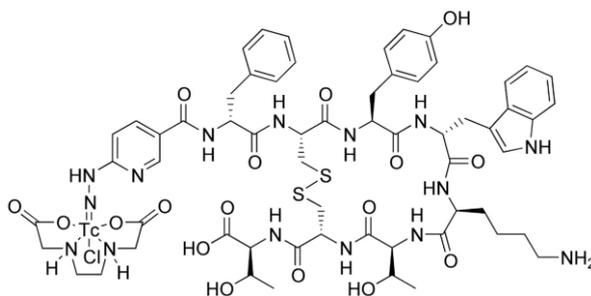


Figura 6. Estructura química del ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -octreótido). El péptido se une al quelante y posteriormente se une al radiometal

3 RADIOFARMACIA DEL GALIO

3.1 Radioquímica del galio

El galio es un metal de transición perteneciente al grupo 13 (IIIa) de la tabla periódica, de número atómico 31. Fue descubierto mediante espectroscopía por Lecoq de Boisbaudran en 1875 al examinar una blenda de zinc procedente de los Pirineos, observándose su característico espectro formado por dos líneas ultravioletas (19).

Sus radioisótopos radiactivos más importantes son los emisores de positrones galio-66 ($T_{1/2} = 9,49$ h) y galio-68 ($T_{1/2} = 67,84$ min) y el emisor gamma galio-67 ($T_{1/2} = 78,26$ h).

El galio-66 se produce mediante la irradiación con protones de un blanco de zinc natural o zinc enriquecido, produciéndose las reacciones nucleares ${}^{\text{nat}}\text{Zn}(p,n){}^{66}\text{Ga}$ y ${}^{66}\text{Zn}(p,2n){}^{66}\text{Ga}$. Posteriormente, el galio-66 se purifica mediante cromatografía de intercambio catiónico o extracción de solventes (20, 21).

El galio-68 se obtiene mediante la irradiación con protones de un blanco de zinc enriquecido produciéndose la reacción nuclear ${}^{68}\text{Zn}(p,2n){}^{68}\text{Ga}$ (22). También se puede

obtener a partir de un generador de germanio-68/galio-68, lo cual facilita su uso en la práctica clínica ya que no requiere tener las complejas instalaciones de un ciclotrón, pudiéndose emplear en Unidades de Radiofarmacia convencionales (23). El principal inconveniente del galio-68 es su corto $T_{1/2}$ (67,84 min), que impide su utilización en estudios que requieren tiempos prolongados.

El **galio-67** es un emisor gamma puro que decae por captura electrónica a zinc-67, con un $T_{1/2}$ de 78,26 horas que permite su utilización en estudios de biodistribución a tiempos largos. Se produce en un ciclotrón mediante la irradiación con protones de un blanco de zinc produciéndose la reacción nuclear $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$ (24, 25).

El blanco es una placa metálica de zinc o cobre recubierta por una fina capa de zinc-68 enriquecido. El galio-67 producido se disuelve en un ácido y se separa del zinc mediante diferentes métodos como la extracción líquido/líquido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de extracción o cromatografía de intercambio aniónico (26, 27).

En condiciones fisiológicas, el galio presenta un estado de oxidación III. En solución acuosa, el catión Ga^{+3} sólo es estable en condiciones ácidas, ya que en el rango de pH 3-7 y en ausencia de ligandos estabilizantes, se produce la hidrólisis del Ga^{+3} a la forma insoluble trihidróxido de galio ($[\text{Ga}(\text{OH})_3]$). A pH superior a 7 el hidróxido de galio se redisuelve como tetraóxido de galio ($[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$) (28).

La formación de este complejo insoluble supone un problema en el marcaje con galio de ligandos multidentados, cuya cinética de marcaje es lenta ya que reduce la posibilidad de unión del ligando al galio. Este proceso se puede evitar mediante una reacción de intercambio de ligandos en presencia de ligandos estabilizantes débiles como el citrato, acetato u oxalato (29).

El catión Ga^{+3} se clasifica como un ácido fuerte de Lewis debido a su alta densidad de carga y pequeño radio iónico, formando complejos termodinámicamente estables con carboxilatos, fosfonatos y aminas.

3.2 Radiofármacos marcados con galio-67

En la práctica clínica, el galio-67 ha sido ampliamente utilizado en forma de citrato para el diagnóstico de tumores y patologías infecciosas e inflamatorias (30, 31, 32).

El galio-67 presenta unas características químicas análogas al hierro (III), por lo que se une fuertemente a las proteínas plasmáticas transferrina y lactoferrina. El galio-67 unido a la transferrina atraviesa el endotelio capilar y es captado por el receptor de transferrina que se encuentra en la superficie celular. Estos receptores son incorporados al interior de la célula por endocitosis donde el galio es transferido a la ferritina, produciéndose su retención.

La acumulación del galio-67 en los focos inflamatorios e infecciosos se debe fundamentalmente a fenómenos de hipervascularización e incremento de la permeabilidad vascular, y a la formación de complejos con la lactoferrina liberada por los leucocitos y los sideróforos que producen las bacterias (30, 33).

El citrato de galio-67 ha mostrado utilidad en tumores con una alta tasa de síntesis de ADN, donde los receptores de transferrina se encuentran sobreexpresados y en aquellos donde se produce un incremento de lactoferrina (linfomas) (34).

Cuando se desea marcar con galio-67 una molécula con actividad biológica como un péptido o proteína se requiere la utilización de un BFCA que sirva de nexo de unión entre la molécula y el radioisótopo.

Los BFCAs más adecuados para fines radiofarmacéuticos deben formar complejos de alta estabilidad termodinámica e inercia cinética para evitar cualquier cambio prematuro en la reacción de marcaje (35).

A la hora de elegir un BCFA para el marcaje con galio-67 hay que tener en cuenta la similitud de la química de coordinación del galio y el hierro, ya que la transferrina, proteína muy abundante en el plasma, posee dos sitios de fijación de hierro con alta afinidad por el galio trivalente (29)

En los últimos años se han desarrollado múltiples quelantes para su uso *in vivo*, que presentan una elevada selectividad y estabilidad en el marcaje con los radioisótopos del galio. Los más utilizados son el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-triacético (NOTA), ácido dietiltri Aminopentaacético (DPTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la deferoxamina (DFO) (36, 37, 38).

El galio-67 se ha utilizado para el marcaje de péptidos como el galio-67-DOTATOC, para la visualización de tumores que sobreexpresan receptores de somatostatina (39). El péptido antagonista de los receptores de gastrina galio-67-neo-BOMB1 se ha utilizado en estudios preclínicos para el diagnóstico del cáncer de mama (40). También se ha marcado antagonistas del receptor neuroquinina 1 en el diagnóstico de tumores como el glioma y tumores neuroendocrinos (41).

El galio-67 también se ha empleado en preclínica para el marcaje de moléculas para el diagnóstico de cabeza y cuello como el factor de crecimiento epidérmico (42) y vitaminas como el folato, utilizado en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias y tumores con sobreexpresión del receptor de folato (43).

Por último también son susceptibles de ser marcados con galio-67 los anticuerpos monoclonales como el nimotuzumab para el diagnóstico del mesotelioma pleural (44) y NPs de hierro para determinar su uso como agente terapéutico en tumores de hígado y bazo (45).

4 RADIOFARMACIA DEL ZIRCONIO-89

4.1 Radioquímica del zirconio-89

El zirconio es un metal de transición del grupo IV de la tabla periódica, descubierto en 1789 por Klaproth y aislado por primera vez por Berzelius en el año 1824. Su número atómico es 40 y presenta varios estados de oxidación que incluyen el II, III y IV, siendo este último el más predominante en medio acuoso.

En estado acuoso, el zirconio en estado de oxidación IV, se comporta como un ácido de Lewis, presentando una elevada preferencia por ligandos dadores de aniones oxígeno y nitrógeno en elevados números de coordinación.

El zirconio presenta varios radioisótopos que pueden obtenerse en ciclotrones como el zirconio-86 ($T_{1/2} = 17$ h), zirconio-88 ($T_{1/2} = 85$ d) y zirconio-89 ($T_{1/2} = 78,4$ h).

El isótopo del zirconio más utilizado en medicina nuclear es el **zirconio-89**, que tiene un periodo de semidesintegración de 78,41 horas y decae a itrio-90 mediante emisión de positrones (23 %) y captura electrónica (77 %), emitiendo un fotón con una energía máxima de 897 KeV.

Presenta unas características adecuadas para el marcaje de anticuerpos y su aplicación en técnicas de inmuno-PET. Su vida media es compatible con el tiempo necesario para obtener una buena relación tumor/fondo de los anticuerpos monoclonales radiomarcados, que generalmente tienen una vida media biológica elevada, del orden de días. Además, su energía de emisión (E_{\max} 897 KeV) es adecuada para obtener imágenes con una buena resolución espacial (46, 47).

Los inconvenientes de la utilización del zirconio-89 son su reducida disponibilidad y su emisión gamma de alta energía (908,9 KeV) que puede limitar la dosis radiactiva que puede ser administrada al paciente (48).

El zirconio-89 se produce en un ciclotrón mediante la irradiación con protones de un blanco sólido de itrio-90 produciéndose la reacción nuclear $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$. La separación del zirconio-89 del blanco se puede llevar a cabo empleando métodos de extracción de solventes (49) o resinas de intercambio aniónico (50, 51, 52) o catiónico (53, 54).

Meijs et al (55) desarrollaron uno de los métodos de separación que más se emplean en la actualidad, que consiste en disolver el blanco en ácido clorhídrico 6 M (HCl) y pasar la solución a través de una resina de hidroxamato, que tiene una elevada afinidad por el zirconio-89, quedando este atrapado en la resina. Finalmente, el zirconio-89 es eluido de la resina con una solución de ácido oxálico, pudiendo ser empleado de forma directa en el marcaje de moléculas.

A pesar de que puede usarse de forma directa, el ácido oxálico es tóxico ya que provoca la descalcificación de la sangre y puede ocasionar fallos renales por la formación de cálculos de oxalato de calcio (56). Por ello se recomienda su eliminación antes de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Holland et al (57) desarrollaron un método para la preparación de cloruro de zirconio-89 haciendo pasar el oxalato de zirconio-89 por una columna Sep Pak Light

QMA (Waters), lavándolo con agua y eluyendo posteriormente la columna con HCl 0,1 M, obteniendo el cloruro de zirconio-89.

4.2 Radiofármacos marcados con zirconio-89

La preparación de radiofármacos marcados con zirconio-89 se basa fundamentalmente en el marcaje mediante unión a quelantes. Es muy importante que el complejo formado por el zirconio y la biomolécula sea muy estable ya que si el zirconio-89 se libera puede unirse a las proteínas plasmáticas y al hueso, provocando una irradiación innecesaria al paciente debido a su largo $T_{1/2}$ (58).

Se han utilizado diversos quelantes como el ácido dietiltriaminopentaacético (DTPA) (59) y DOTA (60), observándose una baja estabilidad cinética del compuesto marcado, lo que los hace inadecuados para el marcaje de moléculas.

El quelante que ha mostrado más utilidad en el marcaje con zirconio-89 es la deferoxamina (DFO) que se coordina con el zirconio-89 a través de tres grupos hidroxamato (61).

En la actualidad no se encuentra registrado ningún radiofármaco marcado con zirconio-89, pero a nivel experimental se ha utilizado de forma mayoritaria en el marcaje de proteínas, fundamentalmente anticuerpos monoclonales. Su $T_{1/2}$ es adecuado para el seguimiento de los anticuerpos durante el tiempo suficiente (días) y observar su unión a las dianas específicas, ya que poseen un elevado tiempo de permanencia en circulación y una cinética de unión no muy rápida (62).

La utilización de isótopos emisores de positrones no clásicos con un elevado $T_{1/2}$ como el zirconio-89 o el yodo-124 para visualizar la biodistribución de anticuerpos se define como **inmuno-PET**, y en los últimos años está teniendo un gran auge ya que es una técnica de gran ayuda para el desarrollo de nuevas terapias en el campo de la inmunología (63).

El primer anticuerpo marcado con zirconio-89 fue el zirconio-89-N-suc-DFO-U36 (64) en el año 2006, y a partir de ese momento se han desarrollado numerosos compuestos marcados con zirconio-89 para el diagnóstico de múltiples tumores. En la tabla 3 se muestran los más estudiados en la actualidad, con sus aplicaciones en preclínica y clínica.

Anticuerpo	Epitopo	Patología	Referencias bibliográficas
^{89}Zr -Bevacizumab	Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF)	Cáncer mama, ovario, riñón. Tumores neuroendocrinos	(65, 66, 67)
^{89}Zr -Cetuximab	Factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	Cáncer de mama, pulmón, vejiga, colon	(68, 69, 70)
^{89}Zr -Rituximab	Linfocitos CD20	Linfoma no Hodgkin	(71)
^{89}Zr -Trastuzumab	Factor de crecimiento epidérmico HER2	Cáncer de mama	(72, 73)
^{89}Zr -PSMA	Antígeno prostático	Cáncer de próstata	(74, 75)
^{89}Zr -cmAb-U36	Glicoproteína CD44v6	Tumores cabeza y cuello Cáncer de pulmón, esófago, cérvix	(76, 77)

$^{89}\text{Zr-R1507}$	Factor de crecimiento insulina tipo 1 (IGF1R)	Cáncer de mama	(78)
------------------------	---	----------------	------

Tabla 3. Principales moléculas marcadas con zirconio-89, mecanismo de acción y su aplicación clínica

Aunque su principal utilidad sea el marcaje de anticuerpos, el zirconio-89 puede emplearse en el marcaje de péptidos (79), nanotubos (80), liposomas (81), proteínas (82) y NPs (83, 84).

El marcaje de los anticuerpos con zirconio-89 permite visualizar su distribución en el organismo y su unión al órgano diana. Debido a la gran especificidad de los anticuerpos existe la posibilidad de marcar el mismo anticuerpo con un radioisótopo emisor beta (lutecio-177, itrio-90) o alfa (actinio-225) para aplicar un tratamiento selectivo.

Aunar el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad con la misma molécula pero cambiando el isótopo radiactivo con el que se marca recibe el nombre de teragnosis.

En primer lugar se administra la molécula con un isótopo de diagnóstico para planificar y asegurar que el tratamiento es el correcto verificando la adecuada acumulación de la molécula en el tumor. Posteriormente se administra la misma molécula marcada con un isótopo terapéutico (beta o alfa) para el tratamiento localizado de la enfermedad, incrementando la eficacia del fármaco y disminuyendo sus efectos secundarios.

Un ejemplo lo encontramos en el anticuerpo rituximab, que ha sido marcado con zirconio-89 para el diagnóstico del linfoma (77, 85) y con lutecio-177 (86) e itrio-90 (87) para el tratamiento de dicha enfermedad.

5 TÉCNICAS DE RADIOMARCAJE CON QUELANTES BIFUNCIONALES

5.1 Quelantes bifuncionales

Los **BFCAs** son compuestos de bajo peso molecular capaces de enlazarse con un radioisótopo radiactivo metálico mediante enlaces covalentes y a la vez conjugarse con un péptido, proteína, anticuerpo monoclonal o nanopartícula (figura 7)



Figura 7. Esquema de marcaje de una biomolécula con un radiometal mediante el empleo de un agente bifuncional

La elección del BFCA viene determinada por la naturaleza y estado de oxidación del radiometal, siendo el BFCA ideal aquel capaz de formar un complejo con una alta estabilidad termodinámica a pH neutro para mantener intacto el radiometal en condiciones fisiológicas, así como generar un quelato metálico con la menor cantidad de isómeros posible.

Es importante que la cinética de disociación sea lenta para evitar la toxicidad en el caso de radiofármacos terapéuticos y la baja calidad de las imágenes en los radiofármacos diagnósticos. Asimismo el complejo debe tener una elevada hidrofiliidad para favorecer su eliminación de la sangre y su posterior excreción renal (88).

Los BFCA pueden ser acíclicos o macrocíclicos. Los quelantes acíclicos presentan en general una menor estabilidad termodinámica y una mayor cinética de disociación que los macrocíclicos, aunque el proceso de quelación es más rápido (89).

Los BFCA se pueden encontrar unidos a la biomolécula de forma directa o a través de un conector que puede ser utilizado para modificar las propiedades farmacocinéticas del radiofármaco y su biodistribución. Los conectores pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros. Actúan alterando la carga neta (polietilenglicol), incrementando la lipofiliidad (cadena alifática) y la hidrofiliidad (secuencia de polipéptidos) (90).

A continuación se describen los BFCAs más utilizados en la síntesis de radiofármacos.

5.1.1 Ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)

Es un quelante acíclico desarrollado en 1974 por Sundberg y col (91) y ampliamente utilizado en el marcaje de moléculas con radioisótopos como el cobre-64, galio-67, tecnecio-99m e indio-111 (figura 8). Pertenece al grupo de los quelatos poliaminocarboxílicos y es un derivado del EDTA.

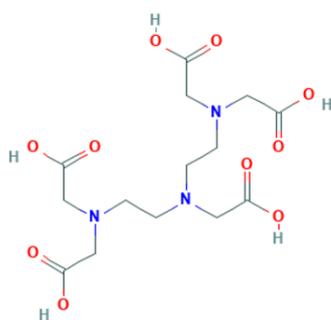


Figura 8. Estructura química del quelante DTPA

Su unión a la biomolécula es muy estable ya que es capaz de coordinarse con ocho átomos donadores, de los cuales tres provienen del grupo amino, cuatro del grupo carboxílico y uno del oxígeno del carbonilo del grupo amida (90).

Tiene una baja estabilidad *in vivo* pero la cinética de conjugación es rápida, por lo que es útil en el marcaje con radiometales de vida media corta como el indio-111. Con el fin de mejorar la estabilidad termodinámica y cinética del conjugado se han llevado modificaciones como la introducción de un grupo hidrazida (92) o más recientemente la introducción de grupos propano 1,2-diamina o ciclohexano 1,2-diamina, que confieren rigidez al esqueleto de la molécula, incrementando la estabilidad *in vivo* del conjugado (93).

5.1.2 Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA)

El DOTA y sus derivados son quelantes macrocíclicos ampliamente utilizados en imagen molecular formando complejos con radiometales como el galio-67, galio-68, indio-111 y lutecio-177.

El tamaño de su cavidad permite la quelación de metales de pequeño tamaño como el galio hasta metales de mayor tamaño como el indio-111 y el lutecio-177, formando complejos con una buena estabilidad termodinámica y una cinética adecuada.

Además contiene un grupo acetato que favorece su aclaramiento plasmático y grupos carboxílicos que minimizan la posterior disociación del radiometal (94).

La conjugación se lleva a cabo mediante la activación de uno de los grupos carboxílicos del DOTA para favorecer su reacción con aminas primarias de la molécula y formación de un enlace amida estable.

Uno de los inconvenientes de su utilización es que el proceso de quelación requiere temperaturas altas (~100 °C) y pH ácidos para obtener un buen rendimiento de marcaje, lo cual supone un problema en el caso de moléculas que sean sensibles a la temperatura o a condiciones de reacción adversas.

Existe una librería muy amplia de compuestos derivados de DOTA que presentan diferentes grupos funcionales para posteriores modificaciones (figura 9).

El derivado ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano,1-ácido glutárico)-4,7,10-triacético (DOTAGA) presenta en su estructura un ácido glutárico que incrementa de forma considerable su estabilidad *in vivo*. Posteriormente se llevó a cabo una modificación obteniéndose el DOTAGA-anhidro con el fin de reducir los tiempos de reacción (95).

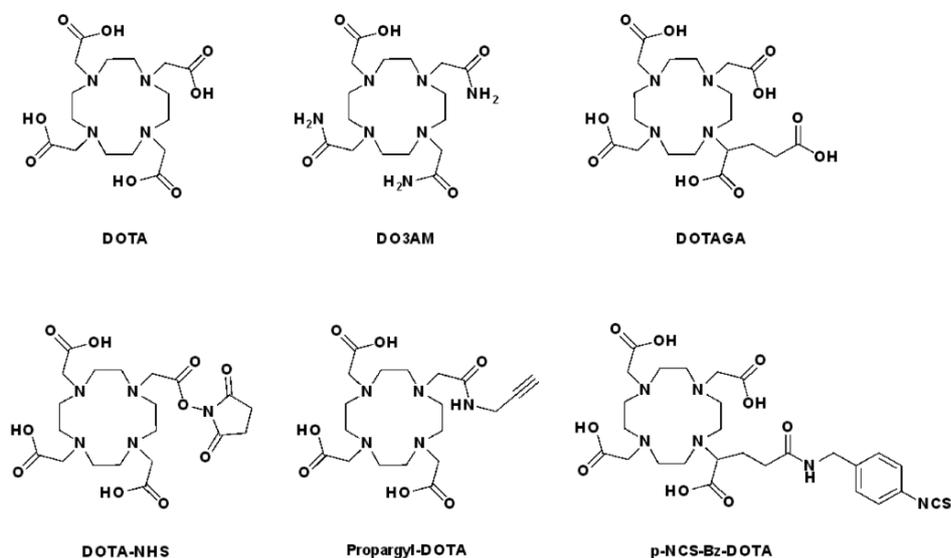


Figura 9. Estructuras químicas del quelante DOTA y sus derivados

5.1.3 Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA)

El NOTA presenta una estructura similar al DOTA pero posee un grupo hidroxilo menos (figura 10). Esto hace que el espacio que deja el ciclononano sea más pequeño, ajustándose más al tamaño del radiometal, lo que se traduce en la formación de complejos más estables. Además, permite la reacción a temperaturas bajas (< 50 °C), por lo que se prefiere al DOTA en el caso de moléculas sensibles a la temperatura (96). La estabilidad termodinámica de los complejos Ga-NOTA es aproximadamente 10 veces mayor que la de los complejos Ga-DOTA (97).

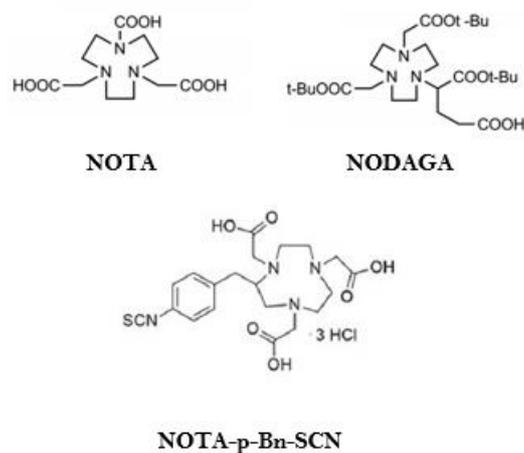


Figura 10. Estructuras químicas del quelante NOTA y sus derivados

La quelación se lleva a cabo mediante la unión de un grupo carboxílico del NOTA con un grupo amina de la biomolécula.

El derivado NODAGA presenta un ácido glutárico en vez de carboxílico que permite que la estructura hexadentada N_3O_3 permanezca intacta, incrementando la estabilidad del complejo y mostrando utilidad en el marcaje de análogos de la somatostatina con galio (98).

El derivado NOTA-p-Bn-SCN es el más utilizado para el marcaje con galio-67 y galio-68 ya que se puede conjugar fácilmente con el grupo amino sin modificar la geometría del anillo del galio (99).

5.1.4 Deferoxamina (DFO)

La DFO es un sideróforo obtenido a partir de la bacteria *Streptomyces pilosus*. Es un complejo hexadentado que contiene tres grupos hidroxamato que se conjugan de forma efectiva con radiometales como el galio y el zirconio.

Es el quelante más utilizado en el marcaje de biomoléculas con zirconio-89, obteniéndose elevados rendimientos de marcaje, una buena estabilidad *in vivo* y una baja disociación del radiometal (100, 101).

A lo largo de los últimos años se han desarrollado numerosos derivados de la DFO (figura 11). Uno de ellos es la DFO*, que contiene un grupo hidroxamato más, permitiendo la formación de un complejo octadentado, que ha demostrado una mayor estabilidad en los estudios *in vivo* (102).

En 2014 se desarrolló el 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), quelante octadentado formado por un esqueleto de espermina con 4 grupos hidroxipiridona que poseen una gran afinidad por el zirconio-89 dando lugar a cinéticas más rápidas y complejos más estables que los obtenidos con el quelante (103). Posteriormente, este mismo grupo evaluó el quelante p-SCN-Bn-HOPO observando que la captación en hueso del zirconio-89-HOPO-trastuzumab era siete veces inferior a la obtenida cuando se empleaba el zirconio-89-DFO-trastuzumab (104).

Uno de los últimos derivados de la DFO es el 3-hidroxipiridin-2 (2,3-HOPO), que ha mostrado una menor retención ósea y renal que el complejo con el quelante DFO en estudios realizados *in vivo* (105).

En la actualidad el derivado más utilizado es el p-isotiocianatobencil-DFO (p-NCS-B-DFO), que se une directamente a los grupos amino de los residuos lisina de los anticuerpos, formando una molécula tiourea estable (46).

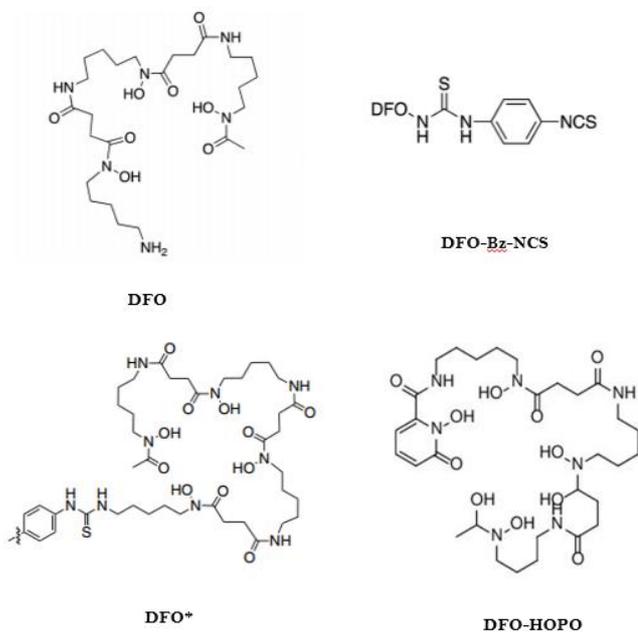


Figura 11. Estructuras químicas de la DFO y derivados

5.2 Unión del quelante a la molécula de interés

La unión del quelante a la biomolécula puede llevarse a cabo siguiendo las siguientes vías (figura 12):

1. Pre-marcaje: es la vía más utilizada en el marcaje de biomoléculas con radioisótopos no metálicos como el flúor-18 o el carbono-11, donde la biomolécula no es estable en las condiciones del radiomarcaje (elevada temperatura). En este caso el BFCA se marca con el radioisótopo y posteriormente se conjuga con la biomolécula. Los rendimientos de marcaje son inferiores a los obtenidos mediante la técnica del post-marcaje.

2. *Post-marcaje*: es la vía más utilizada en el marcaje de biomoléculas con radiometales como el galio-67 y el zirconio-89. En este caso el BFCA se une a la biomolécula y posteriormente se lleva a cabo el marcaje con el radiometal.

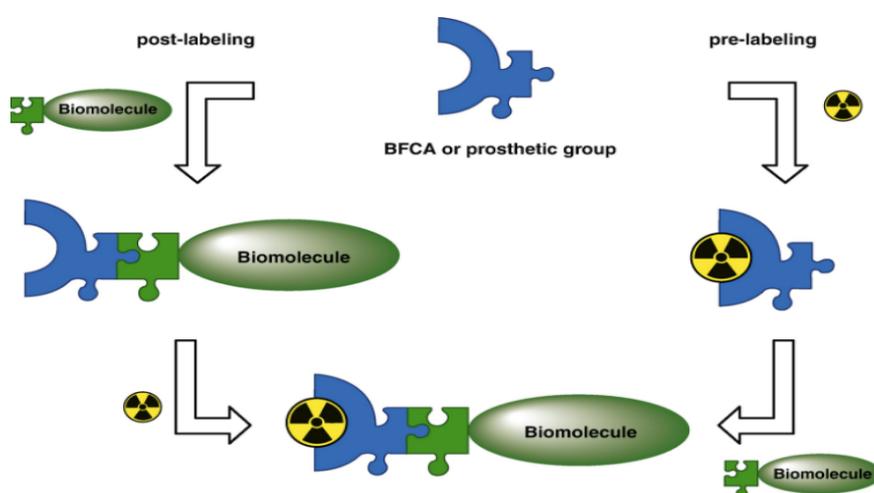


Figura 12. Técnicas de pre-marcaje y post-marcaje en el radiomarcaje de biomoléculas (106)

6 TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR

La **imagen molecular** puede definirse como el conjunto de técnicas que trabajan en la visualización, caracterización y medición de los procesos biológicos *in vivo* y de forma no invasiva a nivel molecular y celular, tanto en humanos como en otros seres vivos.

La principal diferencia respecto a los métodos tradicionales de imagen, radica en la utilización de unas moléculas denominadas “sondas”, que funcionan como biomarcadores, y que emiten una señal que puede ser detectada, visualizada y cuantificada por los distintos equipos de imagen, para finalmente establecer los parámetros biológicos de los procesos que están ocurriendo a nivel molecular y celular.

La imagen molecular engloba modalidades no radiactivas y radiactivas (figura 13). Dentro de las modalidades no radiactivas encontramos técnicas como la imagen óptica, la ecografía o la fotoacústica, que emplean como sondas de imagen la luz o el sonido. También encontramos algunas aplicaciones concretas de la resonancia magnética nuclear (RMN), que emplea un campo electromagnético para la obtención de imágenes del organismo.

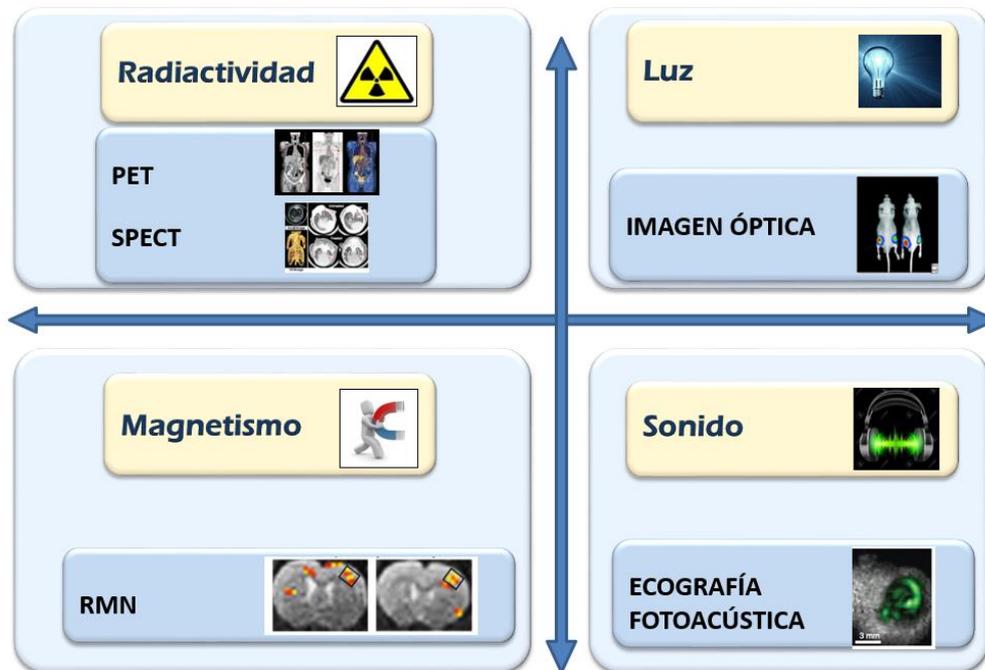


Figura 13. Técnicas de Imagen Molecular radiactivas y no radiactivas

Dentro de la imagen molecular con compuestos radiactivos se incluyen la tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET), que emplean sondas radiactivas que una vez introducidas en el organismo son capaces de emitir una señal que es detectada por tomógrafo para dar lugar a la formación de imágenes que permiten la visualización y medición de procesos biológicos. Los radiofármacos explicados en los apartados anteriores pueden considerarse sondas radiactivas en el ámbito de la imagen molecular. La utilización de cada uno de los equipos de imagen depende del tiempo de emisión radiactiva de los isótopos empleados en la producción de los radiofármacos, ya que la física de desintegración radiactiva condiciona el diseño de los detectores de los equipos, las correcciones necesarias para generar las imágenes y la calidad e información de las

mismas. En el caso de los tomógrafos SPECT, éstos son capaces de detectar radiofármacos con emisión gamma, mientras que la técnica PET únicamente utiliza radiofármacos emisores de positrones.

En la actualidad los equipos SPECT y PET se encuentran asociados a equipos de tomografía computerizada (CT), obteniéndose imágenes de fusión que permiten visualizar la información proporcionada por las dos técnicas de forma simultánea. Las imágenes del CT nos proporcionan información adicional sobre la localización anatómica exacta de los procesos metabólicos identificados con el SPECT y el PET.

En el caso de los tomógrafos PET existen también equipos híbridos PET/RMN desarrollados en los últimos años. Estos equipos permiten una localización anatómica más precisa en tejidos blandos, cerebro, etc... (107, 108).

6.1 Tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT)

La **SPECT** es una técnica tomográfica basada en la detección de rayos gamma emitidos por el radioisótopo radiactivo que contiene el radiofármaco administrado al sujeto de estudio.

Para adquirir una imagen SPECT se utiliza una gammacámara (figura 14), que está formada por un detector de centello sólido capaz de detectar los fotones de radiación emitidos por el paciente y generar una imagen planar de la actividad del organismo. La gammacámara consta de tres componentes; cabezal, *gantry* y ordenador de procesado (109).



Figura 14. Gammacámara SPECT/CT Symbia Evo (Siemens ®, Alemania) (110)

El cabezal contiene en su interior el detector, que generalmente es de yoduro de sodio activado con talio. Los detectores, que pueden ser de 1 a 3, se encuentran en una estructura denominada *gantry* que les permite adoptar cualquier posición alrededor del paciente.

Para adquirir la imagen los detectores rotan alrededor del paciente permitiendo la adquisición de imágenes estáticas o proyecciones desde diferentes ángulos. La reconstrucción de todas las proyecciones adquiridas proporciona una imagen tridimensional de la distribución de la radiactividad en el organismo, por lo que se consigue una imagen tomográfica de la distribución del radiofármaco (111).

El cabezal de la gammacámara posee colimadores que sirven para eliminar los fotones que provienen de una dirección distinta a la elegida para efectuar la detección. Los más utilizados son el colimador tipo pin-hole y el de orificios paralelos

6.2 Tomografía computerizada por emisión de positrones (PET)

La **PET** es una técnica no invasiva de diagnóstico por imagen que permite medir la actividad metabólica del organismo mediante la visualización *in vivo* de procesos biológicos y bioquímicos.

Se basa en la administración de radiofármacos marcados con radioisótopos emisores de positrones y la detección de los fotones de aniquilación positrón-electrón utilizando un tomógrafo PET.

Los radionúclidos emisores de positrones tienen un exceso de protones en el núcleo y alcanzan la estabilidad mediante la transformación de un protón en un neutrón. Este proceso implica la emisión de un positrón (β^+) y de un neutrino (ν).

Tras la emisión del positrón, proveniente de la desintegración radiactiva, éste recorre una distancia (dependiente de la energía de emisión) antes de chocar con un electrón y producirse la aniquilación. Como resultado de esta aniquilación se emiten dos fotones gamma de 511 KeV en la misma dirección y sentidos opuestos (figura 15).

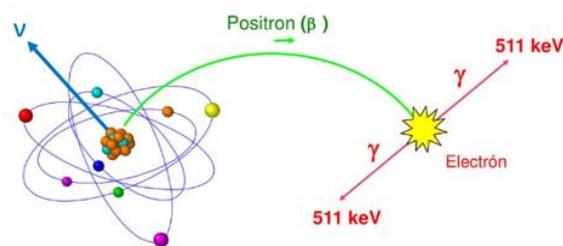


Figura 15. Proceso de aniquilación de un positrón con un electrón. Al producirse la aniquilación la masa del electrón y del positrón se convierten en energía en forma de dos fotones γ de 511 KeV en la misma dirección y sentidos opuestos. La emisión del positrón conlleva además la emisión de un neutrino (ν).

Los fotones de aniquilación se detectan en coincidencia en un tomógrafo, normalmente en forma de anillo, permitiendo obtener las proyecciones o sinogramas. La reconstrucción tomográfica posibilita la generación de imágenes volumétricas de la biodistribución del radiofármaco en el organismo, y permite la cuantificación absoluta de la radiactividad presente en los tejidos (figura 16).

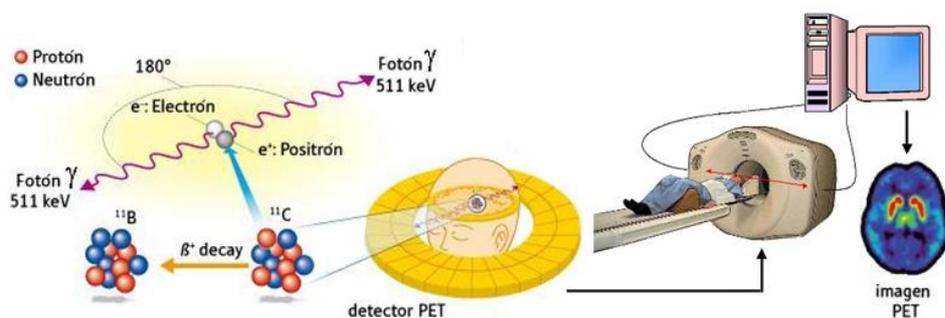


Figura 16. Proceso de aniquilación de un positrón con un electrón y detección en coincidencia. El radiofármaco es administrado al paciente y los fotones γ de aniquilación atraviesan el cuerpo del paciente llegando a los anillos detectores del PET y son detectados en coincidencia. [Adaptado de la web del hospital de Hammersmith (www.hmrllondon.com) y de "A PET's is not just for Christmas", disponible en <https://tonygood4.wordpress.com/2012/11/04-a-pets-not-just-for-christmas/>, accedido el 28 de noviembre de 2019]

La principal ventaja que ofrece la PET frente a otras técnicas de imagen es su alta sensibilidad, del orden de nanomoles e incluso picomoles (112). Esta sensibilidad permite la obtención de información molecular, funcional y metabólica de forma muy precisa por lo que se ha extendido su uso en el diagnóstico de multitud de enfermedades como el cáncer, patologías neurológicas (Parkinson, Alzheimer), patologías cardiovasculares, inflamatorias, infecciosas etc...

Los radionucleidos emisores de positrones utilizados en la práctica clínica tienen un corto periodo de semidesintegración por lo que es necesario que el centro productor se encuentre cerca del equipo de detección. Los radionucleidos PET empleados en clínica suelen tener un periodo de semidesintegración corto o ultracorto (2-110 min), como el oxígeno-15 ($T_{1/2} = 2$ min), nitrógeno-13 ($T_{1/2} = 10$ minutos), carbono-11 ($T_{1/2} = 20$ minutos), galio-68 ($T_{1/2} = 68$ min) y flúor-18 ($T_{1/2} = 110$ min). En los últimos años se están empleando radionúclidos con periodos más largos como el cobre-64 ($T_{1/2} = 12,7$ horas) y el zirconio-89 ($T_{1/2} = 78,4$ horas).

Estos radionucleidos emisores de positrones se pueden obtener mediante un ciclotrón o bien mediante un generador similar al empleado para la obtención del (^{99m}Tc] NaTcO_4^- (figura 17).



Figura 17. A la izquierda se muestra un ciclotrón vertical de ión negativo (PET Trace 800, General Electric) y a la derecha un generador PET de germanio-68/galio 68 (GalliaPharm ®, Eckert & Ziegler) (113)(114)

El **ciclotrón** es un acelerador de partículas de trayectoria circular en el que las partículas cargadas producidas en una fuente de iones se desplazan dentro de una sucesión de órbitas de radio creciente, por influencia de un campo magnético, y son aceleradas al atravesar repetidamente un campo eléctrico producido por un sistema de radiofrecuencia.

7 NANOTECNOLOGÍA E IMAGEN MOLECULAR

7.1 Nanotecnología y nanomedicina

En el año 1959, el doctor Richard Feynman presentó en el congreso anual de la sociedad americana de física una ponencia titulada “There’s plenty of room at the bottom”, que describía un proceso en el que los científicos podrían manipular y controlar las cosas a nivel atómico y molecular, sentando las bases de lo que hoy todos conocemos como nanotecnología (115).

El término **nanotecnología** fue utilizado por primera vez en el año 1974 por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio, definiéndola como el procedimiento de separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo o molécula por molécula (116).

En la actualidad, la nanotecnología es un área de la ciencia que se encarga del estudio, diseño, síntesis y aplicación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la material a nivel de la nanoescala (117) (figura 18). Se basa en que las características físicas y químicas de los materiales pueden mejorar o cambiar

radicalmente a medida que disminuyen su tamaño, ya que se produce una reorganización superficial de los átomos, condicionando así sus propiedades. Por lo tanto, los científicos pueden utilizar la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos con propiedades únicas.

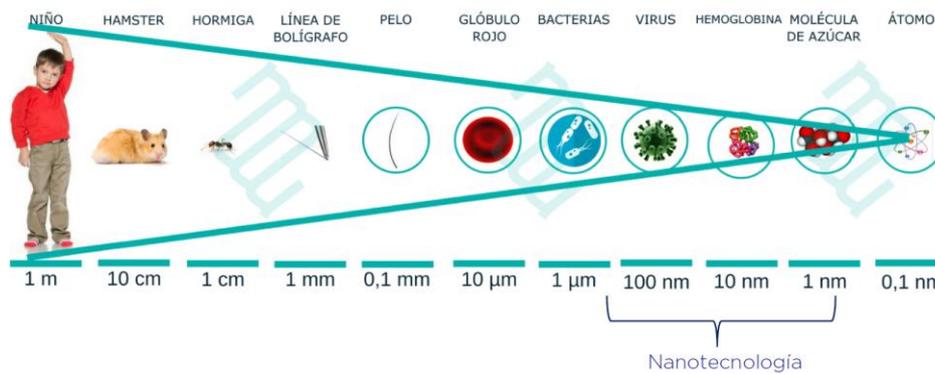


Figura 18. Escala de tamaño de la nanotecnología (<http://blog.nanomyp.com/diferencias-entre-nanotecnologia-y-biotecnologia>)

La nanotecnología tiene múltiples aplicaciones entre las que destacan la medicina, el desarrollo de nuevos materiales, la energía y la electrónica.

La **nanomedicina** es la aplicación de la nanotecnología en medicina y se puede definir como la ciencia y la tecnología empleada en el diseño y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica, formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa, y el segundo, es el propio sistema, que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad (118).

El principal objetivo de la nanomedicina es el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades cuando todavía están en el inicio o en estadios poco avanzados. Uno de sus principales retos es el desarrollo de nanoterapias

dirigidas de forma específica al órgano enfermo, sin dañar las células sanas circundantes, evitando de esta manera los efectos secundarios de las terapias actuales.

La nanomedicina engloba tres áreas de estudio; el nanodiagnóstico, la nanoterapia y la medicina regenerativa.

El nanodiagnóstico tiene como objetivo detectar enfermedades en sus estadios iniciales en el nivel celular o molecular, mediante la utilización de nanodispositivos y sistemas de contraste. Una identificación temprana de la enfermedad, permite la aplicación precoz de un tratamiento, ofreciendo así mayores posibilidades de curación (119, 120).

La nanoterapia se encarga del desarrollo de nanosistemas que se dirigen a un órgano o tejido, y que tras un proceso de reconocimiento provocan la liberación del fármaco de forma específica y controlada en los órganos o tejidos afectados (121, 122).

La nanomedicina regenerativa se ocupa de la reparación o sustitución de tejidos y órganos dañados mediante la aplicación de métodos procedentes de la terapia génica, la terapia celular, a dosificación de sustancias bioregenerativas y la ingeniería de tejidos, siendo en este campo donde la nanotecnología juega un papel predominante, ya que facilita la producción de nuevos materiales y técnicas que permiten una integración de los tejidos de forma más eficiente debido a la posibilidad de generar microambientes más propicios para la regeneración tisular. (123, 124, 125) .

La nanomedicina emplea diferentes nanosistemas como las NPs, nanotubos, nanovarillas, nanocables, películas delgadas y nanochips, siendo las NPs las de mayor aplicación en la clínica debido a su potencial utilización para el transporte y liberación de fármacos (126).

Los materiales que se han utilizado en la construcción de nanosistemas de liberación de fármacos pueden ser muy variados y se clasifican de forma general en los siguientes grupos (figura 19) (127, 128):

1. Nanoestructuras orgánicas → se encuentran las nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros, conjugados polímero-fármaco.
2. Nanoestructuras inorgánicas → se encuentran las NPs metálicas, las de sílice mesoporosa, puntos cuánticos y los nanotubos de carbono

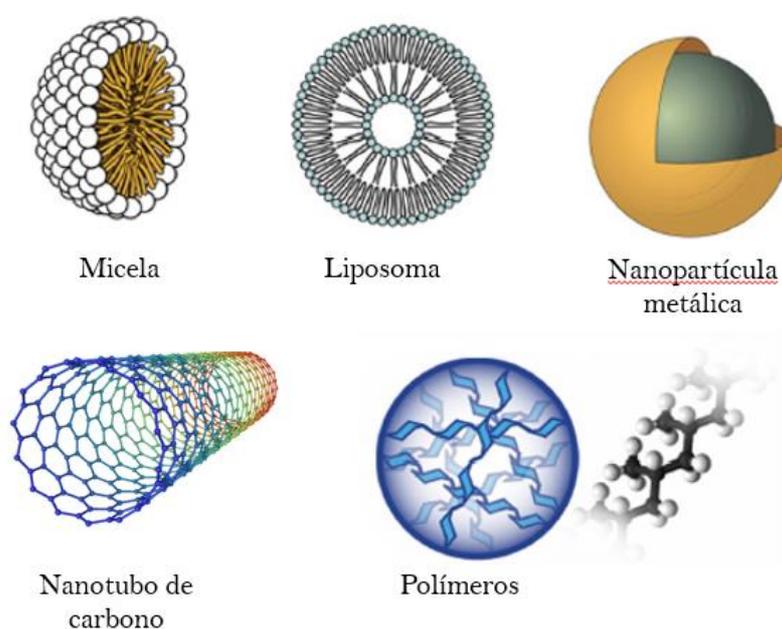


Figura 19. Estructura de los nanosistemas más utilizados para la liberación de fármacos

Las NPs son estructuras atómicas o materiales con una dimensión a escala nanométrica, que pueden ser de origen natural (baterías, virus, etc.), generadas por el ser humano de forma involuntaria (combustión de gasolina, diésel, etc.) o deliberada mediante la utilización de la nanotecnología (129).

Las propiedades intrínsecas de las NPs están principalmente determinadas por su distribución de tamaño y forma, su composición química, morfología, geometría y

estructura. En base a su forma podemos encontrar NPs esféricas, cilíndricas, en barras y plaquetas (130).

Después de su preparación, las NPs deben ser caracterizadas para asegurar su idoneidad para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Para llevar a cabo dicha caracterización se determinan parámetros como el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial Z.

El **tamaño** de las NP puede depender del peso molecular del compuesto utilizado para su preparación. Generalmente las NPs tienen un tamaño que va de 1-100 nm aunque este se puede extender a los 1000 nm (131).

La técnica de espectroscopía de correlación fotónica o dispersión dinámica de la luz (DLS, siglas en inglés), es una técnica no invasiva que permite medir el tamaño de las NPs en dispersión. El movimiento Browniano de las partículas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones se obtiene la velocidad del movimiento Browniano y por lo tanto el tamaño de partícula empleando para ello la relación de Stokes-Einstein (132)

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R}$$

El **índice de polidispersión** (PDI, siglas en inglés) se utiliza para describir el grado de no uniformidad de una distribución de tamaño de NPs (133). Valores de PDI bajos ($< 0,05$) nos indican que la muestra es monodispersa mientras que valores de PDI superiores a 0,7 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño de partícula muy amplia y probablemente no sea adecuada para ser analizada por la técnica de DLS.

El **potencial Z** se utiliza para evaluar el grado de estabilidad y dispersión de las NPs en un fluido ya que mide la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre

las partículas. Se trata de una medida directamente proporcional a la carga de las partículas, de forma que cuanto mayor es su valor, más cargadas están las partículas y mayor es su potencial electrostático. Como consecuencia de esto, la repulsión entre ellas aumenta y su tendencia a formar agregados disminuye (134, 135).

Se mide mediante la aplicación de un campo eléctrico a la solución de Nps, por lo que estas migraran hacia el electrodo de carga opuesta con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z. Esta velocidad se mide empleando la técnica de anemometría de láser Doppler. El desplazamiento de frecuencia o de fase de un haz de láser incidente causado por estas partículas en movimiento, se mide como la movilidad de las partículas y esta movilidad se convierte en el potencial Z mediante la introducción de la viscosidad dispersante y la aplicación de las teorías de Smoluchowski o Huckel (136)

7.2 Nanopartículas para la liberación de fármacos

Uno de los mayores avances de la nanomedicina es el diseño de NPs para el transporte y liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten mejorar la seguridad y eficacia de su administración.

Cuando un fármaco se administra en una forma convencional (comprimido, cápsula, inyectable, etc..) se distribuye por el organismo alcanzando el órgano o tejido enfermo para ejercer su acción, pero a su vez también puede tener efecto en otras localizaciones, produciendo efectos secundarios no deseados.

La utilización de NPs mejora la biodisponibilidad de los fármacos ya que son capaces de proteger a la molécula encapsulada de la degradación tanto física como química hasta alcanzar el lugar de acción, y una vez en dicho lugar se libera mediante la variación de las condiciones ambientales (ph, temperatura) o mediante un proceso de degradación del material encapsulante, permitiendo la liberación controlada del mismo. El hecho de poder concentrar el fármaco en el lugar de acción permite la

posibilidad de incrementar la eficacia terapéutica de las moléculas minimizando los posibles efectos secundarios (137).

El nanosistema tiene como función transportar el fármaco hasta la zona dañada y cuando se produce el reconocimiento lo libera como respuesta a un estímulo interno (pH, presencia de enzimas como proteasas y fosfolipasas, cambios en el potencial redox), o externo (luz, cambios de temperatura, campo magnético, campo eléctrico, ultrasonidos) (138).

El transporte y la liberación del fármaco se ve fuertemente afectada por las propiedades físico-químicas de la NP, incluyendo su tamaño, forma, carga superficial y características químicas (139).

Gracias a su pequeño tamaño y a su elevada superficie específica, las NPs presentan una elevada interacción con los tejidos y fluidos biológicos, logrando una mejor eficacia y menor toxicidad del fármaco administrado, permitiendo además atravesar barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria, la barrera hematoencefálica e incluso pudiendo alcanzar compartimentos intracelulares (139).

Además, en el caso de moléculas hidrófobas puede incrementar su tiempo de permanencia en el organismo, aumentando con ello su eficacia terapéutica, mientras que la biodistribución y la farmacocinética de la molécula no se ven alteradas (140).

Las **NPs metálicas** presentan la ventaja de poseer unas características ideales para ser utilizadas como agentes de contraste en pruebas de imagen como la RMN, pero su uso está limitado por su toxicidad, elevada degradación y rápida eliminación cuando son utilizadas con fines médicos (141). Algunos estudios relacionan la presencia de estas NPs con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), seguido de una respuesta proinflamatoria y daños en el ADN que llevan a la célula a sufrir un fenómeno de apoptosis (142, 143).

Las **NPs lipídicas sólidas (SLN)** se desarrollaron a principios de los años 90 como una alternativa a sistemas de fármacos como las emulsiones, liposomas y a las NPs

poliméricas. Presentan una buena biodisponibilidad y protegen al fármaco de la degradación frente a agentes externos como la luz y el agua. Además son de utilidad para la liberación prolongada de fármacos poco solubles en agua (144).

Las **NPs poliméricas** presentan una elevada biocompatibilidad por lo que pueden emplearse de forma segura para el transporte de fármacos. Además su superficie puede modificarse y funcionalizarse con diferentes ligandos como anticuerpos o distintas moléculas con grupos funcionales específicos con el fin de incrementar la afinidad por el tejido u órgano diana, mejorando de esta manera la eficacia terapéutica del fármaco.

Las NPs poliméricas pueden fabricarse con polisacáridos, proteínas y polímeros sintéticos (145).

Son de particular interés las NPs proteicas ya que presentan ciertas ventajas como una elevada estabilidad *in vivo* y no son tóxicas ni antigénicas. Dentro de las proteínas que se pueden emplear están la albúmina, la caseína, la gelatina, la fibroína de seda y el colágeno (146).

La *albúmina* es una proteína biodegradable, no tóxica, fácil de purificar y soluble en agua, con una alta tolerabilidad cuando se administran *in vivo*. Además presenta una matriz grande que permite la incorporación de una gran cantidad de fármaco (147) (148).

Las NPs de albúmina han mostrado su utilidad en el transporte de fármacos quimioterápicos como el paclitaxel y el docetaxel, mejorando su eficacia debido a un incremento en el tiempo de residencia en el organismo y una reducción de los efectos secundarios indeseados (149, 150).

Para la preparación de las NPs de albúmina se han empleado diferentes procesos físico-químicos como la gelación térmica, la emulsificación y la desolvatación, siendo el método de desolvatación el más utilizado debido a su simplicidad y reproducibilidad (151).

La superficie de las NPs de albúmina se pueden funcionalizar fácilmente con ligandos o polímeros para mejorar su estabilidad y controlar su biodistribución (152, 153, 154).

La utilización de polímeros sintéticos como el copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico (Gantrez ® AN-119), la tiamina, la manosamina, el polietilenglicol 2000 o la hidroxipropilmetilcelulosa para el recubrimiento de las NPs pueden mejorar sus propiedades físico-químicas y modificar su biodistribución *in vivo* (155, 156).

El *polietilenglicol* actúa como antiadherente, reduciendo la captación de las NPs por parte de los macrófagos, incrementando su tiempo de circulación en la sangre (157).

La conjugación del *Gantrez AN-119* con polímeros como la manosamina o la tiamina ha mostrado utilidad en la administración de vacunas y proteínas por vía oral, evidenciando un incremento de la permanencia de las NPs en la mucosa intestinal (158)

7.3 Nanopartículas marcadas con radioisótopos radiactivos

El marcaje de NPs con radioisótopos para su utilización en técnicas de imagen molecular permite conocer con una elevada precisión su biodistribución *in vivo*, así como su tiempo de permanencia en el organismo, proporcionando información valiosa para detectar y caracterizar la enfermedad, así como para monitorizar la eficacia de los tratamientos (159).

Las técnicas de imagen molecular más utilizadas para el uso de NPs radiomarcadas son el SPECT y el PET. El principal interés de estas técnicas es la posibilidad de realizar estudios de biodistribución *in vivo*, lo que permite un seguimiento longitudinal de la distribución de las NPs en el mismo individuo. También existe la posibilidad de realizar estudios *ex vivo* a nivel de órganos o tejidos mediante el sacrificio del animal y contaje de las muestras en un contador de pozo. Esta técnica es invasiva, pero tiene la

ventaja de contar con la alta sensibilidad de este tipo de contadores, permitiendo el estudio de aquellos órganos o tejidos que son difíciles de estudiar *in vivo* por los límites de resolución de los tomógrafos SPECT o PET. De esta manera los estudios de biodistribución *ex vivo* resultan el complemento ideal de los estudios de imagen *in vivo*.

A la hora de elegir un radioisótopo para el marcaje de NPs hay que tener en cuenta el tipo de emisión radiactiva, su disponibilidad y la estrategia de marcaje que se pretende utilizar. En el caso de NPs de diagnóstico se emplean emisores de positrones o emisores gamma, mientras que en el caso de NPs de terapia es necesaria la utilización de radioisótopos de emisión beta o alfa. También hay que tener en cuenta su periodo de semidesintegración ya que si se quieren realizar estudios prolongados en el tiempo es necesaria la utilización de un radioisótopo de vida media lo suficientemente larga para cubrir el tiempo del estudio.

Los isótopos más utilizados en el marcaje de NPs son el tecnecio-99m, galio-67, galio-68, zirconio-89 y cobre-64.

Se puede utilizar la misma NP como agente teragnóstico empleando dos radioisótopos diferentes. Uno de ellos se emplea para obtener imágenes del estadio de la enfermedad, evaluar la expresión de receptores, metabolismo, aclaramiento etc.. mientras que el otro se utiliza para el tratamiento (160).

El marcaje de NPs con radioisótopos se pueden llevar a cabo siguiendo tres estrategias de marcaje (figura 20) (161):

1. Marcaje de la NP con el radioisótopo tras su preparación mediante un marcaje directo (el radioisótopo no interacciona de forma específica con la NP) o bien mediante la utilización de BFCA que facilita la unión covalente de la NP con el radioisótopo.
2. Incorporación del radioisótopo durante la preparación de la NP
3. Irradiación directa de las NPs mediante la producción *in situ* del radioisótopo empleando reacciones nucleares

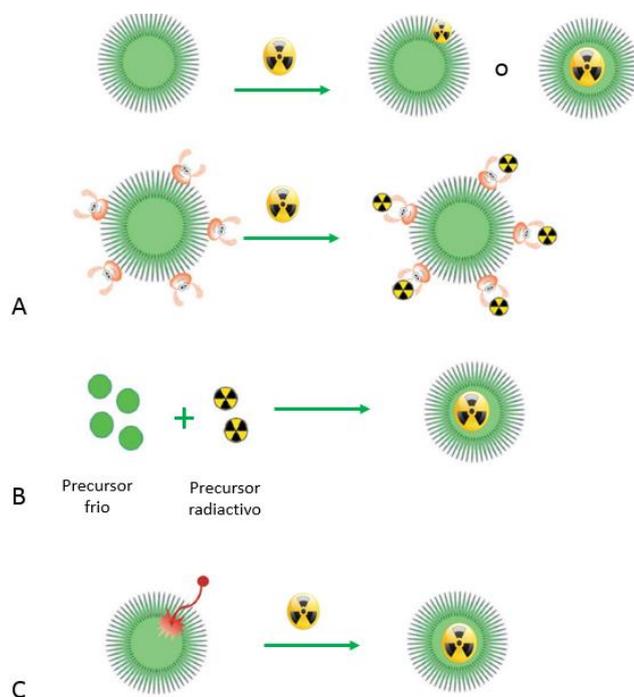


Figura 20. Estrategias de marcaje de NPs con radioisótopos. A. Marcaje post-síntesis de la NP directo (arriba) o mediante empleo de BFCA (abajo). B. Incorporación del radioisótopo durante la síntesis de la NP. C. Marcaje mediante el bombardeo con partículas (162)

La elección de la estrategia del marcaje depende de las propiedades físicas de la NP, la actividad específica deseada, el rendimiento y estabilidad del marcaje y la aplicación de las NPs.

7.3.1 *Marcaje de nanopartículas con tecnecio-99m*

Las NPs pueden marcarse de forma directa con tecnecio-99m mediante la reducción del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$, con SnCl_2 . En este caso, la cantidad de SnCl_2 empleada debe controlarse de forma exhaustiva ya que un exceso del mismo conlleva la formación de radiocoloides, que pueden ser interpretadas de forma errónea como NPs marcadas (163).

También pueden utilizarse BFCAs como el HYNIC o el DTPA, que se unen a la superficie de la NP y posteriormente se procede al marcaje mediante la reducción del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$. El HYNIC requiere el empleo de coligandos como la tricina o el ácido N,N'-etilendiaminodiacético (EDDA) para estabilizar el radiometal.

El HYNIC se ha empleado para el marcaje de NPs de oro para el diagnóstico del ganglio centinela (164), empleando tricina y EDDA como coligandos y SnCl_2 como agente reductor.

El DTPA se ha utilizado en el marcaje de NPs de oro con tecnecio-99m, mediante la unión del quelante a la NP y posterior reducción del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ en presencia de SnCl_2 (165).

7.3.2 *Marcaje de nanopartículas con galio-67*

El galio-67 se obtiene de forma comercial como citrato de galio-67, pero esta forma química ha mostrado una baja eficiencia de marcaje en las reacciones de quelación por lo que es necesario convertir el citrato de galio-67 en cloruro de galio-67 para obtener mejores rendimientos de marcaje.

Existen muy pocas publicaciones relacionadas con el marcaje de NPs con galio-67.

En el año 2009, Jaililian y cols (166) emplearon galio-67 para marcar NPs superparamagnéticas de óxido de hierro, introduciendo el radioisótopo durante la

preparación de las NPs. Para ello se evaporó la solución de cloruro de galio con nitrógeno y posteriormente se añadieron las sales de hierro para la formación de las NPs.

En otros estudios, el marcaje se lleva a cabo mediante la utilización de BFCAs, siendo los más utilizados el NOTA, DOTA y DTPA.

Las partículas superparamagnéticas también se pueden marcar empleando el quelante DTPA-dianhidruro (45).

En 2013, Hwang y cols (167) sintetizaron unas NPs metálicas de cobalto/hierro recubiertas de una rodamina fluorescente en una matriz recubierta de sílice y funcionalizadas con el aptámero AS14:11 y las marcaron con galio-67 mediante la incorporación del quelante NOTA a las NPs y posterior incubación de las mismas durante 1 hora con citrato de galio en tampón fosfato 0,2 M (pH 6,5).

7.3.3 Marcaje de nanopartículas con zirconio-89

La mayoría de los marcajes de moléculas con zirconio-89 requiere el empleo de BFCAs con el objetivo de minimizar la liberación del zirconio, ya que como se comentó anteriormente puede unirse a las proteínas plasmáticas y al hueso, y debido a su elevado $T_{1/2}$ puede incrementar considerablemente la dosimetría del paciente.

La mayoría de los trabajos publicados en la literatura emplean como quelante la DFO.

En el año 2011, Keliher y cols (168) describieron el proceso de marcaje con zirconio-89 de NPs de dextrano para la visualización *in vivo* de los macrófagos. El conjugado DFO-NP se incubó con el oxalato de zirconio-89 disuelto en ácido oxálico (pH 7 ajustado con tampón carbonato) durante una hora a 25°C y pasado este tiempo las NPs marcadas se purificaron mediante centrifugación en membrana, obteniéndose una pureza radioquímica (PRQ) del 100 % con ausencia total de zirconio-89 libre.

También se han marcado NPs de sílice mesoporosa con zirconio-89 empleando el quelante DFO-Bz-NCS y cloruro de zirconio-89. Para ello se llevó a cabo la conjugación de las NPs con el quelante y posteriormente se incubaron con el cloruro de zirconio-89 (pH 7) durante 30 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose una eficiencia de marcaje del 100%, no requiriéndose una etapa de purificación posterior al marcaje (169).

En los últimos años, con el fin de reducir la acumulación del zirconio-89 hueso debida al desmarcaje del compuesto se han desarrollado quelantes que confieren una mayor estabilidad a los mismos.

Por el momento no existe ninguna publicación sobre la utilidad de estos nuevos quelantes en el marcaje de NPs pero es posible que en el futuro sean utilizados como alternativa a la DFO.

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En este capítulo se explican las motivaciones que han llevado al desarrollo de esta tesis doctoral y los objetivos definidos.

La nanomedicina es un campo de investigación que ha tenido un amplio desarrollo en los últimos años, especialmente en la producción de NPs para encapsular fármacos, los cuales permiten la liberación controlada y dirigida de los mismos, dando lugar a tratamiento más eficaces y con menos efectos secundarios.

Además del tratamiento estas NPs pueden emplearse para el diagnóstico mediante su marcaje con agentes de imagen como los isótopos radiactivos, permitiendo la visualización de su biodistribución.

Dentro de los materiales empleados en la construcción de estas NPs cobran especial relevancia las proteínas como la albúmina debido a su biocompatibilidad y ausencia de toxicidad.

La modificación de la superficie de estas NPs mediante el recubrimiento con polímeros permite la modificación de las propiedades físico-químicas de la NP produciendo cambios en su farmacocinética tras su administración.

El desarrollo de nuevos polímeros que modifiquen las propiedades farmacocinéticas de las NPs es un amplio campo para el desarrollo de tratamientos más efectivos y seguros.

El principal objetivo de esta tesis es el radiomarcaje con diferentes radiometales de distintas formulaciones de NPs de albúmina recubiertas con los polímeros hidroxipropil-metil-celulosa (HPMC) y los polímeros conjugados del Gantrez AN-119 ® con la tiamina (GTM2), manosamina (GMN2), polietilenglicol 2000 (GPM2), la evaluación de la estabilidad del radiomarcaje *in vitro* y la biodistribución *in vivo* de las NPs radiomarcadas mediante imagen molecular.

Para conseguir este objetivo principal se definieron los siguientes objetivos secundarios:

1. Desarrollo y optimización del procedimiento de radiomarcaje directo con el radiometal tecnecio-99m.

2. Conjugación de la albúmina con quelantes de radiometales para la obtención de las NPs radiomarcadas.
 - 2.1. Preparación de NPs de albúmina modificadas con el quelante NOTA para el marcaje con galio-67.
 - 2.2. Preparación de NPs de albúmina modificadas con el quelante DFO para el marcaje con zirconio-89.
3. Optimización y automatización del proceso de conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67.
4. Desarrollo y optimización de los procedimientos de radiomarcaje mediante el empleo de quelantes bifuncionales con galio-67 y zirconio-89.
5. Determinación de la estabilidad *in vitro* de las NPs radiomarcadas (tecnecio-99m, galio-67 y zirconio-89) en suero fisiológico y plasma sanguíneo.
6. Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las NPs radiomarcadas mediante técnicas de imagen molecular (SPECT/CT y PET/CT).
7. Evaluación *ex vivo* de la biodistribución de las NPs radiomarcadas mediante medida de la radiactividad en órganos y sangre utilizando un contador gamma tras el sacrificio de los animales.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se desarrollan con detalle los materiales y los métodos empleados para la realización de esta tesis

1 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M

Para el marcaje de las NPs con tecnecio-99m se empleó una técnica de marcaje directo con el radioisótopo en forma de $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$.

1.1 Preparación de las nanopartículas

La preparación de las NPs se llevó a cabo en el departamento de Tecnología y Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra.

Se prepararon cuatro tipos de NPs de albúmina funcionalizadas en superficie mediante recubrimiento con los polímeros conjugados Gantrez-manosamina (GMN2), Gantrez-tiamina (GTM2) y Gantrez-polietilenglicol 2000 (GPM2). También se utilizó para el recubrimiento el polímero semisintético hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Los polímeros empleados para el recubrimiento de las NPs fueron desarrollados por personal de dicho departamento, estando en la actualidad patentados (W02016/087340).

Estos polímeros se obtuvieron mediante la unión covalente de un ligando (polietilenglicol 2000, manosamina o tiamina) a la estructura polimérica del Gantrez AN-119 (figura 21).

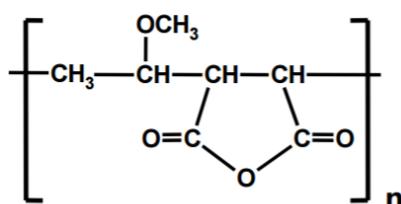


Figura 21. Estructura química del Gantrez AN-119

Para ello se disolvieron 100 mg de Gantrez AN-119 (International Specialty Products ISP, KY, Estados Unidos) en 6 ml de dimetilsulfóxido anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania) y se añadieron 15 mg de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carboimida), 7,5 mg de NHS (N-hidroxi succinimida) y 12,5 mg de manosamina, polietilenglicol 2000 o tiamina en una atmósfera inerte de nitrógeno, dejándolo incubar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el polímero fue dializado con PBS (tampón fosfato salino) para remover todas las impurezas y finalmente liofilizado en un equipo Benchtop Freeze Dry System (Labconco, USA).

La albúmina para preparar las NPs (fracción V, pureza 96-99 %), la HPMC y la sacarosa fueron suministradas por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y el etanol absoluto y el HCl por Merck (Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones fueron preparadas con agua pura desionizada tipo I.

Las NPs se prepararon mediante un proceso de desolvatación siguiendo el protocolo descrito por Joye y col (170) con pequeñas modificaciones. El método de desolvatación consiste en la agregación de las moléculas de proteína en solución inducida por la disminución en la cantidad del solvente que rodea a las moléculas de proteína.

Generalmente se lleva a cabo mediante la adición de un alcohol a una solución acuosa de la proteína. En la figura 22 se muestra un esquema de la preparación de las NPs siguiendo este método.

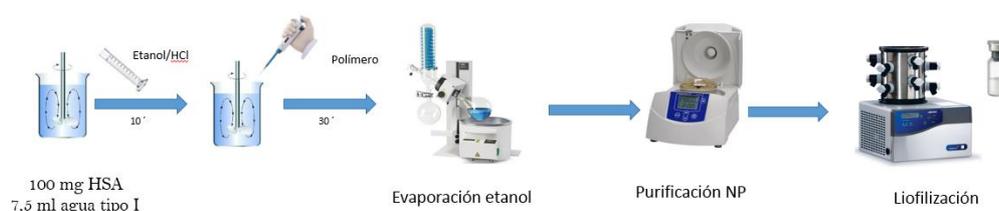


Figura 22. Preparación de NPs de albúmina mediante el método de desolvatación en doble disolvente (etanol/agua)

Para su preparación se disolvieron 100 mg de albúmina sérica humana en 7,5 ml de agua tipo I mediante agitación. Posteriormente, se añadió la cantidad apropiada de HCl 1N y 16 ml de etanol absoluto. Tras 10 minutos de incubación se adicionó cada uno de los tipos de polímero y se agitó durante 30 minutos. Las cantidades de HCl y polímero añadido en función del tipo de NP quedan reflejadas en la tabla 4.

NANOPARTÍCULA	HCL (μ l)	Polímero (mg)
NP-HPMC	3	25
NP-GMN2	3	3
NP-GPM2	6	3
NP-GTM2	6	3

Tabla 4. Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina

Tras la incubación con el polímero, el etanol de la formulación se eliminó mediante evaporación bajo presión reducida en un rotavapor Buchi R-144 (Buchi, Reino Unido), hasta obtener un volumen final de 6 ml. Una vez evaporado el etanol, las NPs se centrifugaron a 41.000 g durante 20 minutos en una centrífuga Sigma 3K30 (Munich, Alemania), se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 3 ml de sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania) al 3% como crioprotector para su posterior liofilización.

Una vez preparadas, todas las NPs se caracterizaron mediante espectroscopía de correlación fotónica (tamaño e índice de polidispersión) y anemometría laser doppler (potencial zeta), empleando para ello un analizador Zetamaster (Malvern Instruments, Reino Unido).

Para la medición del tamaño las NPs se dispersaron en agua ultrapura (1/10) antes de introducir las en el equipo. La medida se llevó a cabo a 25 °C con un ángulo de 90°C.

Para la medición del potencial Z las NPs se dispersaron en KCl 0,1 mM (1/10).

Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

1.2 Marcaje de las nanopartículas con tecnecio-99m

1.2.1 Optimización de la concentración de cloruro de estaño

El radiomarcaje de las NPs se llevó a cabo con tecnecio-99m mediante la reducción del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ con SnCl_2 .

Con el fin de obtener el mayor porcentaje de NPs marcadas, minimizando la cantidad de $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ libre y coloides de tecnecio-99m se ensayaron 6 concentraciones distintas de SnCl_2 , con el fin de establecer la concentración de SnCl_2 a la que se obtiene un elevado rendimiento de marcaje sin la presencia de coloides de tecnecio-99m debidos a un exceso del mismo.

Para ello se prepararon unos viales tipo “kit” similares a los que se utilizan en el marcaje de los radiofármacos tecneciados. Estos “kits” contienen las NPs a marcar junto con el cloruro de estaño y presentan la ventaja de poder prepararlos con antelación a su utilización, ya que se liofilizan purgando con helio. La purga de los viales con helio permite el secado de los reactivos, incrementando su estabilidad, y proporciona la atmósfera inerte necesaria para el posterior marcaje del vial con el tecnecio-99m.

Se prepararon viales con 1 mg de NPs liofilizadas y se dispersaron con 40 μ l de una solución de SnCl₂ dihidratado disuelto en agua ácida a distintas concentraciones. Las concentraciones ensayadas fueron 0,003, 0,005, 0,007, 0,01, 0,05 y 0,1 mg/ml respectivamente. El agua ácida se obtuvo preparando una disolución al 1,2 % de HCl 1 N en agua tipo I y su función es proporcionar el pH adecuado para la posterior reacción.

Una vez adicionado el estaño, los viales se encapsularon, se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se purgó con helio hasta el secado completo.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado con cada uno de los tipos de NPs y concentraciones de SnCl₂.

1.2.2 Marcaje de nanopartículas con tecnecio-99m

El [^{99m}Tc]TcO₄⁻ para el marcaje de las NPs se obtuvo a partir de un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m (Drytec ®, General Electric Healthcare, Reino Unido) mediante elución con 5 ml de suero fisiológico 0,9 %.

Para llevar a cabo el marcaje se adicionaron $74 \pm 0,57$ MBq de [^{99m}Tc]TcO₄ en 0,5 ml de suero fisiológico 0,9 % a cada uno de los viales preparados anteriormente. A continuación se agitó la mezcla en un vórtex durante 30 segundos y se incubó durante distintos tiempos.

Para determinar el tiempo óptimo de marcaje se extrajeron muestras a distintos tiempos para calcular la PRQ. Los tiempos ensayados fueron 5, 10, 15, 30 y 60 minutos tras el marcaje.

También se llevaron a cabo marcajes a distintas temperaturas para determinar su influencia sobre el marcaje. Las temperaturas ensayadas fueron temperatura ambiente ($24,2 \pm 0,7$ °C), 40 °C y 60 °C. Para obtener estas temperaturas los viales se incubaron en un termobloque agitador (UniThermix 1, LLG Labware, Alemania)

La figura 23 describe el proceso de marcaje de las NPs con tecnecio-99m.

Todos los marcajes se realizaron por triplicado con cada uno de los tipos de NP.

Tras el marcaje se midió el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial Z de todas las formulaciones.

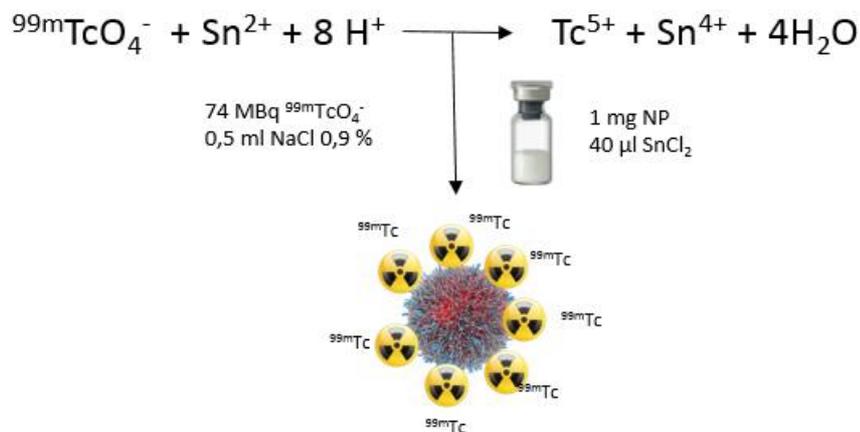


Figura 23. Reacción de radiomarcado con tecnecio-99m de las NPs de albúmina con recubrimiento polimérico

El control de calidad de las NPs marcadas se llevó cabo mediante radio-TLC empleando tiras Whatman 1 (General Electric, Reino Unido) (figura 24).

Para ello se añadieron con una micropipeta 5 μl de la muestra a 1 cm de la parte inferior de la tira y se desarrolló hasta 9 cm con suero fisiológico 0,9 %.

A continuación se dejó secar la tira al aire y se leyó en un radiocromatógrafo Scan-RAM (Lab-Logic Systems, Reino Unido), equipado con un detector de 2 x 2 de NaI(Tl) y el software Laura (Lab-Logic Systems, Reino Unido).



Figura 24. Cromatógrafo Scan-RAM (Lablogic ®) empleado para la determinación de la PRQ de las NPs marcadas (171)

El factor de retención (R_f) de las NPs marcadas con tecnecio-99m y de los coloides de tecnecio-99m es de 0 mientras que el $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ presenta un R_f de 1.

1.3 Estudios de estabilidad in vitro

Una vez optimizados todos los parámetros del marcaje se llevaron cabo estudios de estabilidad en suero fisiológico y en plasma sanguíneo.

Para ello las NPs marcadas se suspendieron en 200 μl de suero fisiológico 0,9 % o plasma sanguíneo y se incubaron a 37 °C en un baño térmico. A las 1, 3, 12, 24 y 48

horas se determinó la pureza radioquímica de la muestra mediante el método de cromatografía en capa fina descrito anteriormente.

Pasadas las 48 horas se midió el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial Z de todas las formulaciones.

1.4 Estudios de biodistribución *in vivo*

Los estudios de biodistribución *in vivo* de las NPs Nano-GPM2 marcadas con tecnecio-99m se llevaron a cabo en ratas Wistar hembra con un peso medio de $212 \pm 4,14$ gramos que fueron cuidadas en condiciones ambientales controladas (22 ± 1 °C, 12 horas de ciclos luz/oscuridad) y alimentadas bajo condiciones estándar con libre acceso a comida y bebida.

Todos los procedimientos con animales descritos en este trabajo se llevaron a cabo siguiendo un protocolo previamente aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Universidad de Navarra en línea con la legislación europea de animales de experimentación (2010/63/UE, protocolo 066-16).

Se ensayaron estas NPs por ser las que mejores resultados dieron en los ensayos de estabilidad realizados *in vitro*. Se establecieron dos grupos de 3 ratas cada uno (^{99m}Tc -Nano-GPM2 y $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ -libre como control). Se administró a cada animal por vía intravenosa en la vena de la cola una dosis única de $8,57 \pm 0,26$ MBq de ^{99m}Tc -Nano-GPM2 y $8,63 \pm 0,22$ MBq $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ respectivamente.

Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2 % (flujo de oxígeno 0,2 l/min) y colocados en posición prono en una gammacámara SPET/CT de doble cabezal Symbia T2-TruePoint® (Siemens, Munich, Alemania). Los animales se mantuvieron anestesiados únicamente durante la toma de las imágenes, tras lo cual se devolvieron a su jaula. La figura 25 muestra la preparación y colocación de los animales en el equipo.



Figura 25. Preparación y colocación de los animales en el equipo SPECT/CT

Las imágenes SPECT/CT fueron adquiridas 2, 6, 8, 10 y 24 horas tras la administración de las ^{99m}Tc -Nano-GPM2 o el control de $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ libre. Para poder comparar semi-cuantitativamente las imágenes entre sí evitando el efecto de la desintegración física del tecnecio-99m, el tiempo de adquisición de las imágenes fue aumentando a lo largo de los distintos puntos temporales los minutos necesarios para compensar la desintegración radiactiva del tecnecio-99m. Los parámetros de las imágenes SPECT fueron las siguientes: matriz 128 X 128, 90 imágenes, 7 imágenes por segundo y las del CT: 110 mAs y 130 kV, 130 imágenes, grosor de corte de 3 mm.

Las imágenes se reconstruyeron aplicando las correcciones de atenuación y dispersión durante el proceso de reconstrucción.

Las imágenes fusionadas se visualizaron utilizando el software Syngo MI Applications TrueD (Siemens, Alemania). Tras el análisis cualitativo, se exportaron al programa especializado de análisis de imagen molecular PMOD v3.2 (PMOD Technologies, Suiza). El análisis cuantitativo se realizó mediante dibujo de volúmenes de interés (VOIs) sobre las imágenes anatómicas del CT que posteriormente fueron llevadas a las imágenes de SPECT. Se dibujaron VOIs del contorno del animal (cuerpo total) y órganos de interés. El cálculo del porcentaje de actividad en los órganos se calculó tomando como total de dosis administrada la actividad medida en el VOI cuerpo total en la imagen a 2h.

1.5. Estudios de biodistribución ex vivo

Una vez realizadas todas las exploraciones SPECT/CT los animales se sacrificaron (24 horas) mediante inyección letal de eutanásico T-61, se diseccionaron y se extrajeron y pesaron sus órganos (hígado, pulmón, riñón, estómago, tiroides y sangre) para su posterior conteo en un contador gamma (Hidex AMG Automatic Gamma Counter; Hidex AMG. Software versión 1.3.7.0). Finalmente, los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad por órgano completo (excepto sangre).

2 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67

Para el marcaje de las NPs con galio-67 se empleó una técnica de marcaje indirecto mediante el empleo del BFCA NOTA. Previamente al marcaje se procedió a la conjugación de la albúmina con el NOTA y a la preparación de las NPs. Posteriormente se realizaron las pruebas para su marcaje con galio-67.

2.1 Obtención de nanopartículas modificadas con NOTA

2.1.1 Conjugación de la albúmina con NOTA

Para llevar a cabo el marcaje con el isótopo galio-67 se requiere la presencia de un BFCA por lo que previamente a la preparación de las NPs se procedió a la conjugación de la albúmina con el quelante NOTA.

En la figura 26 se muestra un esquema del procedimiento descrito.

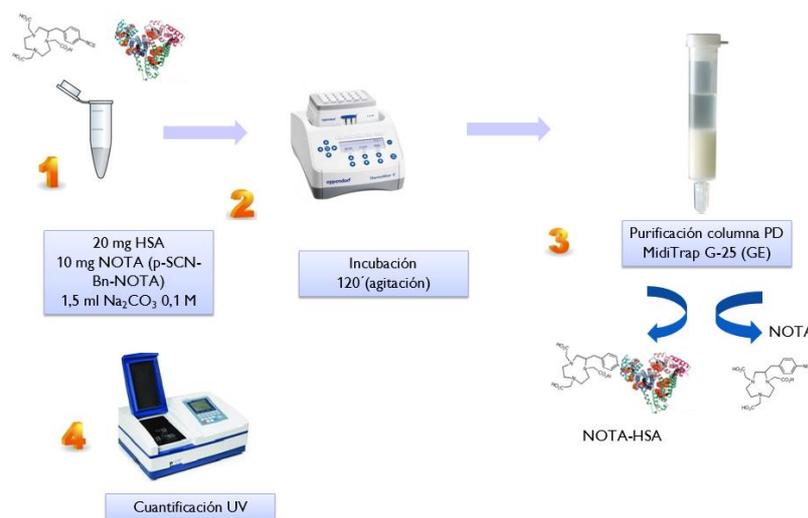


Figura 26. Reacción de conjugación de la albúmina con el quelante NOTA y posterior purificación con columna de desalinización

Para ello se incubaron 20 mg de albúmina y 10 mg de NOTA (ABX, Alemania) en 1,5 ml de tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,5 (Merck, Alemania).

Para establecer el tiempo óptimo de incubación se extrajeron alícuotas de 150 μ l a los 10', 30', 60' y una alícuota final de 1 ml a los 120 minutos.

Cada una de las alícuotas se diluyó en un volumen final de 1 ml con tampón carbonato sódico 0,1 M y se hizo pasar por una columna de desalinización (PD Miditrap G-25, General Electric, Reino Unido) previamente acondicionada con 8 ml de agua superpura (Romil, Barcelona), desechando dicha fracción. A continuación se adicionaron 1,5 ml de agua superpura y se recogieron en un tubo de plástico (conjugado albúmina-NOTA). Finalmente se adicionaron 2,5 ml de agua superpura y se recogieron en un tubo de plástico (NOTA no unido). Una vez recogidas las distintas fracciones se

procedió a su medida en un espectrómetro (UV-3100PC Spectrophotometer, VWR, Alemania) a una longitud de onda de 280 nm.

Una vez determinado el tiempo óptimo de incubación, se utilizó dicho tiempo para todos los ensayos realizados.

Con los datos de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de reacción del quelante NOTA y el porcentaje de recuperación de albúmina en cada uno de los puntos temporales, comparando dichos resultados con unas curvas de calibración para la albúmina y el NOTA realizadas previamente a los ensayos. En el caso del NOTA se llevó a cabo una curva de calibración empleando las siguientes concentraciones; 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml, mientras que en el caso de la albúmina se llevó a cabo una curva de calibración empleando las siguientes concentraciones; 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 20 mg/ml.

2.1.2 Preparación de las nanopartículas de albúmina modificadas con NOTA

Las NPs se prepararon mediante el método de desolvatación previamente descrito. Para determinar la cantidad óptima de albúmina modificada con NOTA en la preparación de las NPs se probaron las proporciones 100:2 y 100:3 de albúmina:albúmina modificada.

La mezcla albúmina:albúmina modificada se disolvió en 7 ml de agua tipo I mediante agitación. Una vez disuelta, se añadió la cantidad apropiada de HCl 1N y 16 ml de etanol absoluto y se incubó en agitación durante 10 minutos. Tras la incubación se adicionó el polímero correspondiente y se agitó durante 30 minutos. Las cantidades de polímero añadido en función del tipo de NP quedan reflejadas en la tabla 5.

NANOPARTÍCULA	HCL (μ l)	Polímero (mg)
NP-NOTA-HPMC	7	25
NP-NOTA-GMN ₂	6	3
NP-NOTA-GPM ₂	10	3
NP-NOTA-GTM ₂	9	3

Tabla 5. Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina modificada con NOTA

Pasado el tiempo de incubación, el etanol de la formulación se evaporó con un rotavapor hasta obtener un volumen final de 6 ml y las NPs se centrifugaron a 41.000 g durante 20 minutos.

Por último se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 3 ml de sacarosa al 3% como crioprotector. El vial final se congeló y posteriormente se liofilizó.

2.2 Marcaje de las nanopartículas con galio-67.

2.2.1 Conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67

El galio-67 empleado para la realización de estos estudios fue suministrado por Mallinckrodt Medical, B.V. (Le Petten, Holanda) en forma de sal de citrato de galio-67, con un pH comprendido entre 6,5 y 7,5. Esta forma química ha mostrado una baja eficiencia de marcaje en las reacciones de quelación por lo que es necesario convertir el citrato de galio-67 en cloruro de galio-67 para obtener mejores rendimientos de marcaje.

Para la conversión se empleó un método de extracción en fase sólida (SPE) descrito por Scasnar y col (172), basado en el método previamente desarrollado por Chang y col (173).

Con el fin de reducir la exposición del operador a la radiación y mejorar la reproducibilidad del proceso, se diseñó un nuevo método automatizado empleando una bomba de infusión (Perfusor Compact Infusion Syringe Pump, Braun, Alemania).

En primer lugar, el citrato de galio-67 se hizo pasar a través de dos columnas de sílica conectadas en serie (Silica Light, Sep-Pak®, WAT023537, Waters, USA) empleando la bomba de infusión. Para establecer el flujo óptimo de elución se llevaron a cabo pruebas con distintos flujos (0,1 ml/min, 0,2 ml/min y 0,5 ml/min).

Al pasar el citrato de galio-67 a través de las columnas los iones de galio presentes en la solución quedaron retenidos en la columna y la fracción residual fue recolectada en un vial de residuos (Vial A). Una vez se hizo pasar toda la solución se procedió a la medida de la actividad tanto de las columnas como del vial A en un activímetro (CRC-15R, Capintec, USA) para determinar el porcentaje de retención del galio-67.

En un segundo paso las columnas se lavaron con 4 ml de agua Milli-Q obtenida mediante un sistema de purificación de agua (Milli-Q Purification System, Millipore®, Alemania) con un flujo de 0,5 ml/min con el fin de eliminar el citrato de galio-67 remanente. El líquido eluido en este proceso fue recolectado en un segundo vial de residuos (vial B) y su actividad medida en un activímetro, así como la actividad de las columnas, para determinar la cantidad de galio-67 retenido en las mismas.

Por último el cloruro de galio-67 fue eluido de las columnas haciendo pasar una solución de HCl 0,1 M con un flujo de 0,1 ml/min. Se eluyó la actividad en 10 fracciones de 100 µl cada una, recogándose en tubos de microcentrífuga (Eppendorf®, Alemania). Posteriormente se procedió a la medición de la actividad de las 10 fracciones en un activímetro para obtener el perfil de elución del cloruro de galio-67. La fracción que presentó la máxima actividad fue utilizada para el posterior marcaje de las NPs.

Se determinó el pH de dicha fracción y se ajustó con una disolución de acetato de amonio 0,1 M (Merck ®, Alemania) hasta que se alcanzaron valores de pH de 3-5.

La figura 27 muestra el esquema de conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67.

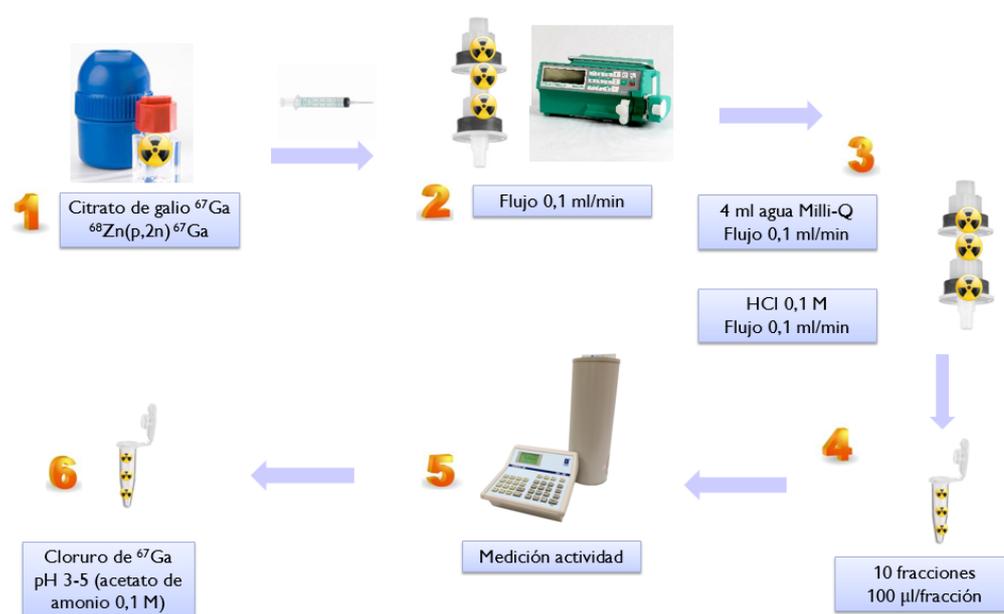


Figura 27. Proceso de conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67 empleando un método automatizado.

2.2.2 Marcaje con galio-67 y purificación de las nanopartículas

El marcaje de las NPs se llevó a cabo mediante su incubación con el cloruro de galio-67. Para ello se preparó una solución de 2 mg de NPs en 100 µl de agua milli-Q y se

incubaron con 37 MBq de la solución de cloruro de galio-67 en un volumen de 100 μ l y 200 μ l de acetato sódico 0,2 M (Merck, Alemania) acidificado con ácido acético (Merck, Alemania) hasta alcanzar un pH de 3,8. La mezcla se incubó durante distintos tiempos (15 y 30 minutos) y a distintas temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C y 60 °C en un termobloque agitador para determinar los parámetros óptimos de marcaje.

Tras la incubación, la mezcla se purificó mediante filtración por centrifugación empleando una centrífuga y filtros Amicon 30 kDa Ultra 0,5 ml (Millipore, Francia). Tras la centrifugación, el precipitado fue lavado 2 veces con una solución de acetato sódico 0,2 M (pH 3.8) para eliminar el galio-67 que no había reaccionado (figura 28).

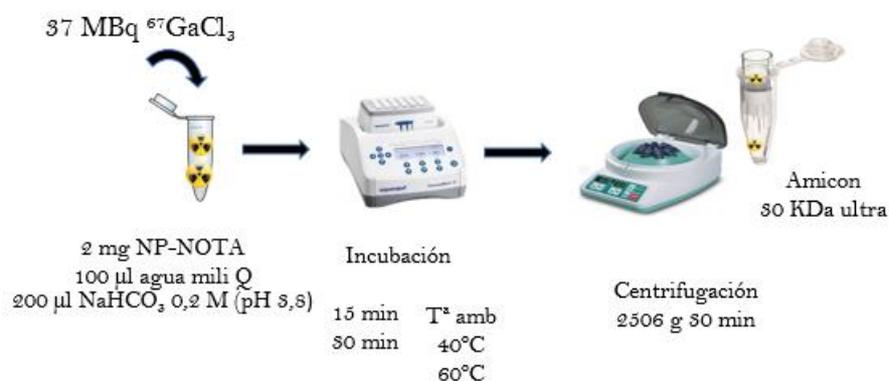


Figura 28. Reacción de marcaje con cloruro de galio-67 de las NPs de albúmina modificadas con NOTA y recubiertas con polímeros.

Tras el lavado se midió la actividad del precipitado, del sobrenadante y de los lavados en un activímetro.

La eficiencia del marcaje se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de marcaje (\%)} = A_{\text{filtro}} / (A_{\text{filtro}} + A_{\text{filtrados}}) * 100$$

Donde A_{filtro} es la actividad presente en el filtro y $A_{\text{filtrados}}$ es la actividad presente en el sobrenadante y los posteriores lavados.

Todos los marcajes se realizaron por triplicado con cada uno de los tipos de NPs.

2.3 Estudios de estabilidad *in vitro*

La estabilidad de las NPs se ensayó en suero fisiológico al 0,9 % y en plasma sanguíneo.

Las NPs purificadas mediante el procedimiento anteriormente descrito se resuspendieron en 300 μl de suero fisiológico al 0,9 % o en plasma sanguíneo. A continuación se fraccionó en 6 alícuotas que se incubaron a 37°C durante 1, 3, 12, 24, y 48 horas respectivamente empleando un bloque térmico.

Pasado el tiempo correspondiente las muestras se filtraron mediante centrifugación en filtros Amicon Ultra y se midió la actividad del filtro (*pellet*) y del sobrenadante (filtrado).

La estabilidad de las NPs se calculó mediante la determinación del porcentaje de NPs marcadas con la siguiente ecuación

$$\text{NP marcada (\%)} = A_{\text{pellet}} / A_{\text{pellet}} + A_{\text{filtrado}} * 100$$

Donde A_{pellet} es la actividad presente en el *pellet* del filtro y $A_{\text{filtrados}}$ es la actividad presente en el sobrenadante.

Las pruebas de estabilidad se realizaron por triplicado con cada una de los tipos de NPs.

2.4 Estudios de biodistribución *in vivo*

Los estudios de biodistribución *in vivo* de las NPs ^{67}Ga -NOTA-GPM2 se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo animal empleado en el marcaje con tecnecio-99m.

Se establecieron dos grupos de 3 ratas cada uno (^{67}Ga -NOTA-GPM2 y cloruro de galio-67 libre como control). Se administró a cada animal por vía intravenosa en la vena de la cola una dosis única de $8,31 \pm 0,12$ MBq de ^{67}Ga -NOTA-GPM2 y $9,07 \pm 0,60$ MBq de cloruro de galio-67 respectivamente.

Las imágenes SPECT/CT fueron adquiridas tras 2, 6, 8, 10 y 48 horas tras la administración de las ^{67}Ga -NOTA-GPM2 o el control de cloruro de galio-67 libre. Para poder comparar cuantitativamente las imágenes entre sí evitando el efecto de la desintegración física del galio-67, el tiempo de adquisición de las imágenes fue aumentando a lo largo de los distintos puntos temporales para compensar el decaimiento físico del galio-67. Los parámetros de las imágenes SPECT fueron las siguientes: matriz 128 X 128, 90 imágenes, 7 imágenes por segundo y las del CT: 110 mAs y 130 kV, 130 imágenes, grosor de corte de 3 mm. Las imágenes se reconstruyeron aplicando las correcciones de atenuación y dispersión durante el proceso de reconstrucción.

Las imágenes fusionadas se visualizaron utilizando el software Syngo MI Applications TrueD (Siemens). Tras el análisis cualitativo, se exportaron al programa especializado de análisis de imagen molecular PMOD v3.2 (PMOD Technologies, Switzerland). El análisis cuantitativo se realizó mediante dibujo de volúmenes de interés (VOIs) sobre las imágenes anatómicas del CT que posteriormente fueron llevadas a las imágenes de SPECT. Se dibujaron VOIs del contorno del animal (cuerpo

total), y órganos de interés. El cálculo del % de actividad en los órganos se calculó tomando como total de dosis administrada la actividad medida en el VOI cuerpo total en la imagen a 2h.

2.5 Estudios de biodistribución *ex vivo*

Una vez realizadas todas las exploraciones SPECT/CT los animales se sacrificaron mediante inyección letal de eutanásico T-61, se diseccionaron y se extrajeron y pesaron sus órganos (hígado, pulmón, riñón, estómago y sangre), para su posterior contaje en un contador gamma (Hidex AMG Automatic Gamma Counter; Hidex AMG. Software versión 1.3.7.0). Finalmente, los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad por órgano completo (excepto sangre).

2.6 Marcaje con galio-67 de las nanopartículas de albúmina no modificadas con nota

Con el fin de comprobar la necesidad de la presencia del quelante NOTA para el marcaje de las NPs con galio-67 se procedió a marcar con galio-67 las NPs de albúmina no modificadas con dicho quelante.

El marcaje se llevó a cabo con cloruro de galio-67 obtenido mediante el procedimiento previamente descrito en el apartado 2.2.1 (conversión del citrato de galio en cloruro de galio).

Para ello se preparó una solución de 2 mg de NPs en 200 µl de agua milli-Q y se incubaron con 37 MBq de la solución de cloruro de galio-67 en un volumen de 100 µl y 200 µl de acetato sódico 0,2 M (Merck ®, Alemania) acidificado con ácido acético (Merck, Alemania) hasta alcanzar un pH de 3,8. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30°C de temperatura en un termobloque agitador.

Tras la incubación, la mezcla se purificó mediante filtración por centrifugación con filtros Amicon y el precipitado fue lavado 2 veces con una solución de acetato sódico 0,2 M (pH 3,8) para eliminar el cloruro de galio-67 que no había reaccionado.

Posteriormente se midió la actividad del precipitado, del sobrenadante y de los lavados en un activímetro para determinar el porcentaje de NPs marcadas.

Todos los marcajes se realizaron por triplicado con cada uno de los tipos de NP.

3 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON ZIRCONIO-89

Para el marcaje de las NPs con zirconio-89 se empleó una técnica de marcaje indirecto mediante el empleo del BFCA DFO. Previamente al marcaje se procedió a la conjugación de la albúmina con la DFO y a la reparación de las NPs y posteriormente se realizaron las pruebas para su marcaje con zirconio-89.

3.1 Obtención de nanopartículas modificadas con DFO

3.1.1 Conjugación de la albúmina con DFO

Previamente a la preparación de las NPs se procedió a la conjugación de la albúmina con el quelante DFO siguiendo el protocolo descrito por Vosjan y col (174)

Para ello se disolvieron 10 mg de albúmina en 1 ml de suero fisiológico ajustando el pH a 8,9-9,1 con una solución de carbonato sódico 0,1 M (Merck, Alemania).

A continuación se disolvieron 7,6 mg de DFO en 1 ml de dimetilsulfóxido (Merck, Alemania) y 20 µl de esta disolución, en fracciones de 5 µl cada una, fueron adicionadas a la solución de albúmina, procediendo a su incubación durante 30 minutos a 37 °C en agitación de 150 g empleando un termobloque agitador.

Una vez transcurrido el tiempo se procedió a pasar la mezcla de reacción a través de una columna de desalinización PD10 previamente acondicionada con 20 ml de una solución de ácido gentísico (Merck, Alemania) 5 mg/ml en acetato de sodio 0,25 M (pH 5,4-5,6), desechando dicha fracción. A continuación se adicionaron 1,5 ml de la solución de ácido gentísico 5 mg/ml y se recogieron en un tubo de plástico (albúmina-DFO), manteniéndolo a -20°C hasta su posterior utilización en la preparación de las NPs.

Durante el posterior proceso de preparación de las NPs se observó que al añadir el polímero conjugado las NPs previamente formadas se aglutinaban y precipitaban. Ante esta situación se decidió llevar a cabo la conjugación de la albúmina con la DFO en medio básico (carbonato sódico 0,1 M, pH 8,9-9,1 en vez de ácido gentísico/acetato de sodio 0,25 M, pH 5,4-5,6).

3.1.2 Preparación de las nanopartículas de albúmina modificada con DFO

Las NPs se prepararon mediante el método de desolvatación. A raíz de los resultados obtenidos en la preparación de las NPs de albúmina modificada con NOTA, en este caso se empleó una proporción 100:3 de albúmina:albúmina modificada.

Se pesaron 100 mg de albúmina y 3 mg de albúmina modificada con DFO, que fueron dispersas en 7 ml de agua tipo I mediante agitación. Una vez disuelta la mezcla, se añadió la cantidad apropiada de HCl 1N y 16 ml de etanol absoluto y se incubó en agitación durante 10 minutos. Tras la incubación se adicionó el polímero

correspondiente y se agitó durante 30 minutos. Las cantidades de HCl y polímero añadido en función del tipo de NP quedan reflejadas en la tabla 6.

NANOPARTÍCULA	HCL (μ l)	Polímero (mg)
NP-DFO-HPMC	10	25
NP-DFO-GMN ₂	13	3
NP-DFO-GPM ₂	17	3
NP-DFO-GTM ₂	15	3

Tabla 6. Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina modificadas con DFO

Tras la incubación con el polímero, el etanol de la formulación se eliminó mediante evaporación bajo presión reducida en un rotavapor hasta obtener un volumen final de 6 ml. Una vez evaporado el etanol, las NPs se centrifugaron a 41.000 g durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 3 ml de sacarosa al 3% como crioprotector para su posterior liofilización.

Una vez preparadas, todas las NPs se caracterizaron mediante espectroscopía de correlación fotónica (tamaño e índice de polidispersión) y anemometría laser doppler (potencial zeta).

3.2 Marcaje con galio-67 de las nanopartículas modificadas con DFO.

Debido a la baja disponibilidad del zirconio-89, previamente a la realización de las pruebas de marcaje con este radioisótopo se llevó a cabo el marcaje de las NPs con galio-67, con el fin de comprobar la correcta unión del quelante DFO a la NP, de tal forma que esta pueda ser susceptible de ser marcada con zirconio-89.

El marcaje se realizó con cloruro de galio-67 obtenido mediante el procedimiento previamente descrito en el apartado 2.2.1 (purificación del galio-67).

Para ello se preparó una solución de 2 mg de NPs en 200 μ l de agua milli-Q y se incubaron con 37 MBq de la solución de cloruro de galio-67 en un volumen de 100 μ l y 200 μ l de acetato sódico 0,2 M acidificado con ácido acético hasta alcanzar un pH de 3,8. La mezcla se incubó durante 30 minutos a distintas temperaturas (T^a ambiente, 30°C y 60°C) en un termobloque agitador.

Tras la incubación, la mezcla se purificó mediante filtración por centrifugación y el precipitado fue lavado 2 veces con una solución de acetato sódico 0,2 M (pH 3,8) para eliminar el galio-67 que no había reaccionado.

Posteriormente se midió la actividad del precipitado, del sobrenadante y de los lavados en un activímetro para determinar la eficiencia del marcaje.

Todos los marcajes se realizaron por triplicado con cada uno de los tipos de nanopartícula.

3.2.1 Estudios de estabilidad de las nanopartículas marcadas

La estabilidad de las NPs tras el marcaje con galio-67 se ensayó por triplicado en suero fisiológico al 0,9 % y en plasma sanguíneo mediante el procedimiento previamente descrito a las 1, 3, 12, 24 y 48 horas post-marcaje.

3.3 Marcaje con zirconio-89 de las nanopartículas modificadas con DFO

El zirconio-89 empleado para el marcaje de las NPs fue suministrado por Perkin Elmer España (Madrid, España).

El procedimiento se realizó siguiendo protocolos descritos por distintos autores con pequeñas variaciones (55) (174) (175) (176).

Se tomaron 200 μCi de zirconio-89 y se llevaron a un volumen final de 200 μl con una solución de ácido oxálico 1 M en un vial de vidrio de 10 ml, colocándolo en un agitador. A continuación se añadieron 90 μl de carbonato de sodio 2 M y pasados 3 minutos se adicionaron 300 μl de ácido 4-(hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES, pH 7,2), 2 mg de las nano-DFO-GPM2 dispersas en 710 μl de NaCl 0,9 % y 700 μl de HEPES, dejando incubar en agitación suave durante una hora. Se repitió el proceso con las nano-DFO-GMN2.

Pasada la hora de incubación se observó que se había producido un precipitado, se agitó en el vórtex para su disolución. Se realizó el control de calidad mediante radio-TLC empleando para ello tiras de cromatografía Whatman 1 y una fase móvil de ácido cítrico 20 mM (pH 5,0, Merck, Alemania).

Se colocó la mezcla de reacción en una columna PD10 preacondicionada con 20 ml de una solución de ácido gentísico 5mg/ml en acetato de sodio 0,25 M (pH 5,5). Se adicionó 1 ml de la solución de ácido gentísico desechando la fracción eluida y posteriormente se adicionaron 1,5 ml de la solución de ácido gentísico recogiendo en un vial la fracción correspondiente a las NPs marcadas y determinándose el rendimiento de marcaje con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de marcaje (\%)} = \text{MBq } ^{89}\text{Zr vial producto} / \text{MBq } ^{89}\text{Zr inicial} * 100$$

Al medir el vial de producto y al realizar el control de calidad se observó que no se había producido el marcaje de las NPs. Por ello se decidió modificar el procedimiento de marcaje.

Se prepararon 200 μCi de zirconio-89 y se llevaron a un volumen final de 200 μl con una solución de ácido oxálico 1 M en un vial de vidrio de 10 ml, colocando en un agitador. A continuación se añadieron 90 μl de carbonato de sodio 2 M y pasados 3 minutos se adicionaron 1000 μl de HEPES, 5 mg de las NPs -DFO-GPM2 dispersas en 710 μl de agua para inyección, dejando incubar en agitación suave durante una hora. Se repitió el proceso con las NPs -DFO-GMN2.

Se decidió emplear agua para inyección en vez de NaCl con el fin de evitar la posible formación de iones hipoclorito que pudieran interferir en la reacción de marcaje. También se añadió todo el HEPES al comienzo de la reacción con el fin de incrementar el pH de la reacción

Pasada la hora de incubación se realizó el control de calidad mediante radio-TLC empleando el método previamente descrito.

Tras la incubación, la mezcla se purificó mediante filtración por centrifugación, determinándose la eficiencia del marcaje con la siguiente ecuación

Se volvió a observar que el marcaje no se había producido el marcaje por lo que se planteó la posibilidad de que las NPs se vieran afectadas por la presencia del ácido oxálico y para la comprobación de este hecho se midió el tamaño de las NPs antes y después de la adición de 200 μ l de ácido oxálico.

V. RESULTADOS

En este apartado se detallan los resultados derivados de los trabajos realizados durante esta tesis doctoral

1 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON TECNECIO-99M

1.1 Preparación de las nanopartículas

Las NPs fueron caracterizadas mediante la medida de su tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta, empleando la espectroscopía de correlación fotónica y la anemetría de láser Doppler.

La tabla 7 resume las principales características físico-químicas de las diferentes formulaciones de NPs empleadas en este trabajo. El tamaño de las NPs con recubrimiento polimérico osciló entre 199 y 310 nanómetros (nm), siendo el potencial zeta negativo obtenido entre -12 mV y -26 mV.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
NP (sin recubrimiento)	191 ± 1,73	0,137 ± 0,014	-20,82 ± 0,33
NP-HPMC	278 ± 2,79	0,245 ± 0,007	-14,14 ± 1,16
NP-GTM ₂	203 ± 3,83	0,205 ± 0,029	-25,25 ± 0,46
NP-GMN ₂	309 ± 0,50	0,181 ± 0,08	-18,35 ± 0,78
NP-GPM ₂	244 ± 3,40	0,153 ± 0,09	-21,19 ± 0,45

Tabla 7. Características físico-químicas de las NPs de albúmina con recubrimiento polimérico

1.2 Marcaje de las nanopartículas con tecnecio-99m

1.2.1 Optimización de la concentración de cloruro de estaño

Se obtuvieron viales tipo “kit” con distintas concentraciones de SnCl₂ de forma óptima y reproducible, permitiendo su conservación hasta el posterior marcaje con tecnecio-99m.

En la figura 29 se muestran las eficiencias de marcaje obtenidas con las 6 concentraciones de SnCl₂ ensayadas en cada una de las formulaciones de NPs mediante radio-TLC.

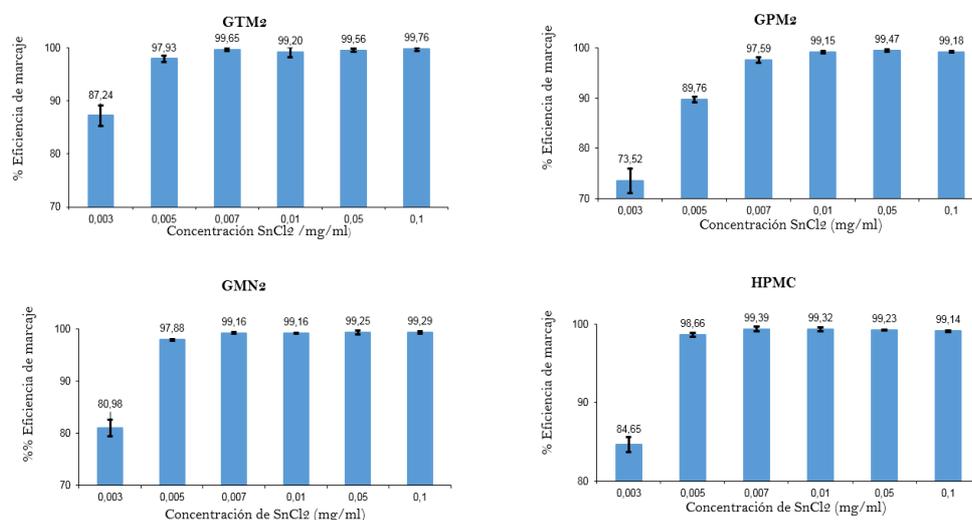


Figura 29. Eficiencia de marcaje en función de la concentración de SnCl₂ empleada en cada una de las formulaciones ensayadas. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ ($n = 3$).

Se fijó como la concentración óptima de SnCl₂ aquella con la cual se obtenía un elevado rendimiento de marcaje con una pequeña fracción de [^{99m}Tc]NaTcO₄⁻, asegurando de esta manera la ausencia de formación de coloides de tecnecio-99m.

La concentración de SnCl₂ que mostró una mayor eficiencia de marcaje fue 0,007 mg/ml para las NPs GPM₂ y 0,005 mg/ml para el resto de las formulaciones. Con esta concentración la eficiencia de marcaje obtenida determinada mediante radio-TLC fue de $97,93 \pm 0,61$ %, $97,59 \pm 0,52$ %, $97,88 \pm 0,14$ % y $98,66 \pm 0,24$ % para las NPs ^{99m}Tc-GTM₂, ^{99m}Tc-GPM₂, ^{99m}Tc-GMN₂ y ^{99m}Tc-HPMC respectivamente.

En la figura 30 se muestran los cromatogramas para cada una de las formulaciones de NPs, utilizando las concentraciones de SnCl₂ óptimas determinadas anteriormente.

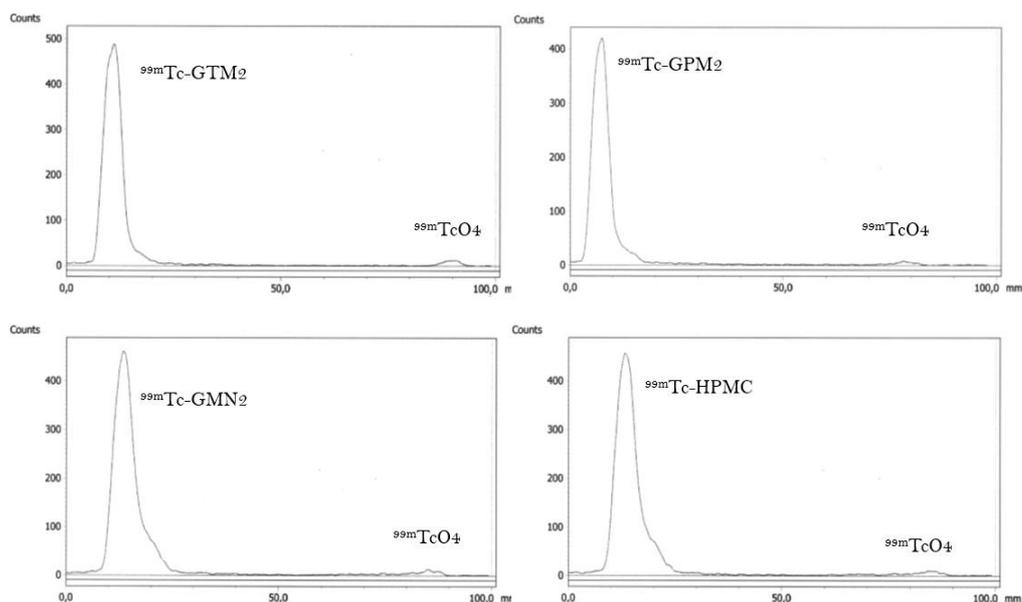


Figura 30. Cromatogramas obtenidos en el control de pureza radioquímica de las distintas formulaciones

1.2.2 Optimización del tiempo de marcaje

Estos experimentos se realizaron utilizando la concentración de cloruro de estaño óptima para cada tipo de NP y fijada en los experimentos anteriores. Tras el marcaje de las NPs a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos) se observó que a los 10 minutos la pureza radioquímica medida mediante radio-TLC era superior al 97 %, observándose una ligera disminución de la misma tras el incremento en el tiempo de incubación por lo que se decidió establecer el tiempo de incubación óptimo en 10 minutos (figura 31).

La pureza radioquímica obtenida a los 10 minutos de incubación fue de $97,41 \pm 0,25$ %, $98,03 \pm 0,09$ %, $98,11 \pm 0,13$ % y $97,99 \pm 0,42$ % para las NPs $^{99m}\text{Tc-GTM}_2$, $^{99m}\text{Tc-GPM}_2$, $^{99m}\text{Tc-GMN}_2$ y $^{99m}\text{Tc-HPMC}$ respectivamente.

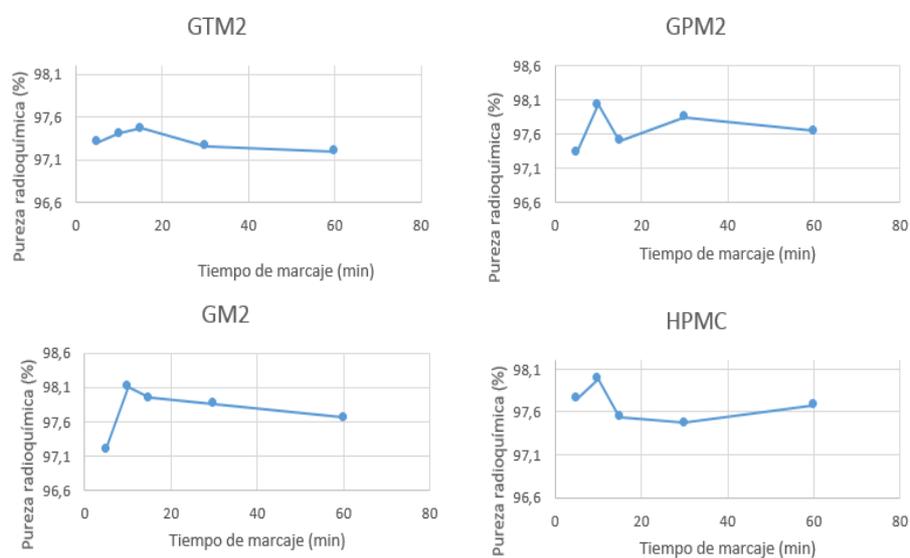


Figura 31. Influencia el tiempo de incubación en el marcaje de las NPs. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ ($n=3$)

1.2.3 Optimización de la temperatura de incubación

Estos experimentos se realizaron utilizando la concentración de cloruro de estaño y tiempo de marcaje óptimos determinados en experimentos anteriores. Tras la incubación durante 10 minutos de las NPs a distintas temperaturas para comprobar la influencia de la misma se observó que la pureza radioquímica obtenida tras la incubación de las NPs a temperaturas de $40,3 \pm 0,4$ °C y $60,2 \pm 0,5$ °C disminuía con respecto a la obtenida a temperatura ambiente ($24,2 \pm 0,7$ °C) por lo que se estableció dicha temperatura como la óptima para el marcaje.

La pureza radioquímica obtenida tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente fue $97,31 \pm 0,26 \%$, $98,03 \pm 0,10 \%$, $98,11 \pm 0,14 \%$ y $98,65 \pm 0,24 \%$ para las NPs ^{99m}Tc -GTM $_2$, ^{99m}Tc -GPM $_2$, ^{99m}Tc -GMN $_2$ y ^{99m}Tc -HPMC respectivamente.

En la figura 32 se muestran los resultados de pureza radioquímica obtenidos en función de la temperatura de incubación de cada una de las formulaciones de NPs.

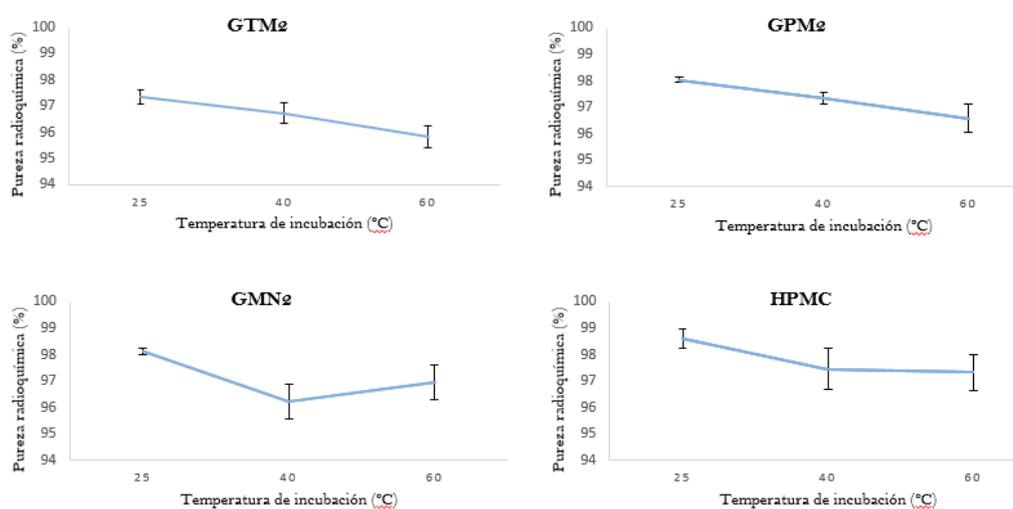


Figura 32. Influencia de la temperatura de incubación en el marcaje de cada una de las formulaciones. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ ($n = 3$).

La tabla 8 muestra el tamaño de partícula y el potencial Z de las NPs medido tras su marcaje con tecnecio-99m, utilizando las condiciones óptimas.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
$^{99m}\text{Tc-HPMC}$	$289 \pm 1,15$	$0,189 \pm 0,004$	$-13,10 \pm 0,61$
$^{99m}\text{Tc-GTM2}$	$211 \pm 1,26$	$0,201 \pm 0,020$	$-22,40 \pm 2,1$
$^{99m}\text{Tc-GMN2}$	$321 \pm 0,75$	$0,193 \pm 0,09$	$-17,43 \pm 0,6$
$^{99m}\text{Tc-GPM2}$	$257 \pm 1,35$	$0,101 \pm 0,007$	$-19,12 \pm 1,03$

Tabla 8. Características físico-químicas de las NPs tras el marcaje con tecnecio-99m

Tras el marcaje con tecnecio-99m se observó un ligero incremento en el tamaño de las NPs debido a la incorporación del radioisótopo. Este incremento fue de 11, 8, 12 y 13 nm en las NPs $^{99m}\text{Tc-HPMC}$, $^{99m}\text{Tc-GTM2}$, $^{99m}\text{Tc-GMN2}$ y $^{99m}\text{Tc-GPM2}$ respectivamente.

El potencial Z se mantuvo estable observándose un ligero aumento del mismo en todas las formulaciones (1,04; 2,85; 0,92 y 2,07 mV en las NPs $^{99m}\text{Tc-HPMC}$, $^{99m}\text{Tc-GTM2}$, $^{99m}\text{Tc-GMN2}$ y $^{99m}\text{Tc-GPM2}$ respectivamente).

1.3 Estudios de estabilidad in vitro

La estabilidad del marcaje de las NPs se ensayó en suero fisiológico y plasma sanguíneo durante 48 horas, determinándose el porcentaje de NPs marcadas a distintos tiempos mediante el cálculo de la PRQ con radio-TLC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DS) en las tablas 9 y 10.

La figura 33 muestra de forma gráfica la evolución de la estabilidad de las NPs en función del tiempo en suero fisiológico 0,9% y plasma sanguíneo respectivamente.

NANO	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
$^{99m}\text{Tc-GTM}2$	$97,66 \pm 0,37$	$97,08 \pm 0,86$	$94,13 \pm 0,91$	$87,50 \pm 0,64$	$75,69 \pm 1,31$
$^{99m}\text{Tc-GPM}2$	$97,09 \pm 0,46$	$96,37 \pm 0,47$	$95,89 \pm 0,64$	$85,93 \pm 1,61$	$76,60 \pm 1,18$
$^{99m}\text{Tc-GMN}2$	$97,11 \pm 0,11$	$96,4 \pm 0,37$	$92,08 \pm 0,69$	$85,77 \pm 0,53$	$71,31 \pm 0,75$
$^{99m}\text{Tc-HMPC}$	$97,51 \pm 0,42$	$96,76 \pm 0,52$	$93,45 \pm 0,31$	$86,85 \pm 0,95$	$70,15 \pm 1,10$

Tabla 9. Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en suero fisiológico 0,9 %. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC ($n = 3$)

NANO	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
$^{99m}\text{Tc-GTM}2$	$97,35 \pm 0,20$	$95,90 \pm 0,74$	$91,57 \pm 0,37$	$81,49 \pm 1,57$	$70,26 \pm 0,59$
$^{99m}\text{Tc-GPM}2$	$97,22 \pm 0,21$	$96,88 \pm 0,56$	$90,25 \pm 0,84$	$82,51 \pm 1,26$	$73,69 \pm 1,44$
$^{99m}\text{Tc-GMN}2$	$97,17 \pm 0,54$	$95,59 \pm 0,44$	$92,39 \pm 1,15$	$84,62 \pm 1,10$	$68,44 \pm 0,92$
$^{99m}\text{Tc-HMPC}$	$96,93 \pm 0,54$	$95,32 \pm 0,57$	$91,16 \pm 0,92$	$86,10 \pm 0,91$	$66,80 \pm 1,41$

Tabla 10. Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC ($n = 3$)

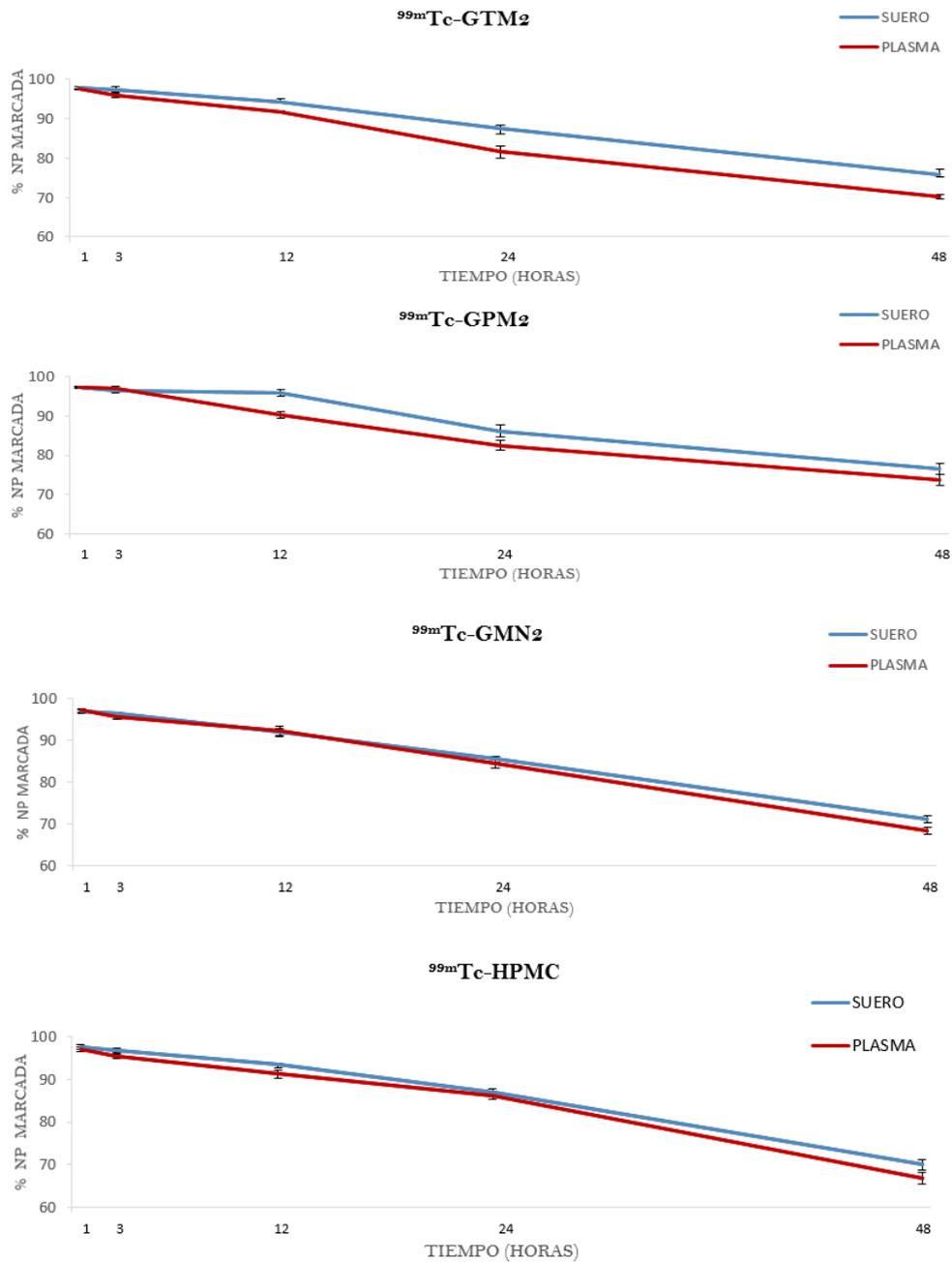


Figura 33. Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en suero fisiológico 0,9% y en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC ($n = 3$)

El marcaje de las NPs presentó una elevada estabilidad durante las primeras horas reduciéndose de forma lenta a lo largo del tiempo. Los estudios de estabilidad mostraron que 48 horas tras el marcaje, la PRQ era superior al 70 % en suero fisiológico y al 65 % en plasma sanguíneo en todas las formulaciones de NPs, presentando mejores resultados las NPs GPM2 ($76,60 \pm 1,18$ % en suero fisiológico $0,9$ % y $73,69 \pm 1,44$ % en plasma sanguíneo).

La tabla 11 muestra el tamaño de partícula y el potencial Z de las NPs tras 48 horas del marcaje con tecnecio-99m.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIALZ (mV)
$^{99m}\text{Tc-HPMC}$	$294 \pm 2,17$	$0,195 \pm 0,03$	$-10,1 \pm 1,5$
$^{99m}\text{Tc-GTM2}$	$217 \pm 2,25$	$0,216 \pm 0,06$	$-15,50 \pm 0,6$
$^{99m}\text{Tc-GMN2}$	$327 \pm 1,21$	$0,201 \pm 0,07$	$-13,41 \pm 0,75$
$^{99m}\text{Tc-GPM2}$	$261 \pm 0,25$	$0,104 \pm 0,006$	$-15,31 \pm 0,3$

Tabla 11. Características físico-químicas de las NPs 48 horas después del marcaje con tecnecio-99m

Pasadas las 48 horas del marcaje las NPs incrementaron su tamaño en 16, 14, 18 y 17 nm en las NPs $^{99m}\text{Tc-HPMC}$, $^{99m}\text{Tc-GTM2}$, $^{99m}\text{Tc-GMN2}$ y $^{99m}\text{Tc-GPM2}$, respectivamente.

En el caso del potencial Z se observó una elevación pronunciada en el caso de las $^{99m}\text{Tc-GTM2}$ (9,75 mV) y reducida en el resto de los casos (4,04; 4,99 y 5,88 mV para las NPs $^{99m}\text{Tc-HPMC}$, $^{99m}\text{Tc-GMN2}$ y $^{99m}\text{Tc-GPM2}$ respectivamente).

1.4. Estudios de biodistribución in vivo

La figura 34 muestra las imágenes de SPECT/CT de la distribución de las ^{99m}Tc -GPM2 tras su administración intravenosa frente a las imágenes obtenidas tras la administración de las NPs $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$. Las imágenes son cortes longitudinales del mismo animal a lo largo del tiempo. En la gráfica de barras apiladas, la altura de la barra indica el promedio de los datos del porcentaje de dosis inyectada en ese órgano para ese punto temporal.

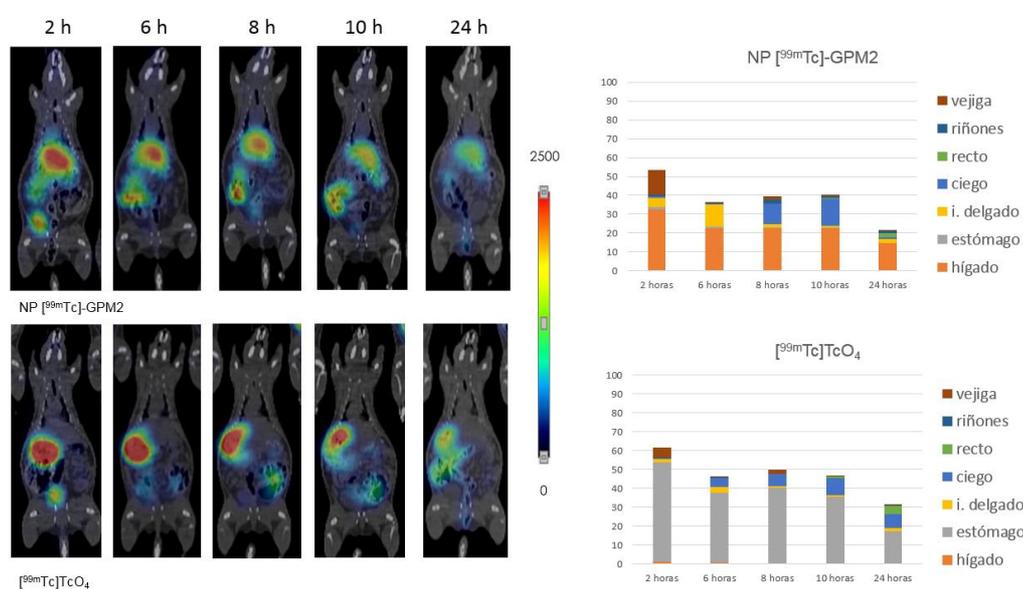


Figura 34. Imágenes SPECT/CT tras la administración intravenosa de NPs ^{99m}Tc -GPM2 vs $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$ en un mismo animal a lo largo del tiempo y cuantificación del porcentaje de dosis inyectada por órgano ($n = 3$).

Se puede observar que tras su administración, las NPs se dirigen fundamentalmente al hígado permaneciendo en él pasadas las 24 horas ($36,66 \pm 3,78$ % a las 2 horas, $14,66 \pm 0,57$ % a las 24 horas).

A las 2 horas se observa una importante cantidad de radiactividad en vejiga ($12,66 \pm 1,15$ %) y un incremento en la captación a nivel del intestino delgado ($4,66 \pm 2,30$ %).

%), llegando a alcanzar un pico a las 6 horas ($11,66 \pm 2,88$ %). A partir de las 8 horas la actividad intestinal se concentra en el ciego ($10,66 \pm 1,52$ %). La actividad en los riñones a las 24 horas fue $1,66 \pm 0,57$ %.

En el caso de los controles con $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ la actividad se localiza fundamentalmente en estómago ($52,66 \pm 9,8$ % a las 2 horas, $17 \pm 8,5$ % a las 24 horas).

1.5. Estudios de biodistribución ex vivo

La figura 35 representa el porcentaje de la dosis inyectada por órgano tras el sacrificio de los animales pasadas 24 horas de la inyección de las NPs marcadas y del $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ y contaje de su actividad en contador de pozo.

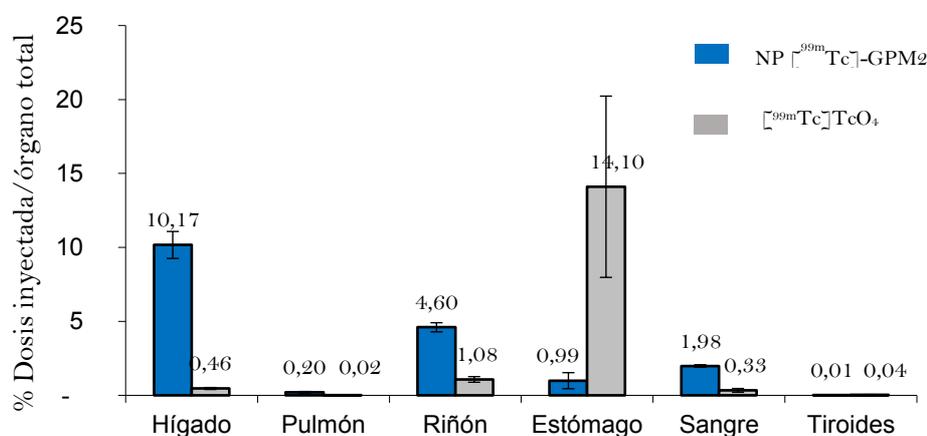


Figura 35. Porcentaje de dosis inyectada por órgano medida en contador de pozo tras el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como media \pm DS ($n=3$).

De todos los órganos recogidos, la mayor cantidad de dosis se observó en hígado ($10,17 \pm 0,91$ %), seguido de un menor acumulación en los riñones ($4,60 \pm 0,30$ %) y el estómago ($0,99 \pm 0,54$ %).

En el caso de los animales control la actividad se concentró fundamentalmente en el estómago ($14,10 \pm 6,12$ %), coincidiendo con lo observado en los estudios *in vivo* y la distribución fisiológica del $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$.

2 MARCAJE DE NANOPARTÍCULAS CON GALIO-67

2.1 Obtención de las nanopartículas modificadas con NOTA

2.1.1 Conjugación de la albúmina con el NOTA

Los resultados del porcentaje de reacción del quelante NOTA en cada uno de los puntos temporales se muestran en la figura 36. A los 60 minutos el porcentaje de reacción fue del 79,8 % y a los 120 minutos de 80,6 %. Debido a que al aumentar una hora el tiempo de incubación no se observó un incremento significativo del porcentaje de reacción, se fijó como óptima una incubación de 60 minutos.

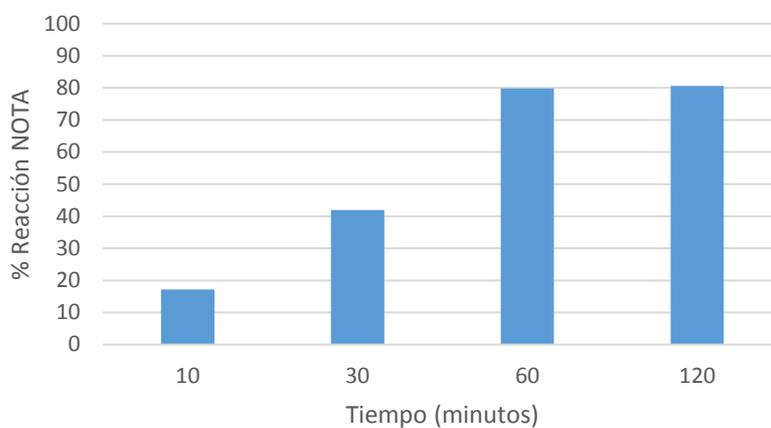
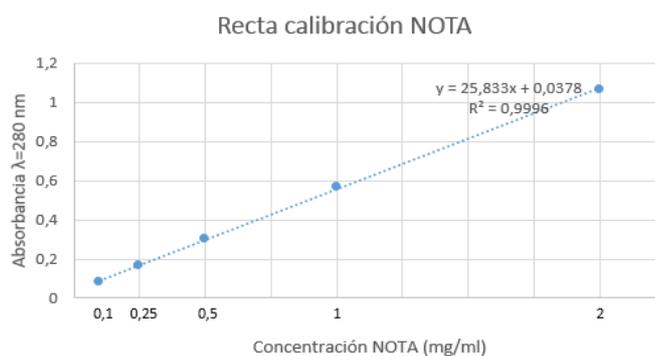


Figura 36. Porcentaje de reacción del quelante NOTA a distintos tiempos de incubación

La recuperación final del conjugado albúmina-NOTA fue del $84 \pm 2,3$ %. La figura 37 muestra las curvas de calibración de la albúmina y NOTA utilizadas para la obtención de los resultados anteriores.



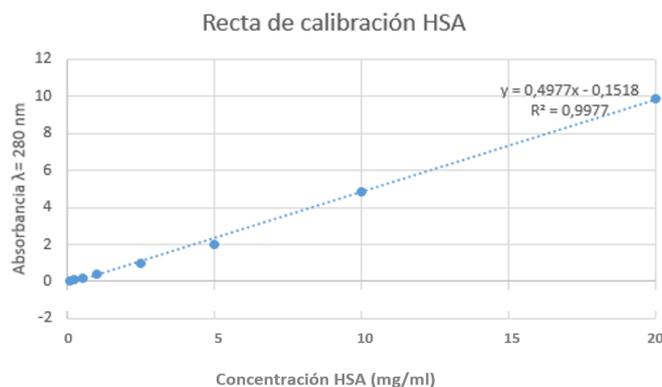


Figura 37. Recta de calibración del quelante NOTA (fila superior) y de la albúmina (fila inferior)

2.1.2 Preparación de las nanopartículas de albúmina modificada con NOTA

Las tablas 12 y 13 muestran los resultados obtenidos en la preparación de las NPs empleando una proporción 100:2 y 100:3 de albúmina:albúmina modificada respectivamente.

La proporción con la que se obtuvieron mejores resultados fue la de 100:3 ya que en el caso de la proporción 100:2 se observó en algunos casos un elevado índice de polidispersión (NP-NOTA-HPMC y NP-NOTA-GPM₂) y en el caso de las NP-NOTA-GMN₂ se observó que había tres poblaciones de NPs distintas por lo que se desecharon.

En el caso de la proporción 100:3 se obtuvieron NPs con un tamaño que osciló entre 179 y 250 nanómetros (nm), siendo el potencial zeta negativo obtenido entre -13 mV y -25 mV.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
NP-NOTA-HPMC	278,8 ± 2,79	0,612 ± 0,08	-4,14 ± 1,16
NP-NOTA-GTM2	180,7 ± 0,16	0,322 ± 0,02	-12,16 ± 1,14
NP-NOTA-GMN2	139,1 ± 2,66	0,309 ± 0,038	-25,61 ± 1,44
NP-NOTA-GPM2	246,6 ± 14,55	0,819 ± 0,128	-17,32 ± 1,98

Tabla 12. Características físico-químicas de las NPs de albúmina modificada con NOTA en una proporción 100:2 albúmina:albúmina modificada

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
NP-NOTA-HPMC	217,8 ± 1,0	0,478 ± 0,01	-22,88 ± 1,59
NP-NOTA-GTM2	184,6 ± 5,6	0,253 ± 0,006	-14,22 ± 1,65
NP-NOTA-GMN2	212 ± 0,35	0,142 ± 0,0027	-12,21 ± 1,31
NP-NOTA-GPM2	243,6 ± 6,62	0,123 ± 0,086	-23,87 ± 1,66

Tabla 13. Características físico-químicas de las NPs de albúmina modificada con NOTA en una proporción 100:3 albúmina:albúmina modificada

2.2 Marcaje de las nanopartículas con galio-67

2.2.1 Conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67

Se desarrolló un método para automatizar el proceso de conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67, consiguiendo un buen rendimiento y minimizando la exposición a la radiación del operador. Para determinar la velocidad óptima de elución se ensayaron tres flujos distintos (0,5, 0,3 y 0,1 ml/min).

La actividad retenida en los cartuchos fue de $34,33 \pm 2,75$ %, $60,83 \pm 1,72$ % y $96,13 \pm 1,12$ %, para los flujos de 0,5 ml/min, 0,3 ml/min y 0,1 ml/min respectivamente. Por ello se fijó el flujo de 0,1 ml/min para llevar a cabo los ensayos posteriores.

Tras el lavado de los cartuchos con agua milliQ y su posterior purga con aire, la actividad presente en el cartucho fue de $94,51 \pm 0,75$ %.

Finalmente, los cartuchos fueron eluidos con HCl 0,1 M y se fraccionaron 10 alicuotas de 100 μ l cada una. La figura 38 muestra el perfil de elución del cloruro de galio-67.

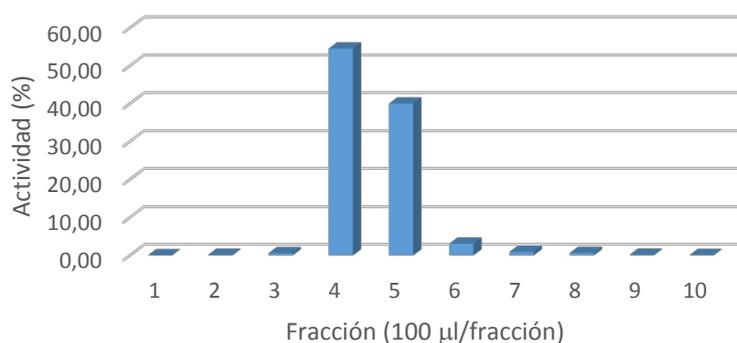


Figura 38. Actividad de las distintas fracciones obtenidas tras la extracción del cloruro de galio-67 con HCl 0,1 M.

El cloruro de galio-67 se concentró fundamentalmente en las fracciones cuatro, cinco y seis. En los 8 ensayos realizados la actividad de cloruro de galio-67 recuperada fue del $95,51 \pm 0,75$ % ($524,53 \pm 4,16$ MBq), donde las fracciones cuatro, cinco y seis representaron el $54,52 \pm 3,7$ %, $39,99 \pm 4,6$ % y $3,07 \pm 1,2$ % respectivamente.

La duración aproximada del proceso de purificación del galio-67 fue de 38 a 57 minutos, dependiendo del volumen inicial del citrato de galio-67, siendo un tiempo aceptable teniendo en cuenta el periodo de semidesintegración del galio-67 ($T_{1/2} = 3,26$ días) y que se obtiene una recuperación del cloruro de galio-67 superior al 95 %.

2.2.2 Marcaje con galio-67 y purificación de las nanopartículas

Se optimizaron los parámetros de tiempo y temperatura de marcaje. La cantidad de NPs utilizada para los ensayos fue de $2 \pm 0,1$ mg en todos los casos y la purificación se llevo a cabo mediante centrifugación a 2500 g.

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de reacción empleadas.

FORMULACIÓN	10', TA	30', TA	30', 30°C	30', 60°C
⁶⁷ Ga -NOTA-HPMC	$35,2 \pm 6,1$	$62,5 \pm 2,9$	$65,5 \pm 4,3$	$55,9 \pm 3,4$
⁶⁷ Ga -NOTA-GTM2	$38,1 \pm 2,2$	$68,2 \pm 1,9$	$71,6 \pm 1,2$	$67,3 \pm 2,8$
⁶⁷ Ga -NOTA-GMN2	$40,3 \pm 3,1$	$71,3 \pm 1,4$	$72,9 \pm 2,1$	$66,6 \pm 1,6$
⁶⁷ Ga -NOTA-GPM2	$46,4 \pm 1,2$	$60,4 \pm 3,3$	$69,2 \pm 2,68$	$63,6 \pm 2,7$

Tabla 14. Rendimientos de marcaje de las NPs con galio-67 en diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Los resultados se expresan como la media \pm DS ($n=3$).

Los mayores rendimientos de marcaje se obtuvieron cuando las NPs se incubaban durante 30 minutos a una temperatura de 30 °C, observándose que al incrementar la temperatura de marcaje se producía una disminución del rendimiento.

En cuanto al tiempo de incubación se observó que 10 minutos no eran suficientes para conseguir un buen marcaje, produciéndose un incremento significativo cuando se aumentó el tiempo a los 30 minutos.

La pureza radioquímica tras la purificación fue superior al 98,5 % en todos los casos ($99,2 \pm 0,2$ %, $99,5 \pm 0,8$ %, $99,1 \pm 0,3$ % y $98,5 \pm 0,4$ % para las NPs $^{67}\text{Ga-NOTA-GTM}_2$, $^{67}\text{Ga-NOTA-GMP}_2$, $^{67}\text{Ga-NOTA-GMN}_2$ y $^{67}\text{Ga-NOTA-HPMC}$ respectivamente.

La tabla 15 muestra el tamaño de partícula y el potencial Z de las NPs tras su marcaje con galio-67.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
$^{67}\text{Ga-NOTA-HPMC}$	$224 \pm 0,7$	$0,375 \pm 0,06$	$-21,16 \pm 1,21$
$^{67}\text{Ga-NOTA-GTM}_2$	$189 \pm 3,2$	$0,217 \pm 0,01$	$-13,20 \pm 1,01$
$^{67}\text{Ga-NOTA-GMN}_2$	$220 \pm 0,45$	$0,151 \pm 0,02$	$-11,70 \pm 1,45$
$^{67}\text{Ga-NOTA-GPM}_2$	$251 \pm 2,25$	$0,138 \pm 0,006$	$-22,75 \pm 0,87$

Tabla 15. Características físico-químicas de las NPs tras el marcaje con galio-67

Tras el marcaje con galio-67 se observó un pequeño incremento en el tamaño de las NPs que fue de 6, 4, 8 y 7 nm en las NPs ^{67}Ga -NOTA-HMPC, ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GMN2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2 respectivamente.

El potencial Z se mantuvo estable observándose un ligero aumento del mismo en todas las formulaciones (1,72; 1,02; 0,51 y 1,12 mV en las NPs ^{67}Ga -NOTA-HMPC, ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GMN2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2 respectivamente).

2.3 Estudios de estabilidad *in vitro*

Los resultados obtenidos durante los ensayos de estabilidad en suero fisiológico y plasma sanguíneo a 37 °C realizados durante 48 horas se expresan como la media \pm DS en las tablas 16 y 17 del porcentaje de NPs marcadas cuantificadas tras las purificación con filtros Amicon.

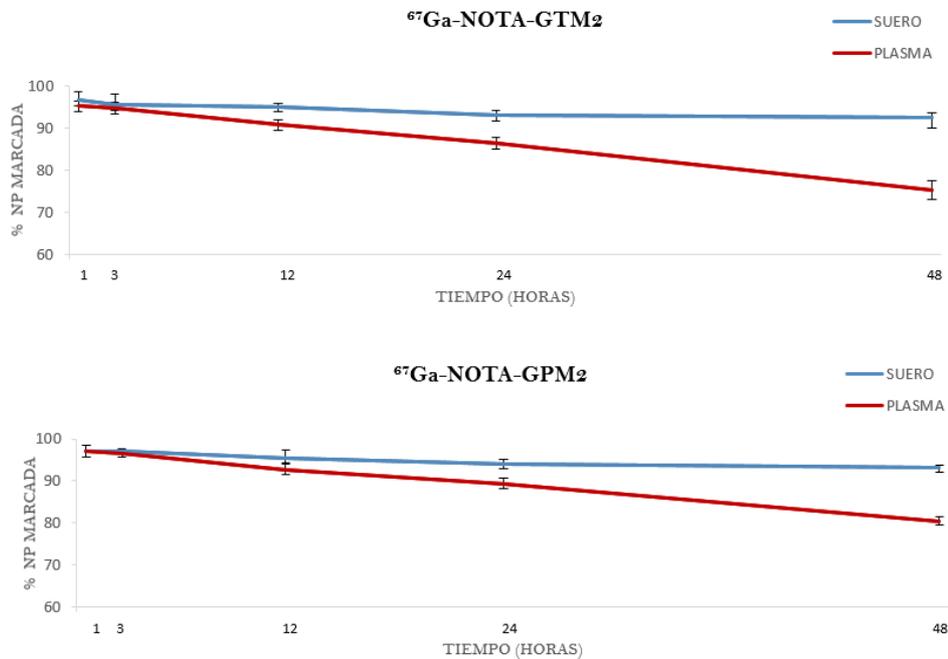
NP	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
^{67}Ga -NOTA-GTM2	96,7 \pm 1,9	95,7 \pm 2,3	95,1 \pm 0,8	93,1 \pm 1,0	92,4 \pm 1,1
^{67}Ga -NOTA-GPM2	97,8 \pm 1,5	97,2 \pm 0,5	95,5 \pm 2,0	94,1 \pm 1,0	93,1 \pm 0,7
^{67}Ga -NOTA-GMN2	97,9 \pm 0,9	97,1 \pm 1,2	96,2 \pm 0,7	94,8 \pm 1,7	94,1 \pm 0,7
^{67}Ga -NOTA-HPMC	97,1 \pm 1,6	96,2 \pm 2,9	96,1 \pm 1,2	93,3 \pm 0,7	91,3 \pm 0,8

Tabla 16. Estabilidad de las NPs marcadas con galio-67 en suero fisiológico. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

NP	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
^{67}Ga -NOTA-GTM2	95,2 ± 1,3	94,8 ± 1,4	90,8 ± 1,2	86,5 ± 1,4	75,2 ± 2,3
^{67}Ga -NOTA-GPM2	97,1 ± 1,4	96,4 ± 0,8	92,7 ± 1,3	89,4 ± 1,2	80,4 ± 1,0
^{67}Ga -NOTA-GMN2	96,3 ± 0,9	95,2 ± 1,1	91,0 ± 1,6	87,1 ± 0,9	79,4 ± 1,2
^{67}Ga -NOTA-HPMC	96,4 ± 1,5	90,6 ± 1,8	87,1 ± 0,8	84,7 ± 1,1	70,1 ± 0,7

Tabla 17. Estabilidad de las NPs marcadas con galio-67 en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media ± DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

La figura 39 muestra de forma gráfica la evolución de la estabilidad de las NPs en función del tiempo en suero fisiológico 0,9% y plasma sanguíneo respectivamente.



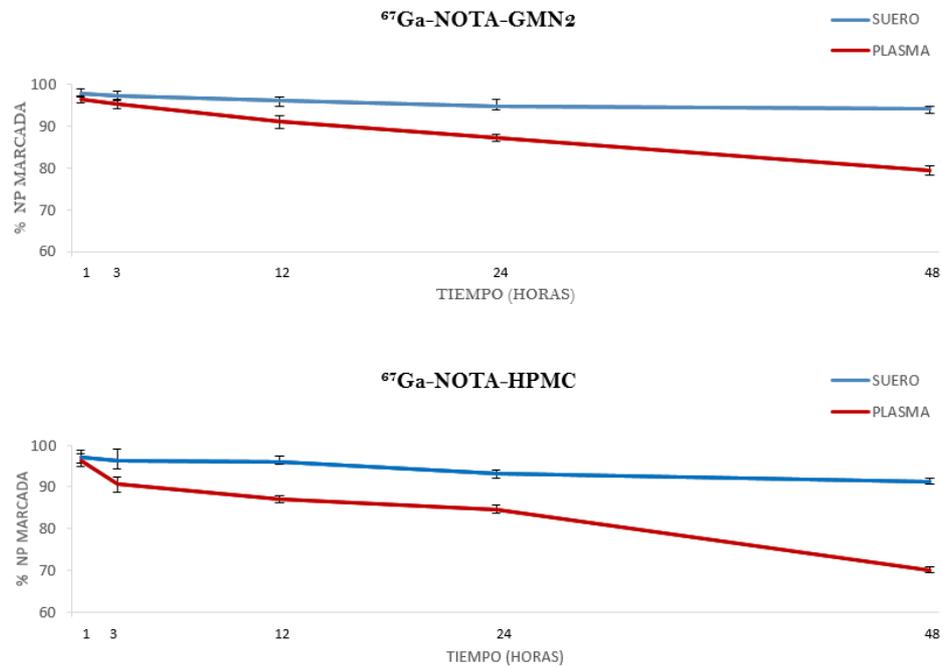


Figura 39. Estabilidad de las NPs modificadas con *NOTA* y marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9% y en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

Los estudios de estabilidad mostraron que 48 horas tras el marcaje, el porcentaje de NPs marcadas fue superior al 90% en suero fisiológico y al 70-80% en plasma sanguíneo, en todas las formulaciones de NPs, presentando mejores resultados las NPs $^{67}\text{Ga-NOTA-GPM}_2$.

La tabla 18 muestra el tamaño de partícula y el potencial Z de las NPs pasadas 48 horas de su marcaje con galio-67.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIALZ (mV)
^{67}Ga -NOTA-HPMC	$231 \pm 1,21$	$0,361 \pm 0,07$	$-17,41 \pm 1,43$
^{67}Ga -NOTA-GTM2	$197 \pm 1,75$	$0,251 \pm 0,06$	$-10,10 \pm 0,75$
^{67}Ga -NOTA-GMN2	$228 \pm 0,79$	$0,142 \pm 0,002$	$-9,50 \pm 1,06$
^{67}Ga -NOTA-GPM2	$256 \pm 1,37$	$0,153 \pm 0,007$	$-18,40 \pm 1,25$

Tabla 18. Características físico-químicas de las NPs pasadas 48 horas del marcaje con galio-67

Pasadas las 48 horas del marcaje las NPs incrementaron su tamaño en 14, 13, 16 y 13 nm en las NPs ^{67}Ga -NOTA-HMPC, ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GMN2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2, respectivamente.

En el caso del potencial Z se observó un pequeño aumento en todas las formulaciones (5,46; 4,12; 2,71; 5,47 mV para las NPs ^{67}Ga -NOTA-HMPC, ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GMN2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2 respectivamente).

2.4 Estudios de biodistribución *in vivo*

La figura 40 muestra las imágenes de SPECT/CT de la distribución de las NPs ^{67}Ga -NOTA-GPM2 tras su administración intravenosa frente a las imágenes obtenidas tras la administración de $[^{67}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$, que se utiliza como control.

Las imágenes son cortes longitudinales del mismo animal a lo largo del tiempo. En la gráfica de barras apiladas, la altura de la barra indica el promedio de los datos del porcentaje de dosis inyectada en ese órgano para ese punto temporal, que al igual que

en el caso del tecnecio-99m se ha cuantificado tomando como total de dosis administrada la actividad medida en el VOI cuerpo total en la imagen a 2 horas.

Tras su administración, las NPs se acumulan fundamentalmente en el hígado ($66 \pm 5,65$ % a las 2 horas) permaneciendo en dicha localización pasadas las 48 horas ($20,66 \pm 1,52$ %). En el resto de los órganos la actividad es despreciable.

En los controles con $[^{67}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$, la actividad se localiza fundamentalmente en nasofaringe (10 % a la hora, $3,33 \pm 0,57$ % a las 48 horas), vejiga ($8,5 \pm 4,94$ %), hígado ($6,5 \pm 0,7$ % a las 2 horas, $1,0 \pm 1$ % a las 48 horas) y médula ósea ($3,5 \pm 0,7$ % a las 2 horas, 1 % a las 48 horas).

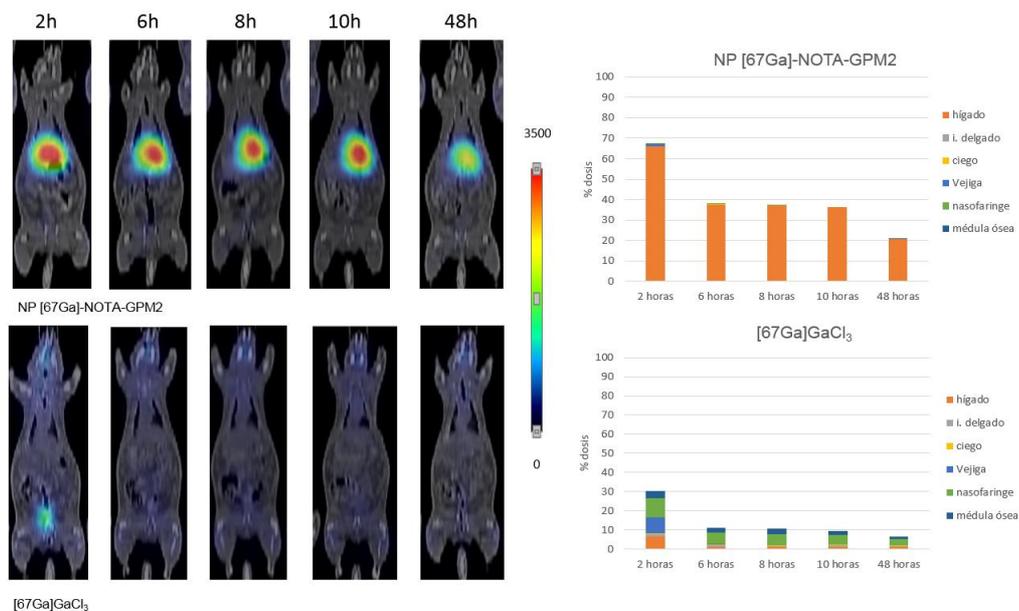


Figura 40. Imágenes SPECT/CT tras la administración intravenosa de NPs ^{67}Ga -NOTA-GPM2 vs $[^{67}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ en un mismo animal a lo largo del tiempo y cuantificación del porcentaje de dosis por órgano ($n = 3$).

2.5 Estudios de biodistribución *ex vivo*

La figura 41 representa el porcentaje de la dosis inyectada por órgano tras el sacrificio de los animales y conteo de los órganos en contador de pozo pasadas 48 horas de la inyección de las ^{67}Ga -NOTA-GPM2 y del $[^{67}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$.

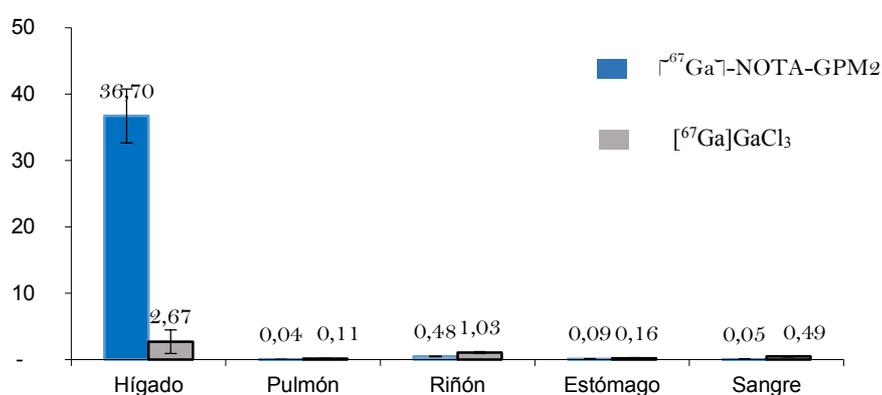


Figura 41. Porcentaje de dosis inyectada por órgano medida en contador de pozo tras el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como media \pm DS ($n=3$).

Se observó que la dosis se concentraba fundamentalmente en el hígado ($36,70 \pm 4,05$ %), con una muy ligera acumulación en riñones ($0,48 \pm 0,03$ %).

En el caso de los animales control una pequeña fracción de la dosis administrada se localizó en hígado ($2,67 \pm 1,78$ %), seguido de los riñones ($1,03 \pm 0,05$ %).

2.6 Marcaje con galio-67 de las nanopartículas de albúmina no modificadas con NOTA

Los marcajes se llevaron a cabo en las condiciones de tiempo y temperatura optimizadas en pruebas anteriores (30 minutos de incubación a 30°C de temperatura).

Los resultados obtenidos en los ensayos por triplicado se muestran en la tabla 19 como la media \pm desviación estándar de los rendimientos de marcaje obtenidos tras la purificación de las NPs marcadas con filtros Amicon.

FORMULACIÓN	30 minutos 30°C
NP-GTM ₂	5,9 \pm 0,9
NP-GPM ₂	5,3 \pm 1,6
NP-GMN ₂	6,1 \pm 0,3
NP-HPMC	6,4 \pm 0,7

Tabla 19. Rendimiento de marcaje con galio-67 de las NPs no modificadas con NOTA. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

El marcaje de las NPs fue inferior al 7% en todos los casos por lo que se comprobó la práctica ausencia de radiomarcaje de las NPs en ausencia del quelante NOTA.

3 MARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS CON ZIRCONIO-89

3.1 Obtención de las nanopartículas modificadas con DFO

La tabla 20 muestra los resultados obtenidos en la preparación de las NPs empleando una proporción 100:3 de albúmina:albúmina modificada con DFO respectivamente.

Las NPs presentaron un tamaño que osciló entre 142 y 162 nanómetros (nm), siendo el potencial zeta negativo obtenido entre -13 y -24 mV.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN	POTENCIAL Z (mV)
NP-DFO-HPMC	149,2 ± 1,32	0,458 ± 0,021	-15,20 ± 1,24
NP-DFO-GTM2	144,3 ± 1,51	0,295 ± 0,005	-21,15 ± 1,01

NP-DFO-GMN2	157,1 ± 4,44	0,548 ± 0,021	-22,41 ± 1,12
NP-DFO-GPM2	147,7 ± 1,30	0,478 ± 0,011	-18,15 ± 1,71

Tabla 20. Características físico-químicas de las NPs de albúmina modificada con DFO en una proporción 100:3 albúmina:albúmina modificada

3.2 Marcaje con galio-67 de las nanopartículas modificadas con DFO

El marcaje se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.2. Marcaje con galio-67 y purificación de las nanopartículas. Las reacciones se llevaron a cabo con un tiempo fijo de 30 minutos a distintas temperaturas (T^a ambiente, 30 °C y 60 °C)

La tabla 21 muestra las condiciones de reacción y los rendimientos obtenidos en el marcaje de cada una de las formulaciones.

FORMULACIÓN	30 minutos	30 minutos	30 minutos
	T^a ambiente	30°C	60°C
NP-DFO-HPMC	36,6 ± 1,2	54,2 ± 1,9	41,3 ± 2,7
NP-DFO-GTM2	51,4 ± 2,7	62,1 ± 1,8	51,4 ± 1,9
NP-DFO-GMN2	56,4 ± 1,1	61,5 ± 1,9	50,4 ± 0,7
NP-DFO-GPM2	59,5 ± 2,9	63,9 ± 2,4	52,8 ± 0,9

Tabla 21. Rendimientos de marcaje con galio-67 de las NPs de albúmina modificada con DFO a distintas temperaturas de incubación. Los datos se expresan como la media ± DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

Se obtuvieron rendimientos superiores al 60 % en las NPs recubiertas con los polímeros GTM2, GMN2 y GMP2 a temperaturas de incubación de 30 °C, observándose una disminución de los mismos cuando se incrementaba la temperatura a 60°C.

Estos datos confirman la adecuada unión del quelante DFO a las NPs, lo que nos hace pensar que también podrían marcarse con zirconio-89.

3.2.1 Estudios de estabilidad de las nanopartículas modificadas con DFO marcadas con galio-67

La estabilidad del marcaje de las NPs se ensayó en suero fisiológico y plasma sanguíneo a 37°C durante 48 horas, determinándose el porcentaje de NPs marcadas a distintos tiempos tras la purificación con filtros Amicon. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las formulaciones de NPs y los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm DS (tablas 22 y 23).

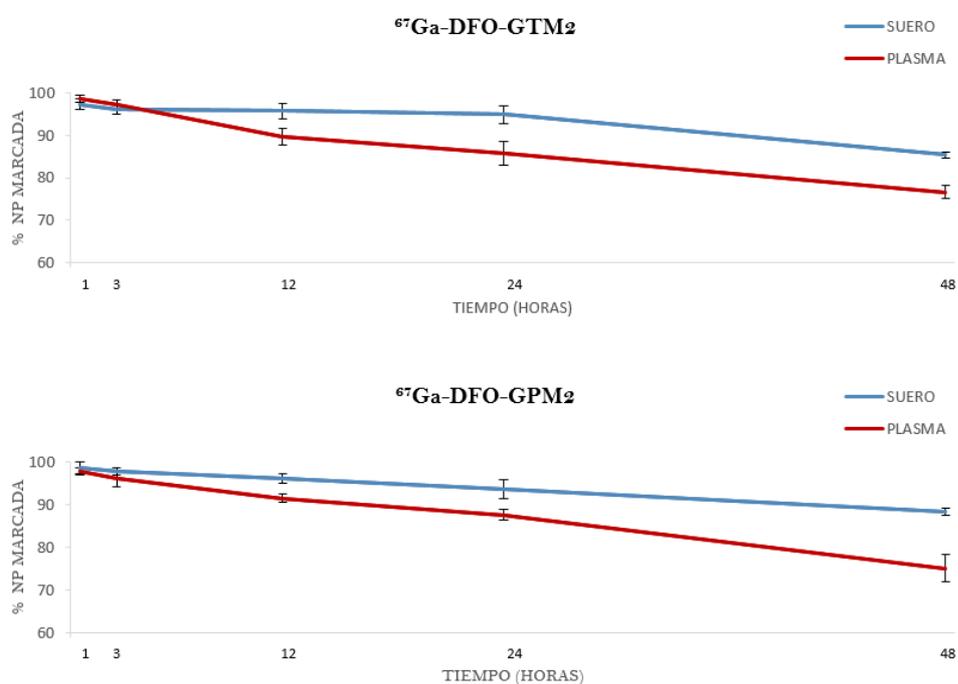
NANO	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
⁶⁷ Ga-DFO-GTM2	97,2 \pm 1,3	96,1 \pm 1,1	95,7 \pm 1,8	94,8 \pm 2,0	85,4 \pm 0,7
⁶⁷ Ga -DFO-GPM2	98,7 \pm 1,4	97,9 \pm 0,8	96,1 \pm 1,1	93,7 \pm 2,2	88,4 \pm 0,9
⁶⁷ Ga -DFO-GMN2	97,8 \pm 1,4	97,1 \pm 0,9	95,4 \pm 1,4	94,1 \pm 1,9	83,5 \pm 1,9
⁶⁷ Ga -DFO-HPMC	96,1 \pm 0,9	92,1 \pm 2,7	89,4 \pm 1,6	86,4 \pm 1,1	65,6 \pm 0,8

Tabla 22. Estabilidad de las NPs modificadas con DFO y marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9%. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

NANO	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
$^{67}\text{Ga-DFO-GTM2}$	$98,5 \pm 0,8$	$97,2 \pm 1,0$	$89,6 \pm 1,9$	$85,8 \pm 2,8$	$76,6 \pm 1,5$
$^{67}\text{Ga-DFO-GPM2}$	$97,9 \pm 0,9$	$96,1 \pm 1,9$	$91,5 \pm 1,0$	$87,6 \pm 1,3$	$75,1 \pm 3,1$
$^{67}\text{Ga-DFO-GMN2}$	$97,0 \pm 1,6$	$96,8 \pm 1,9$	$90,9 \pm 2,6$	$82,1 \pm 2,1$	$74,6 \pm 2,7$
$^{67}\text{Ga-DFO-HPMC}$	$95,8 \pm 0,8$	$88,9 \pm 1,3$	$76,7 \pm 3,5$	$68,1 \pm 1,9$	$60,4 \pm 1,8$

Tabla 23. Estabilidad de las NPs modificadas con DFO marcadas con galio-67 en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

La figura 42 muestra de forma gráfica la evolución de la estabilidad de las NPs en función del tiempo en suero fisiológico 0,9% y plasma sanguíneo respectivamente.



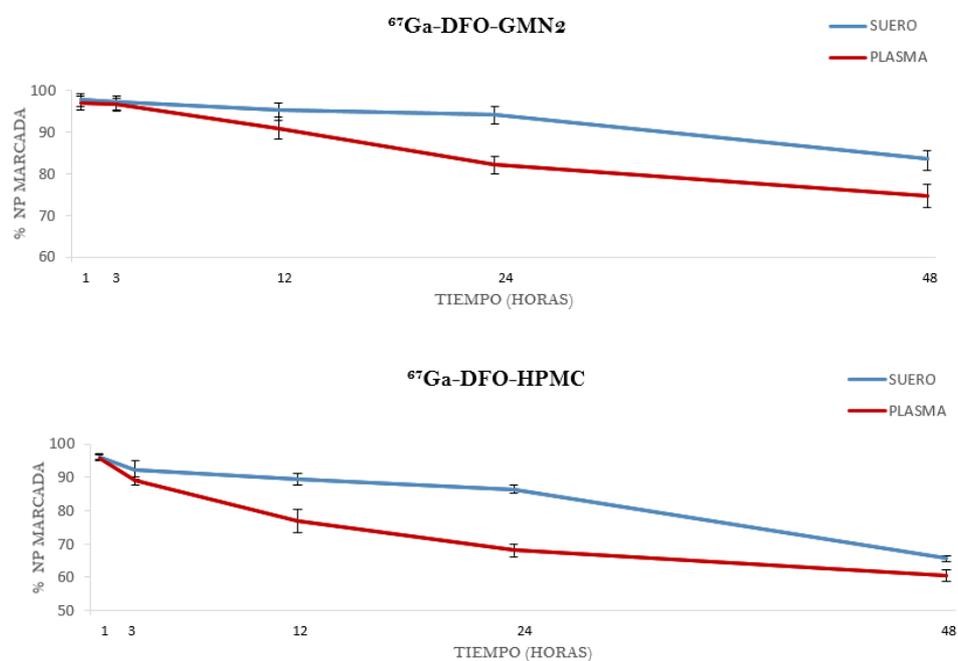


Figura 42. Estabilidad de las NPs modificadas con DFO y marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9% y en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon ($n = 3$).

Las NPs recubiertas con los polímeros GTM2, GPM2 y GMN2 mostraron una elevada estabilidad durante las primeras 48 horas, con un porcentaje de NPs marcadas superior al 80 % en suero fisiológico y al 70 % en plasma sanguíneo.

Las NPs recubiertas con el polímero HPMC mostraron una estabilidad menor que las anteriores, obteniéndose un porcentaje de NPs marcadas superior al 65 % en suero fisiológico y al 60% en plasma sanguíneo.

3.3 Marcaje con zirconio-89 de las nanopartículas modificadas con DFO

Tras la incubación de las NPs con el zirconio-89 se observó que las NPs precipitaban en el fondo del vial de reacción y no se marcaban con el radiometal.

Por ello se midió el tamaño de las NPs antes y después de la adición del ácido oxálico, observándose una gran disminución en el tamaño de partícula y una elevación del índice de polidispersión (tablas 24 y 25).

Previamente, se observó un fenómeno similar en la preparación de las NPs, ya que cuando se realizó la conjugación de la albúmina con el NOTA en medio ácido (ácido gentsico), al añadir el polímero se producía una precipitación de las mismas.

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	TAMAÑO INICIAL (nm)	TAMAÑO FINAL (nm)
NP-DFO-HPMC	151,3 ± 2,25	74,1 ± 10,26
NP-DFO-GTM2	140,1 ± 2,21	89,2 ± 5,95
NP-DFO-GMN2	160,2 ± 2,29	54,20 ± 8,12
NP-DFO-GPM2	141,4 ± 1,45	66,5 ± 11,23

Tabla 24. Tamaño de las NPs modificadas con DFO antes y después de la adición de ácido oxálico

FORMULACIÓN NANOPARTÍCULA	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN INICIAL	ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN TRAS OXÁLICO
NP-DFO-HPMC	0,321 ± 0,020	0,818 ± 0,011
NP-DFO-GTM2	0,341 ± 0,064	0,596 ± 0,017
NP-DFO-GMN2	0,289 ± 0,015	0,625 ± 0,024
NP-DFO-GPM2	0,412 ± 0,019	0,795 ± 0,021

Tabla 25. Índice de polidispersión de las NPs modificadas con DFO antes y después de la adición de ácido oxálico

VI. DISCUSIÓN

En este apartado analizan y discuten los resultados obtenidos en el trabajo de investigación, detallando las aportaciones y limitaciones del mismo

La irrupción de la nanotecnología en la medicina ha permitido el desarrollo de numerosas nanomedicinas cuyo principal objetivo es incrementar la eficacia terapéutica de las mismas, minimizando su toxicidad y la posible aparición de efectos secundarios.

En los últimos años, las NPs han atraído un enorme interés por su posible aplicación en el transporte y administración de fármacos.

Una de sus principales ventajas es, que debido a su reducido tamaño, las NPs presentan una relación superficie/volumen extremadamente alta, lo que se traduce en la posibilidad de incluir una gran cantidad de fármaco o molécula por NP. Además, la posibilidad de modificar de forma sencilla su tamaño y superficie permite modular la farmacocinética de las mismas, permitiendo incrementar o reducir el tiempo de permanencia en el organismo o modificar sus parámetros de eliminación.

Las NPs de naturaleza proteica han mostrado una gran utilidad como vehículo para la administración de fármacos debido a su elevada biocompatibilidad y ausencia de toxicidad (177, 178).

Para la preparación de nuestras NPs hemos utilizado la albúmina sérica humana, ya que tiene una estructura química que permite interactuar con una gran variedad de moléculas y además los grupos funcionales que presentan en su superficie (carboxílicos, aminos etc..) proporcionan una buena base para la realización de una gran cantidad de modificaciones, ampliando de esta manera sus posibles aplicaciones (179).

Una de las modificaciones que se puede realizar en la superficie de las NPs de albúmina es el recubrimiento con polímeros, cuya finalidad es mejorar las propiedades farmacocinéticas de las mismas, incrementando su estabilidad y consiguiendo como resultado una mayor permanencia en el lugar de interés (180). Asimismo este recubrimiento puede servir para transportar fármacos con una baja solubilidad en agua o que puedan ser fácilmente degradados si no son encapsulados (181).

Existen numerosas publicaciones sobre las propiedades de las NPs de albúmina como vehículo para la administración de fármacos, empleando en ocasiones técnicas de

imagen molecular para visualizar su biodistribución. Se han utilizado para la administración de fármacos quimioterápicos como el paclitaxel o el docetaxel en tumores como el de mama y pulmón, mejorando su eficacia debido a un incremento en el tiempo de residencia en el organismo, observándose además una menor tasa de efectos secundarios debido a la elevada especificidad de las NPs por el órgano diana, reduciendo de este modo la acumulación del órgano en otras localizaciones (182, 183, 184, 185). También se han empleado para la administración de anticuerpos monoclonales como el bevacizumab (186).

Sin embargo, existen pocos estudios sobre el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de las NPs de albúmina tras su recubrimiento con polímeros.

El recubrimiento con polímeros obtenidos mediante la conjugación del Gantrez® AN con moléculas como la tiamina o la manosamina ha mostrado utilidad en la administración de vacunas y proteínas por vía oral, evidenciando un incremento de la permanencia de las NPs en la mucosa intestinal (156, 158, 187, 188). Por su parte, el polietilenglicol ha sido ampliamente utilizado en nanomedicina para la modificación de las NPs con el objetivo de incrementar su tiempo de permanencia en el organismo (189).

En nuestro trabajo hemos utilizado la hidroxipropilmetilcelulosa y los polímeros de Gantrez AN conjugado con tiamina, manosamina y polietilenglicol 2000 para recubrir las NPs de albúmina y hemos llevado a cabo su radiomarcaje, para tras su administración intravenosa observar su comportamiento en esta vía de administración.

Se eligió la administración intravenosa porque es la mejor vía para que un fármaco ejerza su acción sistémica ya que no depende de proceso de absorción, permitiendo el acceso inmediato al torrente sanguíneo. Las NPs empleadas en este trabajo presentan la ventaja de poder administrarse por esta vía ya que contienen albúmina, que es una proteína presente en la sangre en concentraciones elevadas (3,4-5,4 g/dL), no es tóxica y es biocompatible.

Los métodos empleados para la preparación de las NPs pueden ser físicos (gelación térmica, nanosecado por aspersion, técnica NAB (NP unida a la albúmina)) o químicos (desolvatación, emulsificación, autoensamblaje) (190). En el presente trabajo se ha utilizado el método de desolvatación ya que es un proceso rápido, fácil y que permite la posterior liofilización de las NPs con el fin de incrementar su estabilidad, pudiendo utilizarse durante periodos de tiempo prolongados. Además permite controlar fácilmente el tamaño de la NP y el índice de polidispersión manteniendo constantes valores como el pH o la cantidad de albúmina y disolvente utilizada (191). El tamaño de las NPs se vio incrementado al incorporar el polímero en todas las formulaciones de NPs.

Uno de los inconvenientes del uso de NPs es, que una vez administradas en el organismo es difícil estudiar su comportamiento farmacocinético, su efecto terapéutico, su toxicidad y sus posibles efectos secundarios. En este ámbito cobran especial relevancia las técnicas de imagen molecular, que permiten el seguimiento de las NPs, evaluando su biodistribución y farmacocinética de manera no invasiva, así como predecir su eficacia terapéutica y posibles efectos secundarios, por lo que son de gran utilidad a la hora de evaluar la aplicabilidad de las NPs.

En el presente trabajo se ha planteado la utilización de las técnicas de imagen molecular SPECT/CT y PET/CT, que emplean isótopos radiactivos, para la visualización de la biodistribución de las NPs previamente marcadas radiactivamente.

A la hora de elegir el radioisótopo ideal para el marcaje hay que tener en cuenta la elevada vida media biológica que presentan las NPs en el organismo (192, 193), por lo que se requiere la utilización de isótopos de vida media relativamente larga para poder realizar estudios prolongados en el tiempo.

En nuestro trabajo hemos empleado para el marcaje de las NPs un radioisótopo gamma con un periodo de semidesintegración medio y gran disponibilidad como el tecnecio-99m ($T_{1/2} = 6$ horas). Además, para poder realizar estudios de biodistribución

a diferentes tiempos, se han utilizado un radioisótopo SPECT y uno PET de vida media larga como el galio-67 ($T_{1/2} = 76,8$ horas) y el zirconio-89 ($T_{1/2} = 78,4$ horas). Todos estos radioisótopos presentan una energía de emisión adecuada para su utilización en los equipos de adquisición de imágenes disponibles en el mercado.

El tecnecio-99m fue obtenido mediante un generador de molibdeno-99/tecnecio-99m y el zirconio-89 fue suministrado por un laboratorio farmacéutico en forma de oxalato de zirconio-89.

El galio-67 se obtuvo comercialmente en forma de citrato de galio-67, que presenta problemas técnicos en el radiomarcaje debido a la fuerte unión existente entre el ion galio y el citrato (28). En el marcaje con galio-67 mediante el empleo de BFCAs es preferible utilizar el cloruro de galio-67 (194), por lo que es necesaria la conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67.

Para llevar a cabo esta conversión se empleó el método desarrollado por Scasnar y col (172), basado en la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida. En nuestro trabajo se optimizó este procedimiento empleando una bomba de infusión de uso hospitalario para controlar el flujo del citrato de galio-67 a través de las columnas, con el fin de reducir la exposición a la radiación del operador y obtener el cloruro de galio-67 de una forma rápida y reproducible, evitando de esta manera las posibles variaciones debidas a la operación manual.

Asimismo, llevamos a cabo una elución fraccionada de las columnas con el fin de utilizar para el posterior marcaje la fracción con una mayor concentración de cloruro de galio-67 y una menor cantidad de impurezas.

Se obtuvo una recuperación final del cloruro de galio del 95,51 %, valor superior a lo reportado en la literatura [80 % Chan y col (173), 90 % Scasnar y col (172)]. Estos valores tan elevados de recuperación se deben a la automatización del procedimiento, ya que de esta forma se controla de forma muy precisa el flujo de elución haciendo que este sea constante durante todo el proceso. Asimismo se utilizó un flujo más lento de

elución que el reportado por la literatura (1 ml/min) consiguiendo una mayor recuperación con un flujo de elución de 0,1 ml/min.

El procedimiento tuvo una duración media de 47 minutos, que es un tiempo aceptable teniendo en cuenta el periodo de semidesintegración del galio-67 y el elevado porcentaje de recuperación obtenido.

Para llevar a cabo el marcaje de las NPs con galio-67 y zirconio-89 se requiere la presencia de un BFCA que actúe de nexo de unión entre la NP y el radiometal, por lo que se prepararon NPs de albúmina modificadas con NOTA y DFO para el marcaje con galio-67 y zirconio-89 respectivamente.

En el caso del galio-67 se eligió el NOTA como BFCA por ser como se ha explicado anteriormente el que presenta una mayor estabilidad en la formación de complejos y es el de elección en el caso de moléculas sensibles a la temperatura como es el caso de las proteínas (96). La DFO se eligió por ser el quelante más ampliamente utilizado en el marcaje de moléculas con zirconio-89.

La albúmina modificada se obtuvo mediante conjugación de la misma con el quelante y posterior purificación del conjugado. El proceso de purificación de los conjugados albúmina-NOTA y albúmina-DFO se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas PD10, que sirven para la desalinización e intercambio de buffer, así como para la eliminación de compuestos de bajo peso molecular. Este procedimiento presenta ciertas ventajas frente a otros empleados por otros autores como la purificación mediante procesos de diálisis de proteínas (195) o la ultracentrifugación (196) ya que la duración del proceso es menor (10 minutos frente a las 24 horas de la diálisis), no se requiere un equipamiento sofisticado y permiten obtener el conjugado en el buffer adecuado de forma directa.

En la conjugación de la albúmina con la DFO, autores como Vosjan y cols (174) y Morcillo y cols (197) recomiendan llevar a cabo la purificación del conjugado con una solución de ácido genticónico 5 mg/ml en acetato de sodio 0,25 M (pH 5,4-5,6) como

radioprotector para prevenir la radiólisis en el posterior marcaje con zirconio-89. En nuestro trabajo llevamos a cabo la conjugación siguiendo este procedimiento pero durante la posterior formación de las NPs, al adicionar el polímero de recubrimiento se producía la aglutinación y precipitación de las mismas. Por este motivo se decidió llevar a cabo la purificación del conjugado en medio básico (al igual que la conjugación albúmina-NOTA), empleando una solución de carbonato sódico 0,1 M (pH a 8,9-9,1). Al cambiar el buffer del conjugado las NPs se formaron y se recubrieron sin problemas.

Una vez preparadas las NPs sin quelante y con los quelantes NOTA y DFO se caracterizaron midiendo su tamaño de partícula y su potencial Z empleando la espectroscopía de correlación fotónica y la anemometría de láser Doppler.

Se observó una ligera disminución del tamaño de las NPs modificadas con el NOTA y la DFO frente a las no modificadas, debido posiblemente al entrecruzamiento entre los quelantes y la albúmina sérica humana, produciéndose una compactación de la estructura de la NP. No se observó una modificación elevada de la carga superficial de las NPs modificadas.

En el marcaje de las NPs con tecnecio-99m se emplea como agente reductor el SnCl_2 , que a diferencia de otros agentes reductores como el borohidruro de sodio o el ditionito de sodio, confiere a las NPs una mayor estabilidad tras su marcaje (163, 198). El principal inconveniente del uso del SnCl_2 es la posible aparición de coloides de tecnecio-99m por la presencia de un exceso del reductor. Se han desarrollado distintos métodos para la separación de los coloides mediante cromatografía en capa fina y ultracentrifugación (198, 199) pero hasta el momento ninguno ha dado resultados satisfactorios ya que no se consigue una total separación de los coloides. Por ello, en el presente estudio se ha realizado el marcaje con tecnecio-99m ensayando seis concentraciones distintas de SnCl_2 para determinar la concentración óptima de estaño, que en nuestro caso se determinó que es la concentración en la que se obtiene un elevado rendimiento de marcaje con una mínima proporción de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$,

asegurándonos de esta forma la ausencia de coloides en la muestra y un elevado porcentaje de NPs marcadas.

Para el procedimiento de marcaje con tecnecio-99m se desarrolló un método tipo “kit” similar al empleado en el marcaje de los radiofármacos tecneciados, para lo cual se prepararon viales con la cantidad adecuada de NPs y SnCl_2 en una atmósfera inerte obtenida mediante el purgado de los viales con helio hasta la completa evaporación de los solventes. La preparación de estos kits nos permite llevar a cabo el radiomarcaje de forma sencilla, rápida y reproducible.

Para optimizar las condiciones de marcaje se modificaron parámetros como el tiempo de incubación o la temperatura de marcaje hasta que se obtuvieron los mejores rendimientos. En el caso del marcaje con tecnecio-99m no fue necesaria la purificación de las NPs pero en el caso del galio-67 fue necesaria dicha purificación para la eliminación del galio-67 libre, empleándose para ello la filtración por centrifugación con filtros Amicon® de 50Kd.

En el marcaje con tecnecio-99m no se observa una mejora de los rendimientos de marcaje con la aplicación de calor mientras que en el marcaje con galio-67 los rendimientos mejoran con un calentamiento ligero (30°C) produciéndose una disminución de los mismos cuando se aplican temperaturas más elevadas (60°C), debido al posible comienzo del proceso de desnaturalización de la albúmina.

Los rendimientos obtenidos en el marcaje con tecnecio-99m fueron muy elevados, siendo superiores al 97 % en todas las formulaciones de NPs. En el caso del galio-67 fueron inferiores, siendo mayor del 52 % en el caso de las NPs recubiertas con la HPMC y superiores al 60 % para el resto de formulaciones. El marcaje con tecnecio-99m se lleva a cabo de forma directa mientras que el galio-67 se une a la NP a través del quelante NOTA. Al no conocer de forma exacta la distribución del NOTA presente en las NPs es posible que no todo el galio-67 pueda reaccionar con el NOTA, quedando de esta manera parte del galio-67 libre.

Debido a la baja disponibilidad y elevado precio del zirconio-89, previamente a su utilización se llevó a cabo el marcaje con galio-67 de las NPs modificadas con DFO con el fin de verificar la correcta unión del quelante, observándose que las NPs se marcaban con buenos rendimientos y una estabilidad *in vitro* adecuada (superior al 80 % en suero fisiológico y al 70 % en plasma sanguíneo).

En el caso del zirconio-89, el marcaje de las NPs se llevó a cabo empleando zirconio-89 disuelto en ácido oxálico, siguiendo el protocolo previamente descrito (3.3. Marcaje con zirconio-89 de las NPs modificadas con DFO (174)), observándose que no se producía el marcaje ya que las NPs se aglutinaban y precipitaban en el fondo del vial de reacción.

Ante esta situación se decidió medir el tamaño de las NPs antes y después de la adición del ácido oxálico para determinar si el pH ácido afectaba a la estabilidad de las NPs observando una drástica disminución del tamaño de partícula y un incremento del índice de polidispersión. Consideramos que el medio ácido puede afectar a la estabilidad de las NPs ya que al tratarse de proteínas el pH es un factor condicionante en su formación y posterior estabilidad.

Previamente ya se había observado un fenómeno similar ya que durante la preparación de las NPs previa conjugación de la albúmina con el NOTA en medio ácido (ácido gentísico), al añadir el polímero se producía una precipitación de las mismas, por lo que parece que el medio ácido interacciona con algún componente de las NPs, posiblemente con los polímeros de recubrimiento, provocando una degradación de las mismas.

Una nueva estrategia de marcaje puede ser el marcaje con zirconio-89 del conjugado albúmina-DFO, seguido de la preparación de las NPs y posterior recubrimiento polimérico de las mismas, evitando de esta manera el contacto del ácido oxálico con los polímeros. En nuestro caso esta estrategia no pudo ser llevada a cabo al no disponer

del equipamiento necesario (ultracentrífuga, rotavapor) para la preparación de las NPs en la instalación radiactiva.

Tras el marcaje con los distintos isótopos se midió el tamaño y el potencial Z de las NPs marcadas inmediatamente después del marcaje y después de los ensayos de estabilidad para evaluar la posible influencia de la incorporación del isótopo en las NPs.

En ambos casos se observó un ligero incremento del tamaño de partícula tras la incorporación del isótopo siendo más pronunciado en el marcaje con tecnecio-99m (~ 11 nm vs 7 nm del galio-67). Asimismo el potencial Z sufrió un ligero incremento tras el marcaje con ambos radioisótopos, manteniéndose negativo en todos los casos.

Tras los ensayos de estabilidad del marcaje con tecnecio-99m (48 horas post-marcaje) se observó nuevamente un incremento en el tamaño de partícula (~ 18 nm) con un aumento del potencial Z, que en el caso de las NPs ^{99m}Tc -GTM2 fue elevado (~ 9 mV), aunque se mantuvo dentro de valores aceptables.

Pasadas las 48 horas del marcaje con galio-67 se observó un incremento en el tamaño de partícula, que fue más pronunciado en las ^{67}Ga -GMN2 (~ 16 nm) con un ligero aumento del potencial Z en todas las formulaciones (~ 4 mV).

Uno de los pasos previos a la realización de los estudios *in vivo* de las NPs marcadas es la realización de estudios de estabilidad *in vitro*, ya que si el marcaje no es estable se puede producir una liberación del radioisótopo que puede dar lugar a una interpretación errónea de las imágenes obtenidas en los equipos de imagen molecular.

Al no conseguir el marcaje de las NPs con zirconio-89, los ensayos de estabilidad *in vitro* y los estudios de biodistribución *in vivo* se llevaron a cabo sólo con las NPs marcadas con tecnecio-99m y galio-67.

Los estudios de estabilidad *in vitro* de las NPs marcadas con tecnecio-99m y galio-67 se llevaron a cabo mediante incubación de las mismas en suero fisiológico 0,9 % y plasma sanguíneo.

Las NPs permanecieron estables durante las primeras 24 horas tras el radiomarcaje con ambos isótopos, mostrando una mayor estabilidad las NPs GPM2.

Las NPs GPM2 marcadas con galio-67 se mostraron estables hasta 48 horas en suero salino (PRQ $93,1 \pm 0,7$ %) mientras que en plasma se produjo una disminución de la estabilidad (PRQ $80,4 \pm 1,0$ %). Las NPs GPM2 marcadas con tecnecio-99m, mostraron valores inferiores en ambos casos (PRQ $76,61 \pm 0,7$ % y $73,69 \pm 1,44$ %, respectivamente). Con los datos disponibles no es posible saber el motivo de estas diferencias, si bien el empleo del quelante bifuncional NOTA pudiera conferir mayor estabilidad al complejo marcado.

En ambos casos, como era esperable la estabilidad en plasma fue más baja que en suero fisiológico debido a la presencia de proteínas competidoras que pueden actuar secuestrando al radioisótopo.

Los resultados de estabilidad *in vitro* no pueden ser extrapolados de forma directa a las condiciones *in vivo* ya que existen múltiples factores que pueden afectar a su estabilidad por lo que se requiere su administración en animales para observar su comportamiento *in vivo* y valorar su posible utilización en la clínica.

Las diferencias de estabilidad *in vitro* observadas podrían condicionar los datos de biodistribución obtenidos, dado que si las NP GPM2 marcadas con tecnecio-99m son menos estables, su metabolización (básicamente hepática) podría llevar a la eliminación de fragmentos de las NP radiomarcadas por vía hepatobiliar para su posterior eliminación en las heces. Si la metabolización y fragmentación de las NP fuera muy intensa, supondría la liberación del radionucleido y su presencia en la sangre, por lo que finalmente se acumularía en estómago, tiroides y glándulas salivares. De ahí la importancia de los controles en los estudios *in vivo*, utilizando el radioisótopo libre.

Los resultados de imagen SPECT/CT y de cuantificación de la radiactividad en órganos mediante contador gamma parecen corroborar esta hipótesis, como se observa

en las figuras 34, 35, 39 y 40 en los apartados 1.4, 1.5, 2.4 y 2.5 de la sección de resultados.

El número de animales empleados para el estudio de biodistribución se ha visto limitado por razones técnicas ya que sólo se disponía de un equipo SPECT/CT y el número de NPs a evaluar era muy elevado. Por todo ello se decidió llevar a cabo de forma preliminar los estudios de biodistribución de las NPs GPM2, que habían mostrado una mayor estabilidad en los estudios *in vitro* realizados en suero fisiológico 0,9 % y plasma sanguíneo. En cuanto al número de animales empleados para cada experimento se han explorado tres animales por cada grupo de estudio atendiendo a trabajos publicados, en los cuales se utilizaban NPs marcadas con isótopos radiactivos (200, 186, 201).

Las imágenes de SPECT/CT permite la cuantificación de la acumulación de las NPs en los distintos órganos proporcionando información detallada de la biodistribución de las NPs tras su administración. En nuestro caso se cuantificó la actividad de los diferentes órganos tomando como el total la actividad medida en el VOI cuerpo total en la imagen a 2 horas

Las NPs marcadas con tecnecio-99m y galio-67 se administraron a dos grupos de animales por vía intravenosa para visualizar su biodistribución. Con el fin de evaluar la estabilidad del marcaje y la ausencia de liberación del radioisótopo se administró por vía intravenosa [^{99m}Tc]NaTcO₄ y cloruro de galio-67 libre como control a otros dos grupos de animales. Este es un control necesario, ya que una diferencia clara en el patrón de biodistribución entre las NPs marcadas y los controles del isótopo libre nos aseguran que lo que realmente se visualiza es la distribución de las NPs.

Tras su administración intravenosa se llevaron a cabo estudios secuenciales a lo largo de 24 horas con las NPs ^{99m}Tc -GPM2 y 48 horas con las ^{67}Ga -NOTA-GPM2, ya que su $T_{1/2}$ más largo permite su detección a tiempos más largos.

Tras la administración intravenosa de las NPs ^{99m}Tc -GPM2 se observó una elevada acumulación de la radiactividad tanto en el hígado como en la vejiga, lo cual sugiere un aclaramiento hepático/renal. La progresiva señal de las NPs ^{99m}Tc -GPM2 en el sistema digestivo puede deberse a la eliminación hepatobiliar.

La baja acumulación de actividad en estómago y tiroides sugiere una elevada estabilidad del marcaje *in vivo*, dado que el $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4^-$ libre se concentra fisiológicamente en tiroides a través del canal simportador de sodio/yodo (202, 203) y en la mucosa gástrica mediante la captación de las células parietales, que lo captan confundiendo con el cloruro que utilizan para producir los jugos gástricos (204).

Tras su administración intravenosa, las ^{67}Ga -NOTA-GPM2 se concentraron fundamentalmente en hígado, con una muy baja acumulación en vejiga ($\sim 1\%$). Dicho patrón de distribución se mantuvo constante pasadas las 48 horas de la administración lo que sugiere una elevada estabilidad del marcaje *in vivo*. Los controles de cloruro de galio-67 dieron lugar a un patrón de distribución mucho más difuso, observándose retención de actividad en nasofaringe, vejiga y médula ósea.

Comparando los estudios de biodistribución de las NPs radiomarcadas con los dos radioisótopos se observó que la acumulación de radiactividad en el hígado era superior en el caso de las NPs ^{67}Ga -NOTA-GPM2 ($66 \pm 5,65\%$ vs $36,66 \pm 3,78\%$ ^{99m}Tc -GPM2 2 horas post-inyección). Esto puede deberse a una menor estabilidad *in vivo* de las ^{99m}Tc -GPM2, que puede provocar la metabolización y eliminación de las mismas.

La acumulación de las NPs en el hígado es esperable ya que diferentes estudios muestran que el hígado secuestra del 30-99 % de las NPs que se administran por vía intravenosa. Tras su administración las NPs son opsonizadas en el torrente sanguíneo antes de ser fagocitadas por los macrófagos, acumulándose en los órganos del sistema retículo-endotelial, fundamentalmente en el hígado (205)

La tasa de retención en el hígado depende de la carga superficial y del tamaño de las NPs. En el caso de NPs como las del presente trabajo, con un tamaño comprendido

entre 100 y 350 nm, las NPs son fagocitadas por las células de Kupffer hepáticas mediante un proceso de endocitosis mediado por la proteína clatrina, penetrando en los lisosomas hepáticos. Posteriormente son metabolizadas por las enzimas hepáticas y excretadas por vía hepatobiliar (206).

Todos los resultados obtenidos durante los estudios de biodistribución *in vivo* fueron confirmados con los datos cuantitativos obtenidos del conteo de órganos realizado en el estudio *ex vivo* tras el sacrificio de los animales. Si bien los *ex vivo* sólo se llevaron a cabo a punto final, confirman que la retención principal de las NPs tiene lugar en el hígado. Las diferencias en los datos de % de retención de las NPs obtenidos entre ambas técnicas queda explicada por la diferente manera mediante la cual cuantifican la señal. La técnica *ex vivo* utiliza un contador de pozo, un equipo muy sensible y preciso al determinar la cantidad de radioisótopo que se encuentra en el órgano de interés. Sin embargo, la cuantificación de los estudios *in vivo* se basa en un dibujo de VOIs sobre las imágenes que no siempre es exacto, más teniendo en cuenta el límite de resolución del tomógrafo empleado y el efecto parcial de volumen de la señal, que lleva a una infraestimación de la misma (207).

En el presente trabajo se ha analizado el comportamiento de las NPs “vacías”. Es posible que la inclusión de distintos fármacos, en función de su naturaleza y propiedades físico-químicas pueda alterar la estabilidad *in vivo* y la biodistribución de las NPs, por lo que en futuros trabajos se deberán realizar pruebas de las NPs cargadas con diferentes moléculas modelo y analizar cómo diferentes moléculas afectan a las características físico-químicas de las NPs (modificaciones del tamaño de partícula, la forma, el potencial Z, la estabilidad, etc.).

VII. CONCLUSIONES

En este capítulo se detallan las conclusiones obtenidas tras el desarrollo del trabajo de investigación.

Del trabajo de investigación realizado en esta tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las NPs de albúmina con recubrimiento polimérico pueden marcarse con tecnecio-99m mediante un método de radiomarcaje directo con un sistema “tipo kit”, tras optimizar previamente las condiciones experimentales (concentración de SnCl_2 , tiempo y temperatura).
2. Los conjugados albúmina-NOTA y albúmina-DFO para el radiomarcaje de las NPs con galio-67 y zirconio-89 pueden obtenerse de forma rápida, sencilla y reproducible empleando columnas de exclusión molecular, evitando de esta forma procedimientos más largos y laboriosos, como la diálisis de proteínas.
3. Las NPs de albúmina modificada con los quelantes NOTA y DFO pueden prepararse y recubrirse con distintos polímeros sintéticos de forma reproducible mediante un procedimiento de desolvatación, obteniendo NPs con un tamaño y potencial Z adecuados.
4. La conversión del citrato de galio-67 a cloruro de galio-67 puede llevarse a cabo empleando un método de extracción en fase sólida, que ha sido optimizado y automatizado, obteniéndose una elevada eficiencia y reproducibilidad, con una reducción significativa de la irradiación del operador.
5. Las NPs de albúmina recubiertas con polímeros pueden radiomarcarse de forma eficiente con galio-67, optimizándose las condiciones experimentales (tiempo y temperatura).
6. La presencia del quelante NOTA es imprescindible para el radiomarcaje con galio-67 de las NPs de albúmina utilizadas.
7. No se consiguió llevar a cabo el radiomarcaje con zirconio-89 de las NPs de albúmina modificada con DFO y recubiertas poliméricamente, debido posiblemente a las condiciones del marcaje (presencia de ácido oxálico), ya

que sí que se consiguió el radiomarcaje de dichas NPs con galio-67, obteniéndose rendimientos adecuados.

8. El radiomarcaje de las NPs de albúmina con tecnecio-99m y galio-67 es estable en suero fisiológico al 0,9% y en plasma sanguíneo pasadas 24 horas del marcaje, observándose una reducción importante del mismo a las 48 horas en las NPs marcadas con tecnecio-99m.
9. En los estudios realizados mediante SPECT/CT tras la administración intravenosa en ratas Wistar, las NPs ^{99m}Tc -GPM2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2 se acumularon fundamentalmente en el hígado, permaneciendo en él durante periodos prolongados.
10. La acumulación hepática fue menor en las NPs ^{99m}Tc -GPM2 posiblemente debido a la metabolización de las mismas.
11. Los datos obtenidos mediante el conteo de órganos en contador gamma tras el sacrificio de los animales fueron concordantes con los obtenidos en los estudios de biodistribución *in vitro*.

VIII. ANEXOS

En este capítulo se adjuntan los artículos y comunicaciones a congresos derivados de esta tesis doctoral.

Artículos derivados de esta Tesis:

“Preparación, radiomarcaje con ^{99m}Tc y ^{67}Ga y estudios de biodistribución de nanopartículas de albúmina con recubrimientos poliméricos”.

De Arcocha-Torres M, Quincoces G, Martínez-López AL, Erhard A, Collantes M, Martínez-Rodríguez I, Ecay M, Banzo I, Irache JM, Peñuelas I.

Artículo aceptado para su publicación en la Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. DOI: 10.1016/j.remnm.2020.02.002

Comunicaciones orales y posters a Congresos derivados de esta Tesis:

“Preparación de nanopartículas de albúmina humana recubiertas con polímero radiomarcajes con galio- 67 ”

M. De Arcocha-Torres, A. Erhard, A.L. Martínez-López, I. Martínez-Rodríguez, G. Quincoces, R. Ramos-Membrive, I. Banzo, J.M. Irache, I. Peñuelas.

38º Congreso de la Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (SEMNUM)

Oviedo, 20-22 Junio de 2018

Rev Esp Med Nucl Imagen Mol. 2018;37(Supl 1):105

“Polymer-coated human serum albumin nanoparticles: preparation, radiolabelling with gallium-67, *in vivo* and *ex vivo* biodistribution studies”

M. De Arcocha-Torres, G. Quincoces , A.L. Martínez-López, A. Erhard, I. Luis-de Redin, M.Ecay, M. Collantes, I. Banzo, J.M. Irache, I. Peñuelas.

20 th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals

Verona, 7-10 Mayo de 2020

Original

Preparación, radiomarcaje con ^{99m}Tc y ^{67}Ga y estudios de biodistribución de nanopartículas de albúmina con recubrimientos poliméricos

M. de Arcocha-Torres^{a,b,*}, G. Quincoces^c, A.L. Martínez-López^d, A. Erhard^c, M. Collantes^e, I. Martínez-Rodríguez^{a,b}, M. Ecay^e, I. Banzo^{a,b}, J.M. Irache^d e I. Peñuelas^c

^a Servicio Medicina Nuclear, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

^b Grupo de investigación Imagen Molecular (IDIVAL), Universidad de Cantabria, Santander, España

^c Unidad de Radiofarmacia, Servicio Medicina Nuclear, Clínica Universidad de Navarra, IdiSNA, Pamplona, España

^d Departamento de Tecnología y Química Farmacéutica, Universidad de Navarra, Pamplona, España

^e Unidad de investigación micropet, Servicio Medicina Nuclear, Clínica Universidad de Navarra, IdiSNA, Pamplona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Recibido el 6 de noviembre de 2019
Aceptado el 6 de febrero de 2020
On-line el xxx

Palabras clave:
Nanopartículas
Albúmina
NOTA
SPECT/TC
 ^{99m}Tc
 ^{67}Ga

RESUMEN

Objetivo: Optimizar el radiomarcaje con ^{99m}Tc y ^{67}Ga de nanopartículas de albúmina recubiertas con 4 polímeros sintéticos distintos y evaluar su estabilidad *in vivo* e *in vitro*, así como su biodistribución *in vivo* tras su administración intravenosa.

Material y métodos: Las nanopartículas se prepararon empleando albúmina y albúmina modificada con NOTA mediante el método de desolvatación y se recubrieron con 4 polímeros distintos; HPMC, GMN2, GPM2 y GTM2. Se purificaron, liofilizaron y caracterizaron. El marcaje con ^{99m}Tc se realizó con 74 MBq de pertecnetato [^{99m}Tc] sódico previamente reducido con una disolución ácida de cloruro de estaño a diferentes concentraciones (0,003; 0,005; 0,007; 0,01; 0,05 y 0,1 mg/ml), a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min) y temperaturas (temperatura ambiente, 40 °C y 60 °C). El marcaje con ^{67}Ga se llevó a cabo mediante incubación de las nanopartículas con 37 MBq de cloruro de ^{67}Ga (obtenido a partir de citrato de ^{67}Ga comercial) a distintos tiempos (10 y 30 min) y temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C y 60 °C) y posterior purificación con microconcentradores. La pureza radioquímica de ambos marcajes se evaluó mediante TLC. Se llevaron a cabo estudios de estabilidad de las nanopartículas marcadas en suero fisiológico y plasma sanguíneo. Los estudios de biodistribución de las nanopartículas recubiertas con el polímero GPM2 se llevaron a cabo en ratas Wistar tras la administración intravenosa de las nanopartículas. Se realizaron animales control con pertecnetato [^{99m}Tc] sódico y cloruro de ^{67}Ga . Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se midió la actividad de los órganos en un contador gamma.

Resultados: El marcaje con ^{99m}Tc se llevó a cabo de forma óptima con una concentración de estaño de 0,007 mg/ml para las nanopartículas GPM2 y de 0,005 mg/ml para el resto de formulaciones, con un tiempo de marcaje de 10 min y a temperatura ambiente. En el caso del ^{67}Ga el marcaje se optimizó a 30 °C de temperatura y 30 min de incubación. En ambos casos, la pureza radioquímica obtenida fue superior al 97%. Las nanopartículas presentaron una elevada estabilidad *in vitro* pasadas las 48 h del marcaje (70% las nanopartículas marcadas con ^{99m}Tc y 90% las marcadas con ^{67}Ga). Los estudios de biodistribución de las nanopartículas [^{99m}Tc]-GPM2 y [^{67}Ga]-NOTA-GPM2 mostraron una elevada acumulación de actividad en el hígado tanto a las 2 h como a las 24 h de la administración intravenosa.

Conclusión: El procedimiento de marcaje con ^{99m}Tc y ^{67}Ga de nanopartículas de albúmina y albúmina modificada con NOTA permite la obtención de nanopartículas con elevados rendimientos de marcaje y una adecuada estabilidad *in vitro*, permitiendo su utilización para la realización de estudios *in vivo*.

© 2020 Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autora para correspondencia.
Correo electrónico: mariade.arcocha@scsalud.es (M. de Arcocha-Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.remni.2020.02.002>

2253-654X/© 2020 Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: de Arcocha-Torres M, et al. Preparación, radiomarcaje con ^{99m}Tc y ^{67}Ga y estudios de biodistribución de nanopartículas de albúmina con recubrimientos poliméricos. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.remni.2020.02.002>

Preparation, radiolabeling with ^{99m}Tc and ^{67}Ga and biodistribution studies of albumin nanoparticles covered with polymers

ABSTRACT

Keywords:
Nanoparticles
Albumin
NOTA
SPECT / CT
 ^{99m}Tc
 ^{67}Ga

Objective: To optimize radiolabeling with ^{99m}Tc and ^{67}Ga of albumin nanoparticles coated with 4 different synthetic polymers and to evaluate their stability *in vivo* and *in vitro*, as well as their biodistribution *in vivo* after intravenous administration.

Material and methods: The nanoparticles were prepared using albumin and NOTA-modified albumin by the desolvation method and coated with 4 different polymers; HPMC, GMN2, GPM2 and GTM2. They were purified, lyophilized and characterized. Radiolabeling with ^{99m}Tc was performed with 74 MBq of ^{99m}Tc sodium pertechnetate, previously reduced with acid solution of tin chloride at different concentrations (0.003, 0.005, 0.007, 0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml) and at different times (5, 10, 15, 30 and 60 minutes) and temperatures (room temperature, 40 °C and 60 °C). Radiolabeling with ^{67}Ga was performed by incubation of the nanoparticles with 37 MBq of ^{67}Ga chloride (obtained from commercial gallium- 67 citrate) at different times (10 and 30 minutes) and temperatures (room temperature, 30 °C and 60 °C), and posterior purification with microconcentrators. The radiochemical purity was evaluated by TLC. Stability studies of radiolabeled nanoparticles in physiological serum and blood plasma were performed. Biodistribution studies of nanoparticles coated with GPM2 polymer were carried out in Wistar rats after intravenous administration of the nanoparticles. Control animals were carried out with ^{99m}Tc sodium pertechnetate and ^{67}Ga chloride. To do so, the animals were killed and activity in organs was measured in a gamma counter.

Results: ^{99m}Tc labeling was carried out optimally with a tin concentration of 0.007 mg/ml for the GPM2 nanoparticles and 0.005 mg/ml for the rest of the formulations, with a radiolabeling time of 10 minutes at room temperature. In the case of ^{67}Ga the label was optimized at 30 °C temperature and 30 minutes of incubation. In both cases the radiochemical purity obtained was greater than 97%. The nanoparticles showed high stability *in vitro* after 48 hours of labeling (70% nanoparticles labeled with ^{99m}Tc and 90% those labeled with ^{67}Ga). Biodistribution studies of nanoparticles ^{99m}Tc -GPM2 and ^{67}Ga -NOTA-GPM2 showed a high accumulation of activity in the liver at 2 and 24 hours after intravenous administration.

Conclusion: The labeling procedure with ^{99m}Tc and ^{67}Ga of albumin and albumin modified with NOTA nanoparticles allows obtaining nanoparticles with high labeling yields and adequate *in vitro* stability, allowing their use for *in vivo* studies.

© 2020 Sociedad

Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

one

Introducción

Las nanopartículas (NP) han sido ampliamente utilizadas en biomedicina como vehículos para la administración de fármacos ya que los protegen de una potencial degradación, mejoran su absorción facilitando la difusión a través del epitelio y favorecen su penetración en el interior de las células¹.

Existen diferentes tipos de NP, como los liposomas, NP poliméricas, magnéticas, metálicas, etc., que están siendo utilizadas como sistemas de administración de diferentes fármacos^{2,3}.

Las NP poliméricas pueden estar formadas por polisacáridos, proteínas y polímeros sintéticos. Las NP basadas en proteínas como la albúmina sérica humana presentan múltiples ventajas ya que permiten liberar fármacos de forma segura y efectiva debido a su baja inmunogenicidad, ausencia de toxicidad y buena tolerancia *in vivo*^{4,5}.

Las NP de albúmina han mostrado su utilidad en el transporte de fármacos quimioterápicos como el paclitaxel y docetaxel, mejorando su eficacia debido a un incremento en el tiempo de permanencia en el organismo y una reducción de los efectos secundarios indeseados^{6,7}. En la actualidad, está comercializado el fármaco Abraxane®, formado por una combinación del paclitaxel con NP de albúmina.

Las NP de albúmina también se han utilizado para la administración de anticuerpos monoclonales, como el bevacizumab⁸.

Para la preparación de las NP de albúmina se han empleado distintos procesos físico-químicos como la gelación térmica, la

emulsificación y la desolvatación (coacervación) El método de desolvatación es el más utilizado debido a su simplicidad y reproducibilidad⁹⁻¹².

La utilización de polímeros sintéticos como el copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico (Gantrez® AN 119), la tiamina, la manosamina, el polietilenglicol 2000 o la hidroxipropilmetilcelulosa para el recubrimiento de las NP puede mejorar sus propiedades físico-químicas y modificar su biodistribución *in vivo*¹³⁻¹⁸.

El empleo de técnicas basadas en el uso de radiotrazadores permite realizar estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo*. Debido a las adecuadas propiedades físicas del ^{99m}Tc ($T_{1/2} = 6,02$ h, emisor gamma puro de 140 KeV) y a su gran disponibilidad mediante el empleo de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, lo convierten en un isótopo de gran interés para el radiomarcado de las NP^{19,20}.

En el caso de NP que precisen la visualización de su biodistribución a largo plazo, se requiere el empleo de isótopos de vida media más larga, como el ^{67}Ga ($T_{1/2} = 78,26$ h, emisor gamma)^{21,22}.

El objetivo del presente trabajo es la preparación de NP de albúmina y albúmina modificada con el quelante 2-S-(4-isotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacetato (NOTA) recubiertas con 4 polímeros sintéticos distintos, la optimización de su radiomarcado con los isótopos ^{99m}Tc y ^{67}Ga , la realización de estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo*, con el fin de evaluar su utilidad como vehículo para la administración de fármacos por vía intravenosa.

Material y métodos

Reactivos

La albúmina sérica humana y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) fueron suministradas por Sigma-Aldrich (España). Los polímeros sintéticos obtenidos mediante la unión covalente de la estructura polimérica del Gantrez® AN 119 (Merck, Darmstadt, Alemania) al polietilenglicol 2000 (GPM2), manosamina (GMN2) y tiamina (GTM2), fueron sintetizados en el Departamento de Tecnología y Química Farmacéutica de la Universidad de Navarra. El generador de ^{99m}Tc (Drytec®) y las columnas de desalinización PD10 fueron suministradas por GE Healthcare (Reino Unido). El quelante NOTA fue adquirido a Macrocyclus (Dallas, Texas, EE. UU.). El citrato de ^{67}Ga fue suministrado por Mallinckrodt Medical (Petten, Holanda).

Las columnas Sep-Pak silica light (WAT023537) fueron suministradas por Waters (Milford, Massachusetts, EE. UU.). El NaCl al 0,9% y el agua para inyectables fueron suministrados por Braun Medical S.A (Barcelona, España). El cloruro de estaño dihidrato fue suministrado por Panreac (Barcelona, España). Los filtros de ultracentrifugación (Amicon® Ultra 0,5 ml), acetato de amonio, carbonato sódico, ácido acético, acetato de sodio, etanol y el ácido clorhídrico fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania). El agua tipo 1 se obtuvo a través de un equipo milliQ (Millipore Corporation, Massachusetts, EE. UU.). Finalmente, las placas de cromatografía en capa fina Whatman 1® fueron suministradas por GE Healthcare (Reino Unido).

Animales

Se emplearon 12 ratas Wistar hembra con un peso medio de 200 g que fueron cuidadas y alimentadas bajo condiciones estándar con libre acceso a comida y bebida. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo un protocolo previamente aprobado por el Comité ético de la Universidad de Navarra en línea con la legislación europea de animales de experimentación (2010/63/UE, protocolo 066-16).

Preparación de las nanopartículas

Preparación de las nanopartículas de albúmina recubiertas

Las NP de albúmina funcionalizadas en superficie mediante recubrimiento con los polímeros conjugados HPMC, GMN2, GPM2 y GTM2 se prepararon mediante un procedimiento de desolvatación con etanol siguiendo el protocolo descrito por Joye y McClements²³ con pequeñas modificaciones. Para su preparación se disolvieron 100 mg de albúmina sérica humana en 7,5 ml de agua tipo 1 mediante agitación. Posteriormente, se añadió la cantidad apropiada de HCl 1 N y 16 ml de etanol absoluto para la formación de las NP. La nanosuspensión se mantuvo bajo agitación 10 min antes de incorporar el polímero para el recubrimiento de las NP, manteniendo el sistema bajo agitación magnética durante 30 min. Las cantidades de HCl para el ajuste del pH y de polímero añadido en función del tipo de NP quedan reflejadas en la tabla 1.

Tras la incubación, el etanol de la formulación se eliminó mediante evaporación bajo presión reducida en un rotavapor (Buchi Rotavapor R-144, Reino Unido). Posteriormente, las NP se centrifugaron a 41.000 g durante 20 min a 4 °C (Sigma 3 K30, Munich, Alemania), se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 3 ml de sacarosa al 3% como crioprotector para su posterior liofilización (Genesis 12 EL; Virtis, EE. UU.).

Las NP se caracterizaron mediante espectroscopia de correlación fotónica (tamaño e índice de polidispersión) y anemometría

Tabla 1

Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NP de albúmina y las NP de albúmina-NOTA

Nanopartícula (NP)	HCl (μl)	Polímero (mg)
NP-HPMC	3	25
NP-GMN2	3	3
NP-GPM2	6	3
NP-GTM2	6	3
NP-NOTA-HPMC	7	25
NP-NOTA-GMN2	6	3
NP-NOTA-GPM2	10	3
NP-NOTA-GTM2	9	3

GMN2: polímero manosamina; GPM2: polímero polietilenglicol 2000; GTM2: polímero tiamina; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa.

láser doppler (potencial zeta), empleando un analizador Zetamaster (Malvern Instruments, Reino Unido).

Preparación de las nanopartículas de albúmina modificadas con NOTA y recubiertas

Para la preparación de las NP de albúmina modificadas con NOTA se llevó a cabo previamente la conjugación de la albúmina con el quelante NOTA. Se incubaron 20 mg de albúmina sérica humana y 10 mg del quelante en 1,5 ml de carbonato sódico 0,1 M a pH 9,5, durante 1 h y en agitación. Tras la incubación, el conjugado albúmina-NOTA se purificó con una columna de desalinización PD-10.

Las NP de albúmina modificadas con NOTA se prepararon mediante el procedimiento anteriormente descrito empleando para ello una proporción 100:3 de albúmina:albúmina modificada con NOTA. Las cantidades de HCl y polímero añadido en función del tipo de NP quedan reflejadas en la tabla 1.

Las NP se caracterizaron siguiendo el método previamente descrito.

Radiomarcado de las nanopartículas

Marcado de las nanopartículas con ^{99m}Tc

El radiomarcado de las NP se llevó a cabo con ^{99m}Tc mediante reducción del pertechnetato [^{99m}Tc] sódico ([^{99m}Tc] TcO_4^-) con cloruro de estaño (SnCl_2). Con el fin de obtener el mayor porcentaje de NP marcadas, minimizando la cantidad de [^{99m}Tc] TcO_4^- y coloides de ^{99m}Tc , se ensayaron 6 concentraciones distintas de SnCl_2 , para establecer la concentración con la que se obtiene un elevado rendimiento de marcado sin la presencia de coloides de tecnecio debidos a un exceso del mismo. Asimismo, se probaron distintas temperaturas y tiempos para establecer los parámetros óptimos de marcado. Para ello se añadieron 40 μl de una disolución de cloruro de estaño dihidratado 0,003; 0,005; 0,007; 0,01; 0,05 y 0,1 mg/ml a 1 mg de las formulaciones de NP liofilizadas (NP-HPMC, NP-GMN2, NP-GPM2 y NP-GTM2), purgando el vial con helio hasta su completo secado con el fin de minimizar la cantidad de oxígeno presente y evitar la oxidación del estaño. Posteriormente, se procedió a la adición de $74 \pm 0,57 \text{ MBq}$ de [^{99m}Tc] TcO_4^- en 0,5 ml de suero fisiológico 0,9%, se agitó la mezcla en un vórtex y se probaron distintas temperaturas (temperatura ambiente, 40 °C y 60 °C) y distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Marcado de nanopartículas con cloruro de ^{67}Ga

El cloruro de ^{67}Ga (^{67}Ga Cl₃) se obtuvo mediante la purificación de citrato de ^{67}Ga comercial empleando el método de extracción en fase sólida (SPE) descrito por Ščasný y van Lier²⁴, basado a su vez en el método desarrollado por Chan y Gonda²⁵. Con el fin de reducir la exposición del operador se automatizó el proceso haciendo pasar el citrato de ^{67}Ga comercial por 2 columnas de sílica conectadas en serie empleando una bomba de infusión

a un flujo constante de 0,1 ml/min. Posteriormente, las columnas se lavaron con 4 ml de agua milli-Q y los iones de ^{67}Ga retenidos en las columnas se eluyeron con una solución de HCl 0,1 M a un flujo de 0,1 ml/min en 10 fracciones de 100 μl cada una. Se midieron todas las fracciones en un activímetro (Capintec[®] CRC-15R, EE. UU.) y la fracción que mostró mayor actividad radiactiva fue la empleada para el posterior marcaje de las NP. El pH de la fracción se ajustó a 3-5 con una disolución de acetato de amonio 0,1 M.

El marcaje de las NP modificadas con NOTA se llevó a cabo incubando 2 mg de las NP liofilizadas dispersas en 100 μl de agua con 37 MBq de $^{67}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ en un volumen de 100 μl y 200 μl de acetato sódico 0,2 M a pH 3,8 (acidificado con ácido acético), durante distintos tiempos (15 y 30 min) y a distintas temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C y 60 °C) para determinar los parámetros óptimos de marcaje.

Tras la incubación, la mezcla se purificó mediante microconcentradores (Amicon[®] Ultra 30K, 0,5 ml) por centrifugación a 2.500 g y el precipitado se lavó 2 veces con una solución de acetato de sodio 0,2 M para eliminar el ^{67}Ga libre. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 200 μl de NaCl 0,9%. La actividad presente en el precipitado, sobrenadante y lavados se midió en un activímetro para determinar la eficiencia del marcaje. Los experimentos se realizaron por triplicado con cada una de las formulaciones de NP.

Control de la pureza radioquímica de las nanopartículas radiomarcadas

La pureza radioquímica de las NP marcadas se determinó empleando un sistema de cromatografía en capa fina (TLC) con tiras Whatman 1. En el caso de las NP marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, se añadió una microgota de la muestra a 1 cm del origen de la tira de papel Whatman 1 y se desarrolló hasta 9 cm con suero fisiológico. En el caso de las NP marcadas con ^{67}Ga , la fase móvil empleada fue una solución de ClH 0,05 M. Las tiras se leyeron en un radiocromatógrafo Scan-Ram, equipado con un detector de NaI(Tl)-PMT y el programa informático Laura[®] (Lab-Logic Systems, Reino Unido).

Estudios de estabilidad de las nanopartículas marcadas

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad del radiomarcaje mediante incubación en suero fisiológico y plasma sanguíneo. Las NP marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se resuspendieron en 200 μl de suero fisiológico y plasma sanguíneo, respectivamente, y se incubaron a 37 °C en un baño térmico. A la 1, 3, 12, 24 y 48 h, se determinó la pureza radioquímica mediante el método de cromatografía en capa fina descrito previamente.

Las NP marcadas con ^{67}Ga se resuspendieron en 300 μl de suero fisiológico y plasma sanguíneo respectivamente. A continuación, la muestra se fraccionó en 6 alícuotas que se incubaron a 37 °C durante 1, 3, 12, 24, 48 y 72 h. Pasado el tiempo correspondiente, las muestras se purificaron mediante filtración por centrifugación. Posteriormente, se midió la radiactividad del sobrenadante y del filtro para determinar la estabilidad de las NP mediante la ecuación Estabilidad (%) = radiactividad filtro / (radiactividad filtro + radiactividad sobrenadante).

Estudios de biodistribución de las nanopartículas marcadas

Los estudios de biodistribución *in vivo* se llevaron a cabo en ratas Wistar hembra con NP GPM2 marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{67}Ga , ya que fueron las más estables en los estudios *in vitro*.

Se emplearon 12 animales, 6 controles (a los que se les administró por vía intravenosa 8,63 \pm 0,22 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{TcO}_4]$ o 7 \pm 0,60 MBq de $^{67}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$) y otros 6 para el estudio de la biodistribución de las NP marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{67}Ga (8,57 \pm 0,26 MBq de NP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2 o 8,31 \pm 0,12 MBq de NP ^{67}Ga -NOTA-GPM2).

Tabla 2

Características físico-químicas de las NP de albúmina y albúmina modificada con NOTA. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar de al menos 3 medidas diferentes

Nanopartícula (NP)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Zeta (mV)
NP-HPMC	278 \pm 2,79	0,245 \pm 0,007	-14,14 \pm 1,16
NP-GMN2	309 \pm 0,50	0,181 \pm 0,080	-18,35 \pm 0,78
NP-GPM2	244 \pm 3,40	0,153 \pm 0,090	-21,19 \pm 0,45
NP-GTM2	203 \pm 3,83	0,205 \pm 0,029	-25,25 \pm 0,46
NP-NOTA-HPMC	217 \pm 1,02	0,478 \pm 0,010	-22,88 \pm 1,59
NP-NOTA-GMN2	212 \pm 0,35	0,142 \pm 0,010	-12,21 \pm 1,31
NP-NOTA-GPM2	244 \pm 6,62	0,123 \pm 0,086	-23,87 \pm 1,66
NP-NOTA-GTM2	184 \pm 5,60	0,253 \pm 0,010	-14,22 \pm 1,05

GMN2: polímero manosamina; GPM2: polímero polietilenglicol 2000; GTM2: polímero tiamina; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa.

Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2% (flujo de oxígeno 0,2 l/min). Las imágenes se obtuvieron empleando una gammacámara SPECT/TC de doble cabezal Symbia T2-TruePoint[®] (Siemens, Munich, Alemania). Se colocaron las ratas en posición prono y se adquirieron los estudios SPECT/TC a 6 tiempos diferentes (2, 6, 8, 10 y 24 h para el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y 2, 6, 8, 10 y 48 h en el caso del ^{67}Ga), obteniéndose un total de 60 imágenes (15 imágenes por cada radiotrazador).

Para poder comparar cuantitativamente las imágenes entre sí evitando el efecto de la desintegración física del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y del ^{67}Ga , el tiempo de adquisición de los estudios se fue aumentando a lo largo de los distintos puntos temporales. Los parámetros empleados para la adquisición de las imágenes SPECT fueron los siguientes: matriz 128 \times 128, 90 imágenes, 7 imágenes por segundo, y para el TC: 110 mA, 130 kV, 130 imágenes, grosor de corte de 3 mm. Las imágenes se reconstruyeron aplicando las correcciones de atenuación y dispersión durante el proceso de reconstrucción.

Las imágenes fusionadas se visualizaron utilizando el software Syngo MI Applications TrueD (Siemens). Tras el análisis cualitativo, se exportaron al programa especializado de análisis de imagen molecular PMOD v3.2 (PMOD Technologies, Suiza). El análisis cuantitativo se realizó mediante dibujo de volúmenes de interés sobre las imágenes anatómicas del TC que posteriormente fueron llevadas a las imágenes de SPECT. Se dibujaron volúmenes de interés del contorno del animal (cuerpo total) y de los órganos de interés. El cálculo del porcentaje de actividad en los órganos se realizó tomando como total de dosis administrada la actividad medida en el volumen de interés correspondiente al cuerpo total en la imagen a las 2 h.

Estudios de biodistribución ex vivo

Tras la adquisición de los estudios SPECT/TC, los animales se sacrificaron mediante inyección letal de eutanásico T-61, se diseccionaron, extrajeron y pesaron los órganos (hígado, pulmón, riñón, estómago, tiroides y sangre) para su posterior recuento en un contador gamma (Hidex AMG Automatic Gamma Counter; Hidex AMG, Software versión 1.37.0). Finalmente, los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad por gramo y porcentaje de actividad por órgano.

Resultados

Caracterización de las nanopartículas

La tabla 2 resume las principales características físico-químicas de las diferentes formulaciones de NP empleadas en este trabajo. La utilización de albúmina modificada con el quelante NOTA produjo una disminución del tamaño de las NP resultantes respecto a las NP con albúmina sin modificar.

Tabla 3

Rendimientos de marcaje de las NP con ^{67}Ga en distintas condiciones de tiempo y temperatura. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar de 3 medidas diferentes

Nanopartícula (NP)	10 min T ^a ambiente	30 min T ^a ambiente	30 min 30 °C	30 min 60 °C
NP-NOTA-HPMC	35,2 \pm 6,1	62,5 \pm 2,9	65,5 \pm 4,3	55,9 \pm 3,4
NP-NOTA-GMN2	40,3 \pm 3,1	71,3 \pm 1,4	72,9 \pm 2,1	66,6 \pm 1,6
NP-NOTA-GPM2	46,4 \pm 1,2	60,4 \pm 3,3	69,2 \pm 2,6	63,6 \pm 2,7
NP-NOTA-GTM2	38,1 \pm 2,2	68,2 \pm 1,9	71,6 \pm 1,2	67,3 \pm 2,8

GMN2: polímero manosamina; GPM2: polímero polietilenglicol 2000; GTM2: polímero tiamina; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa.

Radiomarcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, control de calidad y estabilidad de las nanopartículas marcadas

La concentración de cloruro de estaño con la que se obtuvieron los rendimientos de marcaje más elevados en las NP GPM2 fue de 0,007 mg/ml. En el caso de las NP GTM2, GM2 y HPMC, la concentración óptima fue de 0,005 mg/ml. Se realizó el marcaje a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min) y a distintas temperaturas (temperatura ambiente, 40 °C y 60 °C). Los mejores resultados se obtuvieron con una incubación de 10 min y a temperatura ambiente, frente a tiempos de incubación más elevados y con la aplicación de calor. En estas condiciones, la pureza radioquímica determinada mediante cromatografía en capa fina TLC fue de 97,93 \pm 0,61%; 97,59 \pm 0,52%; 97,87 \pm 0,14% y 98,66 \pm 0,24% para las NP GTM2, GPM2, GM2 y HPMC, respectivamente.

Los estudios de estabilidad mostraron que a las 48 h del marcaje, la pureza radioquímica era superior al 70% en suero fisiológico y al 65% en plasma sanguíneo en todos los casos. Las curvas de estabilidad en ambos medios se muestran en la figura 1.

Radiomarcaje con ^{67}Ga , control de calidad y estabilidad de las nanopartículas marcadas

El proceso de conversión del citrato de ^{67}Ga en cloruro de ^{67}Ga se automatizó mediante el empleo de una bomba de infusión con el fin de optimizar el proceso y minimizar la exposición a la radiación. Los mejores resultados se obtuvieron empleando un flujo de elución de 0,1 ml/min, consiguiendo una conversión del 96,13 \pm 1,12%, frente al 60,83 \pm 1,72% obtenido empleando un flujo de 0,3 ml/min.

El marcaje se llevó a cabo a diferentes tiempos (10 y 30 min) y diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 30 °C y 60 °C). Los rendimientos más elevados se obtuvieron con una incubación de 30 min y una temperatura de 30 °C. A temperaturas más elevadas, el rendimiento de marcaje se redujo. La tabla 3 muestra los rendimientos de marcaje obtenidos en las condiciones de tiempo y temperatura ensayadas.

La eficiencia de marcaje, determinada mediante centrifugación con microconcentradores con un tiempo de incubación de 30 min y una temperatura de 30 °C, fue de 71,6 \pm 4,3%; 69,2 \pm 2,6%; 72,9 \pm 2,1% y 65,5 \pm 4,3% para las NP ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GPM2, ^{67}Ga -NOTA-GM2 y ^{67}Ga -NOTA-HPMC, respectivamente. La pureza radioquímica tras la purificación fue superior al 98,5% en todos los casos (99,2%; 99,5%; 99,1% y 98,5% para ^{67}Ga -NOTA-GTM2, ^{67}Ga -NOTA-GPM2, ^{67}Ga -NOTA-GM2 y ^{67}Ga -NOTA-HPMC, respectivamente).

Los estudios de estabilidad mostraron que las NP permanecieron estables pasadas 48 h tras el marcaje, obteniéndose en todos los casos porcentajes de NP marcadas superiores al 90% en suero fisiológico y del 70-80% en plasma sanguíneo (fig. 1).

Estudios de biodistribución in vivo de nanopartículas marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

La figura 2 muestra las imágenes de SPECT/TC de la distribución de las NP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2 tras la administración intravenosa frente a las imágenes obtenidas tras la administración de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TcO₄.

Asimismo, se muestran los resultados de biodistribución de cada órgano tras la administración intravenosa de las NP marcadas $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2. En las imágenes se observó que la mayor acumulación de radiactividad, tanto a la hora como a las 24 h, se encontró en el hígado (36,66 \pm 3,78% a la hora; 14,66 \pm 0,57% a las 24 h). En el caso de los controles con [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TcO₄ la actividad se localizó fundamentalmente en estómago (43 \pm 6,8% a la hora; 35 \pm 14% a las 24 h).

Estudios de biodistribución in vivo de nanopartículas marcadas con ^{67}Ga

La figura 3 muestra las imágenes de SPECT/TC de la distribución de las NP ^{67}Ga -NOTA-GPM2 tras la administración intravenosa frente a las imágenes obtenidas tras la administración de [^{67}Ga]GaCl₃. También se muestran los resultados de biodistribución de cada órgano tras la administración intravenosa de las NP ^{67}Ga -NOTA-GPM2 frente a la distribución del [^{67}Ga]GaCl₃.

Al igual que las NP marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, en este caso las NP se acumularon en el hígado, tanto a la hora como a las 48 h (66 \pm 5,65% a la hora; 20,66 \pm 1,52% a las 48 h). En los controles con cloruro de ^{67}Ga , la actividad se localizó fundamentalmente en nasofaringe (10 \pm 0,1% a la hora; 3,33 \pm 0,57% a las 48 horas), hígado (6,5 \pm 0,7% a la hora; 1 \pm 1% a las 48 horas) y médula ósea (3,5 \pm 0,7% a la hora; 1 \pm 0,1% a las 48 h).

Estudios de biodistribución ex vivo

La figura 4 representa el porcentaje de la dosis inyectada por órgano tras el sacrificio de los animales. Los datos ex vivo corroboraron los datos in vivo, observándose que la mayor acumulación de dosis fue en el hígado (10,17 \pm 0,91% en las NP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2 y 36,7 \pm 4,05% en las ^{67}Ga -NOTA-GPM2), con una baja acumulación en el resto de los órganos estudiados.

Discusión

Numerosas publicaciones refieren las propiedades de las NP de albúmina como vehículo para la administración de fármacos²⁶⁻²⁹. Sin embargo, se tienen muy pocos datos acerca del comportamiento in vitro e in vivo tras el recubrimiento de las mismas con polímeros conjugados.

Esta modificación de la superficie de las NP empleando polímeros tiene como finalidad mejorar las propiedades farmacocinéticas de las mismas, incrementando su estabilidad y consiguiendo como resultado una mayor permanencia en el lugar de interés⁵.

El recubrimiento con polímeros obtenidos mediante la conjugación del Gantrez[®] AN con moléculas como la tiamina o la manosamina ha mostrado su utilidad en la administración de vacunas y proteínas por vía oral, evidenciando un incremento de la permanencia de las NP en la mucosa intestinal^{15,30-32}. Por su parte, el polietilenglicol ha sido ampliamente utilizado en nanomedicina para la modificación de las NP con el objetivo de incrementar su tiempo de permanencia en el organismo⁴.

En el presente estudio, se han preparado 4 formulaciones de NP de albúmina recubiertas con diferentes polímeros conjugados sintéticos, y se ha desarrollado y optimizado su marcaje con los radioisótopos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{67}Ga con el fin de determinar su estabilidad in vitro para valorar la utilidad de las NP como vehículos para la administración de fármacos por vía intravenosa. Asimismo,

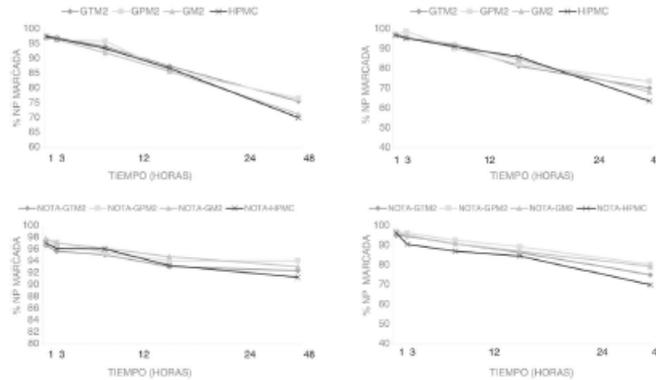


Figura 1. Estabilidad en suero fisiológico (columna izquierda) y plasma sanguíneo (derecha) de las nanopartículas marcadas con ^{99m}Tc (fila superior) y con ^{67}Ga (fila inferior).

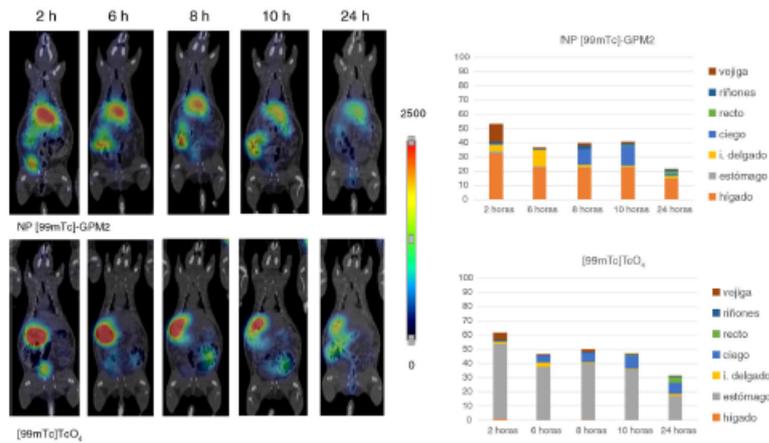


Figura 2. Imágenes SPECT/TC tras la administración intravenosa de NP ^{99m}Tc -GPM2 vs. ^{99m}Tc TcO₄ y porcentaje de dosis inyectada por órgano.

se ha estudiado de forma preliminar la biodistribución *in vivo* de la formulación de NP GPM2, que fueron las que mostraron una mayor estabilidad en los estudios *in vitro* (73,69% y 80,4% en plasma sanguíneo de las NP ^{99m}Tc -GPM2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2, respectivamente).

En nuestra experiencia se observó una ligera disminución del tamaño de las NP modificadas con NOTA frente a las no modificadas. Este hecho está probablemente en relación con el entrecruzamiento entre el NOTA y la albúmina sérica humana, produciéndose una compactación de la estructura de la NP. No se observó una modificación significativa de la carga superficial de las NP modificadas.

En el marcaje de las NP con ^{99m}Tc se emplea como agente reductor el SnCl₂, que a diferencia de otros agentes reductores, como el borohidruro de sodio o el ditionito de sodio, confiere a las NP una mayor estabilidad tras su marcaje^{33,34}. El principal inconveniente del uso del SnCl₂ es la posible aparición de coloides de tecnecio por la presencia de un exceso del reductor. Se han desarrollado

distintos métodos para la separación de los coloides mediante cromatografía en capa fina y ultracentrifugación^{19,34}, pero hasta el momento ninguno ha dado resultados satisfactorios. Por ello, en el presente estudio se ha realizado el marcaje con ^{99m}Tc empleando distintas concentraciones de SnCl₂ para determinar la concentración óptima de estaño, que en nuestro caso es aquella en la que se obtiene un elevado rendimiento de marcaje con una mínima proporción de ^{99m}Tc TcO₄ asegurándonos de esta forma la ausencia de formación de coloides.

Para el procedimiento de marcaje con ^{99m}Tc se desarrolló un método tipo «kit» similar al empleado en el marcaje de los radiofármacos tecnecios. En este sentido, preparando viales que contenían la NP y el SnCl₂ en una atmósfera inerte para su posterior marcaje con ^{99m}Tc , reduciendo de manera notable los tiempos de trabajo y mejorando la reproducibilidad del proceso.

Previo al marcaje con ^{67}Ga , se modificó la albúmina mediante su conjugación con el quelante NOTA. El proceso

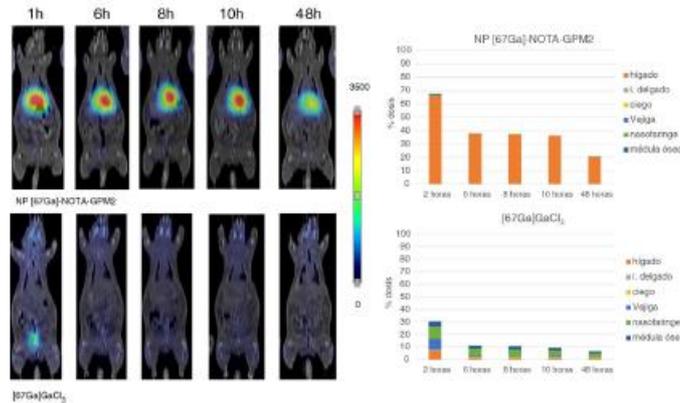


Figura 3. Imágenes SPECT/TC tras la administración intravenosa de NP [67Ga]-NOTA-GPM2 vs. [67Ga]GaCl3 y porcentaje de dosis inyectada por órgano.

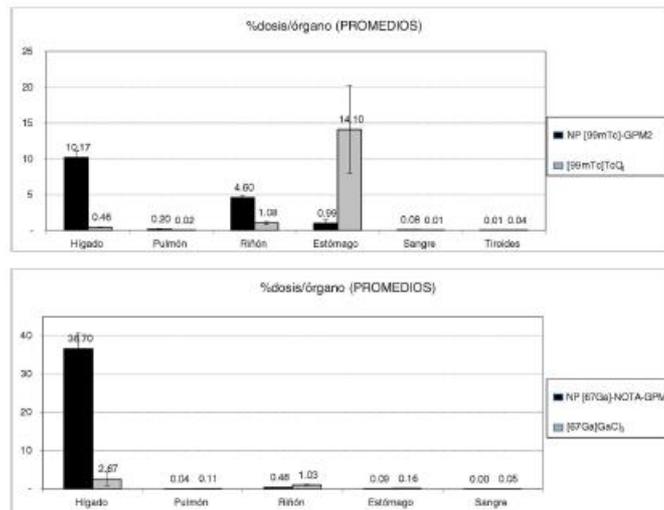


Figura 4. Porcentaje de dosis inyectada por órgano. NP [99mTc]-GPM2 (fila superior), NP [67Ga]-NOTA-GPM2 (fila inferior). Los datos se expresan como media ± desviación estándar, n= 3.

de purificación del conjugado albúmina-NOTA se llevó a cabo empleando columnas de desalinización. Con este método se consiguieron buenos resultados en cortos periodos de tiempo, en comparación con las técnicas habituales de separación de proteínas, como la electroforesis, que requieren periodos prolongados.

El marcaje con ⁶⁷Ga se ha llevado a cabo con [⁶⁷Ga]GaCl₃ ya que el citrato de ⁶⁷Ga presenta problemas técnicos en el radiomarcaje debido a la fuerte unión existente entre el ion galio y el citrato³⁵. Al no disponer de [⁶⁷Ga]GaCl₃, este se obtuvo a partir del citrato de ⁶⁷Ga comercial, desarrollándose un método automatizado con el

fin de reducir la exposición a la radiación y obtener el [⁶⁷Ga]GaCl₃ de forma reproducible.

Se realizaron pruebas de marcaje a distintos tiempos y temperaturas con el fin de obtener las condiciones óptimas de marcaje. En el caso del marcaje con ^{99m}Tc, no se observaron cambios significativos por la aplicación de temperatura. Ahora bien, en el marcaje con ⁶⁷Ga se constató una mejoría en los rendimientos empleando un calentamiento ligero (30 °C), produciéndose una disminución de los mismos cuando se aplicaron temperaturas más elevadas (60 °C).

Los estudios de estabilidad *in vitro* mostraron que las NP permanecían estables durante periodos superiores a 48 h en el marcaje

con ambos isótopos, mostrando una mayor estabilidad las NP GMP2. Las NP marcadas con ^{67}Ga presentaron una mayor estabilidad que las marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, probablemente debido a que al empleo del quelante bifuncional NOTA confiere una elevada estabilidad al complejo marcado.

Tras la administración intravenosa de las NP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2 y ^{67}Ga -NOTA-GPM2, las imágenes SPECT/TC mostraron actividad fundamentalmente en el hígado, manteniéndose dicha actividad elevada pasadas las 24 h en el caso de las NP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GPM2 y 48 h en las ^{67}Ga -NOTA-GPM2.

Este resultado fue confirmado en los datos cuantitativos obtenidos en el estudio *ex vivo* de los órganos.

Conclusión

En este estudio se ha optimizado el proceso de obtención de albúmina modificada con NOTA para la posterior construcción de las NP y marcaje con ^{67}Ga , evitando procesos de purificación largos como la electroforesis.

El método de marcaje descrito con los isótopos radiactivos ^{67}Ga y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permite la obtención de NP con elevados rendimientos de marcaje y una adecuada estabilidad *in vitro*.

Financiación

Este estudio ha recibido financiación del fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (Madrid). Proyecto PI14/01830 –NATERABEVA.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses que declarar.

Bibliografía

- Dong P, Rakesh KP, Manukumar HM, Mohammed YHE, Karthik CS, Sumathi S, et al. Innovative nano-carriers in anticancer drug delivery: A comprehensive review. *Bioorg Chem*. 2019;10:325–36.
- Zhang J, Tang H, Liu Z, Chen B. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:8483–93.
- Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM. Nanoparticles in wound healing: from hope to promise, from promise to routine. *Front Biosci (landmark Ed.)*. 2018;23:1038–59.
- Fahrländer E, Schelhaas S, Jacobs AH, Langer K. PEGylated human serum albumin (HSA) nanoparticles: Preparation, characterization and quantification of the PEGylation extent. *Nanotechnology*. 2015;26:145103.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*. 2012;157:168–82.
- Zong Y, Wu J, Shen K. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:17360–72.
- Qu N, Sun Y, Li Y, Hao F, Qiu P, Teng L, et al. Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and evaluation. *Biomed Eng Online*. 2019;18:1–14.
- Luis de Redin I, Boiero C, Martínez-Oharriz MC, Agüeros M, Ramos R, Peñuelas I, et al. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab. *Int J Pharm*. 2018;25:214–23.
- Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drugs conjugates and nanoparticles. *J Control Release*. 2008;132:17183.
- Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, Zangabad PS, Mirshekari H, Bozorgomid M, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Deliv*. 2016;13:1609–23.

- Loureiro A, Azoia NG, Gomes AC, Cavaco-Paulo A. Albumin-based nanodevices as drug carriers. *Curr Pharm Des*. 2016;22:1371–90.
- An FF, Zhang XH. Strategies for preparing albumin-bases nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. *Theranostics*. 2017;23:3667–89.
- Artés P, Wirth M, Arango MA, Gabor F, Irache JM. Gantrez An as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. *J Control Release*. 2002;83:321–30.
- Mallakpour S, Khani Z. Surface modified SiO2 nanoparticles by thiamine and ultrasonication synthesis of PCL/SiO2-VB1 NCs: Morphology, thermal, mechanical and bioactivity investigations. *Ultrason Sonochem*. 2018;3:527–37.
- Inchaurraga I, Martínez-López AL, Cattoz B, Griffiths PC, Wilcox M, Pearson JP, et al. The effect of thiamine-coating nanoparticles on their biodistribution and fate following oral administration. *Eur J Pharm Sci*. 2019;1:81–90.
- Iglesias T, López de Cerain A, Irache JM, Martín-Abella N, Wilcox M, Pearson J, et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles in the gastrointestinal tract of mice. *Int J Pharm*. 2017:517:67–79.
- Iglesias T, Irache JM, Butinar M, Turk B, López de Cerain A, Azqueta A. Genotoxic evaluation of poly(anhydride) nanoparticles in the gastrointestinal tract of mice. *Int J Pharm*. 2017;530:187–94.
- Iglesias T, Dusinska M, El Yamani N, Irache JM, Azqueta A, López de Cerain A. In vitro evaluation of the genotoxicity of poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *Int J Pharm*. 2017:523:418–26.
- Areses P, Agüeros MT, Quincoces G, Collantes M, Richter JA, López-Sánchez LM, et al. Molecular imaging techniques to study the biodistribution of orally administered $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled naive and ligand-tagged nanoparticles. *Mol Imaging Biol*. 2011;13:1215–23.
- Sánchez-Martínez M, da Costa Martins R, Quincoces G, Gamazo C, Caicedo C, Irache JM, et al. Radiolabeling and biodistribution studies of polymeric nanoparticles as adjuvants for ocular vaccination against brucellosis. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2013;32:92–7.
- Jalilian AR, Panahifar A, Mahmoudi M, Aklaghi M, Simchi A. Preparation and biological evaluation of [^{67}Ga]-labeled-superparamagnetic nanoparticles in normal rats. *Radiochem Acta*. 2009;97:51–6.
- Peñalva R, Morales J, González-Navarro CJ, Larrañeta E, Quincoces G, Peñuelas I, et al. Increased oral bioavailability of reverastrol by its encapsulation in casein nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2018;19:2816. <https://doi.org/10.3390/ijms19092816>.
- Joye B, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2014;10:417–27.
- Scasnr RV, van Lier JE. The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. *Eur J Nucl Med*. 1993;20:2286.
- Chan HK, Gonda L. A simple method for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. *Eur J Nucl Med*. 1991;18:860.
- Bhushan B, Khanadeev V, Khebtsov B, Khebtsov N, Gopinath P. Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;246:13–39.
- Tan YL, Ho HK. Navigating albumin-based nanoparticles through various drug delivery routes. *Drug Discov Today*. 2018;23:1108–14.
- Yhee JY, Lee J, Chang H, Lee J, Kwon IC, Kim K. Molecular imaging and targeted drug delivery using albumin-based nanoparticles. *Curr Pharm Des*. 2015;21:1889–98.
- Kouchakzadeh H, Safavi MS, Shojaosadati SA. Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;98:121–43.
- Brotos-Canto A, Gamazo C, Martín-Arbella N, Abdulkarim M, Gumbleton M, Quincoces G, et al. Mannosylated Nanoparticles for oral immunotherapy in a murine model of peanut allergy. *J Pharm Sci*. 2019;108:2421–9.
- Alonso-Sande M, des Rieux A, Fievez V, Sarmento B, Delgado A, Evora C, et al. Development of PLGA-mannosamine nanoparticles as oral protein carriers. *Bio-macromolecules*. 2013;14:4046–52.
- Patel BK, Parikh RH, Patel N. Targeted delivery of mannose-PLGA nanoparticles of antiretroviral drug to brain. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:97–100.
- Banerjee T, Singh AK, Sharma RK, Maitra AN. Labeling efficiency and biodistribution of Technetium-99m labeled nanoparticles: Interference by colloidal tin oxide particles. *Int J Pharm*. 2005;289:189–95.
- Geskovski N, Kuzmanovska S, Simonoska Crcevska M, Galis S, Dimchevska S, Petrusevska M, et al. Comparative biodistribution studies of technetium-99 m radiolabeled amphiphilic nanoparticles using three different reducing agents during the labeling procedure. *J Label Compd Radiopharm*. 2013;56:689–95.
- Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev*. 1998;50:665–82.

Cómo citar este artículo: de Arcocha-Torres M, et al. Preparación, radiomarcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{67}Ga y estudios de biodistribución de nanopartículas de albúmina con recubrimientos poliméricos. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.remn.2020.02.002>



Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular



0 - PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ALBÚMINA HUMANA RECUBIERTAS CON POLÍMEROS RADIOMARCADAS CON GALIO-67

M. de Arcocha-Torres¹, Á. Erhard², A.L. Martínez-López³, I. Martínez-Rodríguez⁴, G. Quincoces², R. Ramos-Membrive², I. Banzo⁴, J.M. Irache³ e I. Peñuelas²

¹Unidad de Radiofarmacia. Servicio de Medicina Nuclear; ²Servicio de Medicina Nuclear. Grupo Imagen Molecular IDIVAL. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. ³Unidad de Radiofarmacia. Servicio de Medicina Nuclear. Clínica Universidad de Navarra. ⁴Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Navarra.

Resumen

Objetivo: Preparación de 4 tipos de nanopartículas de seroalbúmina humana (HSA) estabilizadas con distintos polímeros y modificadas con NOTA (1,4,7-Tricarboximetil-1,4,7-triazaciclono-nano) para radiomarcaje con Galio-67, optimización del marcaje y evaluación in vitro de su estabilidad.

Material y métodos: El NOTA se incorporó mediante conjugación de HSA con p-SCN-Bn-NOTA, purificación mediante PD-10 y generación de las nanopartículas por desolvatación con una mezcla de proteína nativa y modificada con el quelante, ensayando varias proporciones. Se prepararon cuatro tipos de NP por desolvatación con etanol de una solución de HSA en agua. Posteriormente las nanopartículas se recubrieron mediante incubación con cuatro polímeros diferentes: derivado de celulosa (CEL) y tres polímeros conjugados (GM2, GPM2 y GTM2). Para el radiomarcaje se empleó ⁶⁷GaCl (obtenido de citrato de ⁶⁷Ga) incubando 2 mg de NP con 37MBq de ⁶⁷GaCl y acetato sódico 0,2M durante distintos tiempos y temperaturas (tabla). Las NP marcadas se purificaron mediante microconcentradores, se determinó la pureza radioquímica mediante TLC (Whatman 1, HCl 0,05M), tamaño de partícula e índice de polidispersión y se ensayó la estabilidad del radiomarcaje en NaCl 0,9% y plasma humano a 37 °C. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Resultado: El porcentaje de recuperación del conjugado HSA-NOTA fue 42,73 ± 6,6% y la proporción óptima de proteína nativa/modificada 100:3. Los rendimientos de marcaje se muestran en la tabla. La estabilidad del marcaje a las 48h fue superior al 90% en suero y 70-80% en plasma. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

NP	10',TA	30',TA	30',30 °C	30',60 °C
CEL	35,2 ± 6,1%	62,5 ± 2,9%	65,5 ± 4,3%	55,9 ± 3,4%
GTM2	38,1 ± 2,2%	68,2 ± 1,9%	71,6 ± 1,2%	67,3 ± 2,8%
GM2	40,3 ± 3,1%	71,3 ± 1,4%	72,9 ± 2,1%	66,6 ± 1,6%
GPM2	46,4 ± 1,2%	60,4 ± 3,3%	69,2 ± 2,6%	63,6 ± 2,7%

Conclusiones: El procedimiento descrito permite la construcción de NP-HSA recubiertas y modificadas con NOTA, su radiomarcaje con Galio-67 con elevado rendimiento y una estabilidad in vitro adecuada para su utilización en estudios in vivo.

CONFIRMATION OF ACCEPTANCE

To whom it may concern!

Thank you very much for submitting your work for the ESRR 2020.

This is to confirm that that the abstract

"Polymer-coated human serum albumin nanoparticles: preparation, radiolabelling with gallium-67, in vivo and ex vivo biodistribution studies."
submitted by **María De Arcocha-Torres**

for the ESRR'20 - European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, which takes place from May 07-10, 2020 in Verona, was **accepted as Poster Presentation**.

IX. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

Figura 1: Imagen de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ comercial	38
Figura 2: Esquema de desintegración del Molibdeno-99.....	39
Figura 3: Reacción de reducción del $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ empleando como agente reductor el SnCl_2	40
Figura 4. Reacción de formación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reducido hidrolizado.....	41
Figura 5: Estructura química de un radiofármaco de primera generación, segunda generación y tercera generación	43
Figura 6: Estructura química del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-TOC ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -octreótido). 45	
Figura 7: Esquema de marcaje de una molécula con un radiometal mediante el empleo de un quelante bifuncional	55
Figura 8: Estructura química del quelante DTPA	57
Figura 9: Estructuras químicas del quelante DOTA y sus derivados	59
Figura 10: Estructuras químicas del quelante NOTA y sus derivados	60
Figura 11: Estructuras químicas del quelante DFO y sus derivados.....	62
Figura 12: Técnicas de pre-marcaje y post-marcaje de biomoléculas.....	63
Figura 13: Técnicas de Imagen Molecular radiactivas y no radiactivas	65
Figura 14: Gammacámara SPECT/CT Symbia Evo de Siemens ®, Alemania	67
Figura 15: Proceso de aniquilación de un positrón con un electrón. Al producirse la aniquilación la masa del electrón y del positrón se convierten en energía en forma de dos fotones γ de 511 KeV en la misma dirección y sentidos opuestos. La emisión del positrón conlleva además la emisión de un neutrino (ν).....	68

Figura 16: Proceso de aniquilación de un positrón con un electrón y detección en coincidencia. El radiofármaco es administrado al paciente y los fotones γ de aniquilación atraviesan el cuerpo del paciente llegando a los anillos detectores del PET y son detectados en coincidencia. [Adaptado de la web del hospital de Hammersmith (www.hmrlondon.com) y de “A PET’s is not just for Christmas”, disponible en https://tonygood4.wordpress.com/2012/11/04-a-pets-not-just-for-christmas/ , accedido el 28 de noviembre de 2019].....	.69
Figura 17: A la izquierda se muestra un ciclotrón vertical de ión negativo (PET Trace 800, General Electric) y a la derecha un generador PET de germanio-68/galio-68 (GalliaPharm®, Ezkert & Ziegler).....	.70
Figura 18: Escala de tamaño de la nanotecnología. (http://blog.nanomyp.com/diferencias-entre-nanotecnologia-y-biotecnologia).....	.73
Figura 19: Estructura de los nanosistemas más utilizados para la liberación de fármacos.....	.75
Figura 20: Estrategias de marcaje de NPs con radioisótopos. A. Marcaje post-síntesis de la NP directo (arriba) o mediante empleo de BFCA (abajo). B. Incorporación del radioisótopo durante la síntesis de la NP. C. Marcaje mediante el bombardeo con partículas.....	.82
Figura 21: Estructura química del Gantrez AN-119.....	.94
Figura 22: Preparación de NPs de albúmina mediante el método de desolvatación en doble disolvente (etanol/agua).....	.95
Figura 23: Reacción de radiomarcaje con tecnecio-99m de las NPs de albúmina con recubrimiento polimérico98
Figura 24: Cromatógrafo Scan-RAM de Lablogic® empleado para la determinación de la pureza radioquímica de las NPs marcadas99

Figura 25: Preparación y colocación de los animales en el equipo SPECT/CT	101
Figura 26: Reacción de conjugación de la albúmina con el quelante NOTA y posterior purificación con columna de desalinización.....	104
Figura 27: Proceso de conversión del citrato de galio-67 en cloruro de galio-67 empleando un método automatizado	108
Figura 28: Reacción de marcaje con cloruro de galio-67 de las NPs de albúmina modificadas con nota y recubiertas con polímeros	109
Figura 29: Eficiencia de marcaje en función de la concentración de SnCl ₂ empleada en cada una de las formulaciones ensayadas. Los datos se expresan como la media del porcentaje de PRQ (n=3).....	125
Figura 30: Cromatogramas obtenidos en el control de pureza radioquímica de las distintas formulaciones de NPs	126
Figura 31: Influencia del tiempo de incubación en el marcaje de las NPs. Los datos se expresan como la media del porcentaje de PRQ (n=3).....	127
Figura 32: Influencia de la temperatura de incubación en el marcaje de cada una de las formulaciones las NPs. Los datos se expresan como la media del porcentaje de PRQ (n=3).....	128
Figura 33: Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en suero fisiológico 0,9% y plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media ± DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC (n = 3).....	131
Figura 34: Imágenes SPECT/TC tras la administración intravenosa de NPs ^{99m} Tc-GPM2 vs [^{99m} Tc]TcO ₄ en un mismo animal a lo largo del tiempo y cuantificación del porcentaje de dosis inyectada por órgano (n = 3)	133
Figura 35: Porcentaje de dosis inyectada por órgano medida en contador de pozo tras el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como media ± DS (n=3).....	134

Figura 36: Porcentaje de reacción del quelante NOTA a distintos tiempos de incubación.....137

Figura 37: Recta de calibración del quelante NOTA (fila superior) y de la albúmina (fila inferior).....138

Figura 38: Actividad de las distintas fracciones obtenidas tras la extracción del cloruro de galio-67 con HCl 0,1M..... 140

Figura 39: Estabilidad de las NPs modificadas con NOTA y marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9% y plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3). 145

Figura 40: Imágenes SPECT/TC tras la administración intravenosa de NPs ⁶⁷Ga-NOTA-GPM2 vs [⁶⁷Ga]GaCl₃ en un mismo animal a lo largo del tiempo cuantificación del porcentaje de dosis por órgano (n = 3).....147

Figura 41: Porcentaje de dosis inyectada por órgano medida en contador de pozo tras el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como media \pm DS (n=3).....148

Figura 42: Porcentaje de dosis inyectada por órgano medida en contador de pozo tras el sacrificio de los animales. Los datos se expresan como media \pm DS (n=3).....154

Tablas

Tabla 1: Radionucleidos empleados en medicina nuclear y sus principales características.....	34
Tabla 2: Mecanismo de localización de los radiofármacos	36
Tabla 3: Principales moléculas marcadas con zirconio-89, mecanismo de acción y su aplicación clínica	54
Tabla 4: Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina	95
Tabla 5: Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina modificadas con NOTA	106
Tabla 6: Cantidad de HCl y polímero empleados en la preparación de las distintas formulaciones de las NPs de albúmina modificadas con DFO	116
Tabla 7: Características físico-químicas de las NPs de albúmina con recubrimiento polimérico	124
Tabla 8: Características físico-químicas de las NPs tras el marcaje con tecnecio-99m.....	129
Tabla 9: Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en suero fisiológico 0,9%. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC (n = 3).	130
Tabla 10: Estabilidad de las NPs marcadas con tecnecio-99m en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de PRQ medida mediante radio-TLC (n = 3).	130
Tabla 11: Características físico-químicas de las NPs 48 horas después del marcaje con tecnecio-99m.....	132

Tabla 12: Características físico-químicas de las NPs de albúmina modificada con NOTA en una proporción 100:2 albúmina:albúmina modificada.....	139
Tabla 13: Características físico-químicas de las NPs de albúmina modificada con NOTA en una proporción 100:3 albúmina:albúmina modificada.....	139
Tabla 14: Rendimientos de marcaje de las NPs con galio-67 en diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Los resultados se expresan como la media \pm DS (n=3).....	141
Tabla 15: Características físico-químicas de las NPs tras el marcaje con galio-67.....	142
Tabla 16: Estabilidad de las NPs marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9%. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3).....	143
Tabla 17: Estabilidad de las NPs marcadas con galio-67 en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3)	144
Tabla 18: Características físico-químicas de las NPs 48 horas después del marcaje con galio-67.....	146
Tabla 19: Rendimientos de marcaje con galio-67 de las NPs no modificadas con NOTA. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3)	149
Tabla 20: Características físico-químicas de las NPs modificadas con DFO en una proporción 100:3 albúmina:albúmina modificada.....	151
Tabla 21: Rendimientos de marcaje con galio-67 de las NPs de albúmina modificada con DFO a distintas temperaturas de incubación. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3)	151

Tabla 22: Estabilidad de las NPs modificadas con DFO y marcadas con galio-67 en suero fisiológico 0,9%. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3) 152

Tabla 23: Estabilidad de las NPs modificadas con DFO y marcadas con galio-67 en plasma sanguíneo. Los datos se expresan como la media \pm DS del porcentaje de NPs marcadas tras la purificación con filtros Amicon (n = 3) 153

Tabla 24: Tamaño de las Nps modificadas con DFO antes y después de la adición de ácido oxálico 155

Tabla 25: Índice de polidispersión de las Nps modificadas con DFO antes y después de la adición de ácido oxálico..... 156

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Ziessman H.A, O'Malley JP, Thrall JH. Radiopharmaceuticals. In: Nuclear Medicine 4th ed Philadelphia:Elsevier. 2014. p. 1–15.
2. Chain I, Llanes L editors. Radiofármacos. In: Radiofármacos en medicina nuclear Fundamentos y aplicación clínica 1th ed La Plata. 2015. p. 7–11.
3. Perrier AC, Segré E. Some chemical properties of element 43. *J Chem Physiol.* 1937;5:712.
4. Persson RB, Liden K. Tc-Labelled Human Serum Albumin: A study of the labelling procedure. *Int J Appl Radiat Isot.* 1969;20:241–8.
5. Yokoyama A, Kominami G, Harada S, Tanaka H. The role of ascorbic acid with the ferric ion in labelling human serum albumin with ^{99m}Tc . *Int J Appl Radiat Isot.* 1975;26(5):291–9.
6. Lees RS, Garabedian HD, Lees AM, Schumacher DJ, Miller A, Isaacsohn JL, et al. Technetium-99m low density lipoproteins: Preparation and biodistribution. *J Nucl Med.* 1985;26(9):1056–62.
7. Vilcek S, Kalincák M, Machán V. ^{99m}Tc -labelled compounds prepared with sodium dithionite as reducing agent. *Nuklearmedizin.* 1981;20(6):283–9.
8. Holland ME, Heineman WR, Deutsch E. Technetium-99m complexes of dimethylaminomethylene diphosphonate (DMAD). Anion exchange HPLC characterization of $^{99m}\text{Tc}(\text{NaBH}_4)$ -DMAD mixtures. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1989;16(3):301–11.
9. Deutsch E, Libson K, Becker CB, Francis MD, Tofe AJ, Ferguson DL ML. Preparation and Biological Distribution of Technetium Diphosphonate Radiotracers Synthesized Without Stannous Ion. *J Nucl Med.* 1980;21(9):859–66.
10. Kowalsky RJ, Fallen SW. Radiopharmaceutical Chemistry: Technetium agents. In: Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine 3Ed. 2011.

p 214-265

11. Eckelman W, Richards P. Instant ^{99m}Tc -DTPA. *J Nucl Med.* 1970;11(12):761.
12. Spies H, Pietzsch HJ. Stannous chloride in the preparation of ^{99m}Tc pharmaceuticals. In: *Pharmaceuticals, Technetium-99m.* 2007. p. 59–67.
13. Saha GB. Radiopharmaceuticals and General Methods of labelling. In: *Fundamentals of nuclear pharmacy 7^a Ed.* 2018. p. 93–122.
14. Mazzi U, Schibli R, Pietzsch H.J, Künstler JU, Spies H. Technetium in medicine. In: *Technetium-99m pharmaceuticals.* 2007. p. 7–58.
15. Nowotnik DP, Verbruggen Am. Practical and Physicochemical aspects of the preparation og ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceuticals. In: *Textbook of radiopharmacy.* 1999. p. 37–56.
16. Jürgens S, Hermann W, Kühn F. Rhenium and technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances. *J Organomet Chem.* 2014;751:83–9.
17. Ferro-Flores G, de María-Ramírez F, Meléndez-Alafort L, de Murphy CA Pedraza-López M. Molecular recognition and stability of ^{99m}Tc -UBi 29-41 based on experimental and semiempirical results. *Appl Radiat Isot.* 2004;61(6):1261–8.
18. Liu S, Edwards DS. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999;99(9):2235–68.
19. Mendeleev D. *Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Science. Compt Rendus Acad Sci.* 1897;(81):969–71.
20. Engle JW, Lopez-Rodriguez V, Gaspar-Carcamo RE, Valdovinos HF, Valle-Gonzalez M, Trejo-Ballado F, et al. Very high specific activity $^{66/68}\text{Ga}$ from zinc targets for PET. *Appl Radiat Isot.* 2012;70(8):1792–6.

21. Lewis MR, Reichert DE, Laforest R, Margenau WH, Shefer RE, Klinkowstein RE, et al. Production and purification of gallium-66 for preparation of tumor-targeting radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol.* 2002;29(6):701–6.
22. Pandey MK, Byrne JF, Jiang H, Packard AB, DeGrado TR. Cyclotron production of $(68)\text{Ga}$ via the $(68)\text{Zn}(p,n)(68)\text{Ga}$ reaction in aqueous solution. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;4(4):303–10.
23. Velikyan I. ^{68}Ga -based radiopharmaceuticals: Production and application relationship. Vol. 20, *Molecules.* 2015. 12913–12943 p.
24. Adam-Rebeles R, Van den Winkel P, De Vis L. Optimization of production yields, radionuclidic purity and hotcell shielding of SPECT and PET radionuclides produced by proton irradiation in variable energy 30 MeV cyclotrons-Part ^{67}Ga . *Appl Radiat Isot.* 2007;65(9):995–1013.
25. Hupf HB, Beaver JE. Cyclotron production of carrier-free gallium-67. *Int J Appl Radiat Isot.* 1970;21(2):75–6.
26. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev.* 2010;110(5):2858–902.
27. El-Azony KM, Ferieg K, Saleh ZA. Direct separation of ^{67}Ga citrate from zinc and copper target materials by anion exchange. *Appl Radiat Isot.* 2003;59(5–6):329–31.
28. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev.* 1998;50(4):665–82.
29. Bartholomä MD, Louie AS, Valliant JF, Zubieta J. Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: Comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. *Chem Rev.* 2010;110(5):2903–20.

-
30. Vorster M, Buscombe J, Saad Z, Sathekge M. Past and Future of Ga-citrate for Infection and Inflammation Imaging. *Curr Pharm Des.* 2018;24(7):787–94.
 31. Tsai SC, Hsieh TY, Huang PW, Lin WY. Absolute Quantitative Evaluation of ⁶⁷Ga Scintigraphy in Lupus Nephritis. *Clin Nucl Med.* 2016;41(6):442–6.
 32. Bombardieri E, Aktolun C, Baum RP, Bishof-Delaloye A, Buscombe J, Chatal JF, et al. ⁶⁷Ga scintigraphy: Procedure guidelines for tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;30(12).
 33. Boerman OC, Rennen H, Oyen WJG, Corstens FHM. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Semin Nucl Med.* 2001;31(4):286–95.
 34. Weiner RE. The mechanism of ⁶⁷Ga localization in malignant disease. *Nucl Med Biol.* 1996;23(6):745–51.
 35. Green MA, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int J Radiat Appl Instrumentation.* 1989;16(5).
 36. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, Munteanu CR, Cakebread A, Imberti C, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Adv.* 2017;7(78):49586–99.
 37. Carroll V, Demoin DW, Hoffman TJ, Jurisson SS. Inorganic chemistry in nuclear imaging and radiotherapy: Current and future directions. *Radiochim Acta.* 2012;100(8–9):653–67.
 38. Govindan S V., Michel RB, Griffiths GL, Goldenberg DM, Mattes MJ. Deferoxamine as a chelator for ⁶⁷Ga in the preparation of antibody conjugates. *Nucl Med Biol.* 2005;32(5):513–9.
 39. Zhernosekov K, Aschoff P, Filosofov D, Jahn M, Jennewein M, Adrian HJ, et al. Visualisation of a somatostatin receptor-expressing tumour with ⁶⁷Ga-DOTATOC SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005;32(9):1129.
 40. Kaloudi A, Lymperis E, Giarika A, Dalm S, Orlandi F, Barbato D, et al.

- NeoBOMB1, a GRPR-Antagonist for Breast Cancer Theragnostics: First Results of a Preclinical Study with [^{67}Ga]NeoBOMB1 in T-47D Cells and Tumor-Bearing Mice. *Molecules*. 2017;22(11):1–13.
41. Zhang H, Kanduluru AK, Desai P, Ahad A, Carlin S, Tandon N, et al. Synthesis and Evaluation of a Novel ^{64}Cu - and ^{67}Ga -Labeled Neurokinin 1 Receptor Antagonist for in Vivo Targeting of NK1R-Positive Tumor Xenografts. *Bioconjug Chem*. 2018;29(4):1319–26.
42. Sandström K, Haylock AK, Velikyan I, Spiegelberg D, Kareem H, Tolmachev V, et al. Improved tumor-to-organ ratios of a novel ^{67}Ga -human epidermal growth factor radionuclide conjugate with preadministered antiepidermal growth factor receptor affibody molecules. *Cancer Biother Radiopharm*. 2011;26(5):593–601.
43. Müller C, Vlahov IR, Santhapuram HKR, Leamon CP, Schibli R. Tumor targeting using ^{67}Ga -DOTA-Bz-folate - investigations of methods to improve the tissue distribution of radiofolates. *Nucl Med Biol*. 2011;38(5):715–23.
44. Izquierdo-Sánchez V, Muñoz-Hernández S, Vázquez-Becerra H, Pacheco-Yepes J, Romero-Piña ME, Arrieta O, et al. Biodistribution and tumor uptake of ^{67}Ga -nimotuzumab in a malignant pleural mesothelioma xenograft. *Molecules*. 2018;23(12):1–12.
45. Shanehsazzadeh S, Oghabian MA, Lahooti A, Abdollahi M, Abolghasem Haeri S, Amanlou M, et al. Estimated background doses of [^{67}Ga]-DTPA-USPIO in normal Balb/c mice as a potential therapeutic agent for liver and spleen cancers. *Nucl Med Commun*. 2013;34(9):915–25.
46. Van De Watering FCJ, Rijpkema M, Perk L, Brinkmann U, Oyen WJG, Boerman OC. Zirconium-89 labeled antibodies: A new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
47. Larenkov A, Bubenschikov V, Makichyan A, Zhukova M, Krasnoperova A,

- Kodina G. Preparation of zirconium-89 solutions for radiopharmaceutical purposes: Interrelation between formulation, radiochemical purity, stability and biodistribution. *Molecules*. 2019;24(8). pii: E1534.
48. Zhang Y, Hong H, Cai W. PET Tracers Based on Zirconium-89. *Curr Radiopharm*. 2011;4(2):131–9.
49. Kandil SA, Scholten B, Saleh ZA, Youssef AM, Qaim SM, Coenen HH. A comparative study on the separation of radiozirconium via ion-exchange and solvent extraction techniques, with particular reference to the production of ^{88}Zr and ^{89}Zr in proton induced reactions on yttrium. *J Radioanal Nucl Chem*. 2007;274(1):45–52.
50. Tang Y, Li S, Yang Y, Chen W, Wei H, Wang G, et al. A simple and convenient method for production of ^{89}Zr with high purity. *Appl Radiat Isot*. 2016;118(29):326–30.
51. Zweit J, Downey S, Sharma HL. Production of no-carrier-added zirconium-89 for positron emission tomography. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part*. 1991;42(2):199–201.
52. O'Hara MJ, Murray NJ, Carter JC, Morrison SS. Optimized anion exchange column isolation of zirconium-89 (^{89}Zr) from yttrium cyclotron target: Method development and implementation on an automated fluidic platform. *J Chromatogr A*. 2018;1545:48–58.
53. Das SS, Chattopadhyay S, Barua L, Alam MN, Madhusmita, Kumar U. Production and radiochemical separation of a potential immuno-PET imaging agent ^{89}Zr from proton irradiated nat Y target. *J Radioanal Nucl Chem*. 2017;313(3):641–5.
54. Severin GW, Engle JW, Nickles RJ, Barnhart TE. ^{89}Zr Radiochemistry for Positron Emission Tomography. *Med Chem (Los Angeles)*. 2011;7(5):389–94.

-
55. Meijs WE, Herscheid JDM, Haisma HJ, Wijbrandts R, van Langevelde F, Van Leuffen PJ, et al. Production of highly pure no-carrier added ^{89}Zr for the labelling of antibodies with a positron emitter. *Appl Radiat Isot.* 1994;45(12):1143–7.
 56. Kasbollah A, Eu P, Cowell S, Deb P. Review on production of ^{89}Zr in a medical cyclotron for PET radiopharmaceuticals. *J Nucl Med Technol.* 2013;41(1):35–41.
 57. Holland JP, Phil D, Sheh Y LJ. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl Med Biol.* 2009;36(7):729–39.
 58. Abou D.S, Ku T S-JoP. In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nucl Med Biol.* 2011;38:675–81.
 59. Link JM, Krohn KA, Eary JF, Kishore R, Lewellen TK, Johnson MW et al. ^{89}Zr for antibody labelling and positron tomography. *J Label Comp Radiopharm.* 1986;23:1296–7.
 60. Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET Imaging with ^{89}Zr : From Radiochemistry to the Clinic. *Nucl Med Biol.* 2013;40(1):3–14.
 61. Poreddy AR, Schall OF, Osiek TA, Wheatley JR, Beusen DD, Marshall GR, et al. Hydroxamate-based iron chelators: Combinatorial syntheses of desferrioxamine B analogues and evaluation of binding affinities. *J Comb Chem.* 2004;6(2):239–54.
 62. Wei W, Rosenkrans ZT, Liu J, Huang G, Luo Q-Y, Cai W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem Rev.* 2020;acs.chemrev.9b00738.
 63. Zettlitz KA, Tavaré R, Knowles SM, Steward KK, Timmerman JM, Wu AM. ImmunoPET of malignant and normal B cells with ^{89}Zr and ^{124}I -labeled obinutuzumab antibody fragments reveals differential CD20 internalization in vivo. *Clin Cancer Res.* 2017;1(23):7242–52.

-
64. Börjesson PKE, Jauw YWS, Boellaard R, De Bree R, Comans EFI, Roos JC, et al. Performance of immuno - positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006;12(7 I):2133–40.
 65. Nagengast WB, De Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, De Jong JR, Hollema H, et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med.* 2007;48(8):1313–9.
 66. Oosting SF, Brouwers AH, Van Es SC, Nagengast WB, Munnink THO, Lub-De Hooge MN, et al. 89Zr-Bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment. *J Nucl Med.* 2015;56(1):63–9.
 67. Van Asselt SJ, Oosting SF, Brouwers AH, Bongaerts AHH, De Jong JR, Lub-de Hooge MN, et al. Everolimus reduces 89Zr-bevacizumab tumor uptake in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med.* 2014;55(7):1087–92.
 68. Aerts HJWL, Dubois L, Perk L, Vermaelen P, Van Dongen GAMS, Wouters BG, et al. Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J Nucl Med.* 2009;50(1):123–31.
 69. Menke-Van Der Houven Van Oordt CW, Gootjes EC, Huisman MC, Vugts DJ, Roth C, Luik AM, et al. Oncotarget 30384 www.impactjournals.com/oncotarget Zr-cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6(30).
 70. Cohen R, Stammes MA, de Roos IHC, Stigter-van-Walsum M, Visser GWM, van Dongen GAMS. Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. *EJNMMI Res.* 2011;1(1):1–13.
 71. Jauw YWS, Zijlstra JM, De Jong D, Vugts DJ, Zweegman S, Hoekstra OS, et al. Performance of 89Zr-labeled-rituximab-PET as an imaging biomarker to

- assess CD20 targeting: A pilot study in patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma. *PLoS One*. 2017;12(1):1–12.
72. Deahdashti F, Wu N, Bose R, Naughton MJ, Ma CX, Marques-Nostra BV et al. Evaluation of [^{89}Zr]Trastuzumab PET/CT in differentiating HER2-positive from HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(3):523–30.
73. Ulaner GA, Hyman DM, Lyashchenko SK, Lewis JS, Carrasquillo JA, Sloan M, et al. ^{89}Zr -trastuzumab PET/CT for detection of HER2-positive metastases in patient with HER2-negative primary breast cancer. *Clin Nucl Med*. 2017;42(12):912–7.
74. Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Ruan S, Lyashchenko SK, Carrasquillo JA, Heller G, et al. First-in-human imaging with ^{89}Zr -Df-IAB2M Anti-PSMA minibody in patients with metastatic prostate cancer: Pharmacokinetics, biodistribution, dosimetry, and lesion uptake. *J Nucl Med*. 2016;57(12):1858–64.
75. Matsuda M, Ishikawa E, Yamamoto T, Hatano K, Joraku A, Iizumi Y, et al. Potential use of prostate specific membrane antigen (PSMA) for detecting the tumor neovasculature of brain tumors by PET imaging with ^{89}Zr -Df-IAB2M anti-PSMA minibody. *J Neurooncol*. 2018;138(3):581–9.
76. Verel I, Visser GWM, Boellaard R, Walsum MS Van, Snow GB, Van Dongen GA. ^{89}Zr immuno-PET: Comprehensive procedures for the production of ^{89}Zr -labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med*. 2003;44(8):1271–81.
77. Börjesson PKE, Jauw YWS, De Bree R, Roos JC, Castelijns JA, Leemans CR, et al. Radiation dosimetry of ^{89}Zr -labeled chimeric monoclonal antibody U36 as used for immuno-PET in head and neck cancer patients. *J Nucl Med*. 2009;50(11):1828–36.
78. Heskamp S, Van Laarhoven HWM, Molkenboer-Kuening JDM, Franssen GM,

- Versleijen-Jonkers YMH, Oyen WJG, et al. ImmunoSPECT and immunoPET of IGF-1R expression with the radiolabeled antibody R1507 in a triple-negative breast cancer model. *J Nucl Med.* 2010;51(10):1565–72.
79. Stangl S, Tei L, De Rose F, Reder S, Martinelli J, Sievert W, et al. Preclinical evaluation of the Hsp70 peptide tracer TPP-PEg₂₄-DFO[⁸⁹Zr] for tumor-specific PET/CT imaging. *Cancer Res.* 2018;78(21):6268–81.
80. Ruggiero A, Villa CH, Holland JP, Sprinkle SR, May C, Lewis JS, et al. Imaging and treating tumor vasculature with targeted radiolabeled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine.* 2010;5(1):783–802.
81. Lobatto ME, Binderup T, Robson PM, Giesen LFP, Calcagno C, Witjes J, et al. Multimodal Positron Emission Tomography Imaging to Quantify Uptake of ⁸⁹Zr-Labeled Liposomes in the Atherosclerotic Vessel Wall. *Bioconjug Chem.* 2019;
82. Kuda-Wedagedara ANW, Workinger JL, Nexø E, Doyle RP, Viola-Villegas N. ⁸⁹Zr-Cobalamin PET Tracer: Synthesis, cellular uptake, and use for tumor imaging. *ACS Omega.* 2017;2(10):6314–20.
83. Srimathveeravalli G, Abdel-Atti D, Pérez-Medina C, Takaki H, Solomon SB, Mulder WJM, et al. Reversible Electroporation-Mediated Liposomal Doxorubicin Delivery to Tumors Can Be Monitored With ⁸⁹Zr-Labeled Reporter Nanoparticles. *Mol Imaging.* 2018;17:1–9.
84. Zhan Y, Ehlerding, EB, Shi S, Graves SA, Goel S, Engle JW et al. Intrinsically Zirconium-89-Labeled Manganese Oxide Nanoparticles for In Vivo Dual-Modality Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Biomed Nanotechnol.* 2018;14(5):900–9.
85. Natarajan A, Habte F, Gambhir SS. Development of a novel long-lived immunoPET tracer for monitoring lymphoma therapy in a humanized transgenic mouse model. *Bioconjug Chem.* 2012;23(6):1221–9.

-
86. Guleria M, Das T, Kumar C, Amirdhanayagam J, Sarma HD, Banerjee S. Preparation of clinical-scale ^{177}Lu -Rituximab: Optimization of protocols for conjugation, radiolabeling, and freeze-dried kit formulation. *J Label Compd Radiopharm.* 2017;60(5):234–41.
 87. Muylle K, Flamen P, Vugts DJ, Guiot T, Ghanem G, Meuleman N, et al. Tumour targeting and radiation dose of radioimmunotherapy with ^{90}Y -rituximab in CD20+ B-cell lymphoma as predicted by ^{89}Zr -rituximab immuno-PET: impact of preloading with unlabelled rituximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42(8):1304–14.
 88. Brechbiel MW. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;52(2):166–73.
 89. Burke BP, Clemente GS, Archibald SJ. Recent advances in chelator design and labelling methodology for ^{68}Ga radiopharmaceuticals. *J Label Compd Radiopharm.* 2014;57(4):239–43.
 90. Leyva Ramos E, Leyva Ramos S, Cortés García CJ. Bifunctional chelating agents used in the synthesis of radiopharmaceuticals. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2013;44(1):7–23.
 91. Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamani CI. Chelatin agents for the binding of metal ions to macromolecules. *Nature.* 1974;250:587–9.
 92. Safavy A, Smith DC, Bazooband A, Buchsbaum DJ. De novo synthesis of a new diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bifunctional chelating agent. *Bioconjug Chem.* 2002;13(2):317–26.
 93. Pandey U, Gamre N, Lohar SP, Dash A. A systematic study on the utility of CHX-A”-DTPA-NCS and NOTA-NCS as bifunctional chelators for ^{177}Lu radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot.* 2017;127(March):1–6.
 94. Sarko D, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Bifunctional Chelators in the

- Design and Application of Radiopharmaceuticals for Oncological Diseases. *Curr Med Chem.* 2012;19(17):2667–88.
95. Bernhard C, Moreau M, Lhenry D, Goze C, Boschetti F, Rousselin Y, et al. DOTAGA-anhydride: A valuable building block for the preparation of DOTA-like chelating agents. *Chem - A Eur J.* 2012;18(25):7834–41.
96. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, Tavaré R, Koers A. Europe PMC Funders Group Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris (hydroxypyridinone) ligands. *Chem Commun.* 2014;47(25):7068–70.
97. Jamous M, Haberkon U, Mier W. Synthesis of peptide Radiopharmaceuticals for the therapy and diagnosis of tumor diseases. *Molecules.* 2013;18:3379–3409.
98. Eisenwiener KP, Prata MIM, Buschmann I, Zhang HW, Santos AC, Wenger S, et al. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [$^{67/68}\text{Ga}$] and [^{111}In] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors. *Bioconjug Chem.* 2002;13(3):530–41.
99. Spang P, Herrmann C, Roesch F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin Nucl Med.* 2016;46(5):373–94.
100. Bhatt NB, Pandya DN, Wadas TJ. Recent advances in zirconium-89 chelator development. *Molecules.* 2018;23(3).
101. Vugts DJ, Van Dongen GAMS. ^{89}Zr -labeled compounds for PET imaging guided personalized therapy. *Drug Discov Today Technol.* 2011;8(2–4):e53–61.
102. Brandt M, Cardinale J, Aulsebrook ML, Gasser G, Mindt TL. An overview of PET radiochemistry, part 2: Radiometals. *J Nucl Med.* 2018;59(10):1500–6.
103. Deri MA, Ponnala S, Zeglis BM, Pohl G, Dannenberg JJ, Lewis JS, et al. Alternative chelator for ^{89}Zr radiopharmaceuticals: Radiolabeling and

- evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J Med Chem.* 2014;57(11):4849–60.
104. Deri MA, Ponnala S, Kozlowski P, Burton-pye BP, Cicek HT, Hu C, et al. p-SCN-Bn-HOPO: A superior bifunctional chelator for ^{89}Zr immunoPET. *Bioconjug Chem.* 2015;26(12):2579–91.
105. Tinianow JN, Pandya DN, Pailloux SL, Ogasawara A, Vanderbilt AN, Gill HS, et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2,3-HOPO) based macrocyclic chelator for $^{89}\text{Zr}^{4+}$ and its use for immunoPET imaging of HER2 positive model of ovarian carcinoma in mice. *Theranostics.* 2016;6(4):511–21.
106. Cardinale J, Giammei C, Joudini N MT. Bioconjugation methods for radiopharmaceutical chemistry. In: Lewis J, Windhosrt A, Zeglis B (eds) *Radiopharmaceutical Chemistry* Springer. 2019. p. 449–66.
107. Ferda J, Ferdová E, Hes O, Mraček J, Kreuzberg B, Baxa J. PET/MRI: Multiparametric imaging of brain tumors. *Eur J Radiol.* 2017;94:A14–25.
108. Pujara AC, Kim E, Axelrod D, Melsaether AN. PET/MRI in Breast Cancer. *J Magn Reson Imaging.* 2019;49(2):328–42.
109. Chandra R. Instrumentation. In: *Nuclear Medicine Physics: The basics* 7^{ed} Chandra R Ed. 2011. p. 6–16.
110. Manual de usuarios Siemens.
111. Lawson R. Gamma Camara SPECT. In: *Practical SPECT/CT in Nuclear Medicine* Jones DW, Hogg P, Seeram E ed. 2013. p. 47–75.
112. Garcia EV. Physical attributes, limitations, and future potential for PET and SPECT. *J Nucl Cardiol.* 2012;19(SUPPL. 1):19–29.
113. Manual de usuarios General Electric.
114. Manual de usuarios Galliapharm (R).
115. Feynman R. There's plenty room at the bottom. *Eng Sci* 23, 22. 1960;

-
116. Taniguchi N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology'». Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo, , Part II (Japan Society of Precision Engineering). 1974;18–23.
 117. National Nanotechn, National Nanotechnology Initiative. 2016;
 118. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2012;8(2):147–66.
 119. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm.* 2011;8(6):2101–41.
 120. Singh R. Nanotechnology based therapeutic application in cancer diagnosis and therapy. *3 Biotech.* 2019;9(11):1–29.
 121. Ediriwickrema A, Saltzman WM. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS Biomater Sci Eng.* 2015;1(2):64–78.
 122. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med.* 2019;4(3):1–16.
 123. Lechuga LM. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnol Apl a la Salud Humana.* 2010;1:98–112. A
 124. Hill JM, Qi B, Bayaniahangar R, Araban V, Bakhtiary Z, Doschak MR et al. Nanomaterials for bone tissue regeneration: updates and future perspectives. *Nanomedicine (Lond).* 2019;
 125. Arteaga Cabeza O, Mikrogeorgiou A, Kannan S, Ferriero DM. Advanced nanotherapies to promote neuroregeneration in the injured newborn brain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; 148(8):19–37
 126. Marchesan S PM. Nanomaterials for nanomedicine. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4:147–9.

-
127. Zhang J, Tang H, Liu Z, Chen B. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:8483–93.
 128. Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM. 038 Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. 1996;(7):1038–59.
 129. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran Biomed J*. 2016;20(1):1–11.
 130. Hosokam M, Noy K, Naito M, Yokoyama T. *Nanoparticle Technology Handbook*. 2007. 5 p.
 131. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-A review. *Tro J Pharm Res*. 2006;5(1):561–73.
 132. Pecora B, Pecora R, Berri J. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. 2006.
 133. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):1–17.
 134. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337–51. A
 135. Mondragón R, Juliá JE, Barba A, Jarque JC. Preparación y caracterización de nanofluidos: Influencia de variables sobre su estabilidad, estado de aglomeración y propiedades físicas. *Bol la Soc Esp Ceram y Vidr*. 2014;53(3):101–10.
 136. Users manual Zetasizer. Malvern.
 137. Irache JM. Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31(1):7–10.

-
138. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*. 2013;12(11):991–1003.
139. Zhang RX, Wong HL, Xue HY, Eoh JY, Wu WX. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy-strategies and perspectives. *J Control Release*. 2016;28(10):489–503.
140. Yu K, Zhao J, Zhang Z, Gao Y, Zhou Y, Teng L, et al. Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells. *Int J Pharm*. 2016;497(1–2):78–87.
141. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev*. 2012;112(4):2323–38.
142. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng*. 2006;41(12):2699–711.
143. Djurišić AB, Leung YH, Ng AMC, Xu XY, Lee PKH, Degger N, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*. 2015;11(1):26–44.
144. Villafuerte Robles L, García F. B, Garzón S, Hernández L, Vázquez R. Solid lipid nanoparticles | Nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2008;39(1):38–52.
145. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*. 2012;157(2):168–82.
146. De Frates K, Markiewicz T, Gallo P, Rack A, Weyhmiller A, Jarmusik B, et al. Protein polymer-based nanoparticles: Fabrication and medical applications. *Int*

- J Mol Sci. 2018;19(6):1–20.
147. Kratz F. Albumin as a drug carrier: desing of prodrugs, drugs conjugates and nanoparticles. *J Control Release*. 2008;132:171–83.
 148. Mariam J, Sivakami S, Dongre PM. Albumin corona on nanoparticles—a strategic approach in drug delivery. *Drug Deliv*. 2016;23(8):2668–76.
 149. Zong Y, Wu J, Shen K. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(10):17360–72.
 150. Qu N, Sun Y, Li Y, Hao F, Qiu P, Teng L, et al. Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and evaluation. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):1–14.
 151. An FF, Zhang XH. Strategies for preparing albumin-bases nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. *Theranostics*. 2017;23(15):3667–89.
 152. Kudarha RR, Sawant KK. Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches. *Mater Sci Eng C*. 2017;81:607–26.
 153. Jiang Y, Stenzel M. Drug Delivery Vehicles Based on Albumin–Polymer Conjugates. *Macromol Biosci*. 2016;791–802.
 154. Liechty WB. Polymer for Drug Delivery. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2010;1(1):149–73.
 155. Arbós P, Wirth M, Arangoa MA, Gabor F, Irache JM. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. *J Control Release*. 2002;83(3):321–30.
 156. Inchaurreaga L, Martínez-López AL, Cattoz B, Griffiths PC, Wilcox M, Pearson JP et al. The effect of thiamine-coating nanoparticles on their biodistribution

- and fate following oral administration. *Eur J Pharm Sci.* 2019;1(128):81–90.
157. Fahrländer E, Schelhass S, Jacobs AH, Langer K. PEGylated human serum albumin (HSA) nanoparticles: preparation, characterization and quantification of the PEGylation extent. *Nanotechnology.* 2015;26:145103.
158. Brotons-Canto A, Gamazo C, Martíb-Arbella N, Abdulkarim M, Gumbleton M, Quincoces G et al. Mannosylated Nanoparticles for oral immunotherapy in a murine model of peanut allergy. *J Pharm Sci.* 2019;
159. Choi H, Lee YS, Hwang DW, Lee DS. Translational radionanomedicine: A clinical perspective. *Eur J Nanomedicine.* 2016;8(2):71–84.
160. Cutler CS, Hennkens HM, Sisay N, Huclier-Markai S, Jurisson SS. Radiometals for combined imaging and therapy. *Chem Rev.* 2013;113(2):858–83.
161. Isabel Garcia Martín, Jens Frigell, Jordi Llop, Marco Marradi. Radiolabelling of NPs using radiometals: ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{67}Ga , ^{89}Zr and ^{64}Cu . In: *Isotopes in Nanoparticles.* 2016. p. 183–229.
162. Chakravarty R, Goel S, Dash A, Cai W. Radiolabeled inorganic nanoparticles for positron emission tomography imaging of cancer: An overview. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2017;61(2):181–204.
163. Banerjee T, Singh AK, Sharma RK, Maitra AN. Labeling efficiency and biodistribution of Technetium-99m labeled nanoparticles: Interference by colloidal tin oxide particles. *Int J Pharm.* 2005;289(1–2):189–95.
164. Ocampo-García BE, Ramírez F de M, Ferro-Flores G, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, Morales-Avila E, et al. ^{99m}Tc -labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl Med Biol.* 2011;38(1):1–11.
165. Zhao L, Wen S, Zhu M, Li D, Xing Y, Shen M, et al. ^{99m}Tc -labelled multifunctional polyethylenimine-entrapped gold nanoparticles for dual mode

- SPECT and CT imaging. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup1):488–98.
166. Jalilian AR, Panahifar A, Mahmoudi M, Akhlaghi M, Simchi A. Preparation and biological evaluation of [^{67}Ga]-labeled- superparamagnetic nanoparticles in normal rats. *Radiochim Acta.* 2009;97(1):51–6.
167. Hwang DW, Ko HY, Lee JH, Kang H, Ryu SH, Song IC, et al. A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer. *J Nucl Med.* 2010;51(1):98–105.
168. Keliher EJ, Yoo J, Nahrendorf M, Lewis JS, Marinelli B, Newton A, et al. ^{89}Zr -labeled dextran nanoparticles allow in vivo macrophage imaging. *Bioconjug Chem.* 2011;22(12):2383–9.
169. Miller L, Winter G, Baur B, Witulla B, Solbach C, Reske S, et al. Synthesis, characterization, and biodistribution of multiple ^{89}Zr -labeled pore-expanded mesoporous silica nanoparticles for PET. *Nanoscale.* 2014;6(9):4928–35.
170. Joye IJ, McClemens DL. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles; Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2014;Oct(5):417–27.
171. Manual usuario Scan-Ram, Lablogic.
172. Scasnar, R V, Van Lier JE. *European Journal of Nuclear Medicine* The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. 1993;20(3):2286.
173. Chang HK, Gonda I. A simple method for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. *Eur J Nucl Med.* 1991;18:860.
174. Vosjan MJWD, Perk LR, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-

- desferrioxamine. *Nat Protoc.* 2010;
175. Zeglis BM, Lewis JS. The bioconjugation and radiosynthesis of ^{89}Zr -DFO-labeled antibodies. *J Vis Exp.* 2015;(96):1–8.
176. Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. P-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: A new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37(2):250–9.
177. Ashfaq UA, Riaz M, Yasmeen E, Yousaf M. Recent advances in nanoparticle-based targeted drug-delivery systems against cancer and role of tumor microenvironment. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2017;34(4):317–53.
178. Tan YL, Ho HK. Navigatin albumin-based nanoparticles through various drug delivery routes. *Drug Discov Today.* 2018;23(5):1108–14.
179. Bhushan B, Khanadeev V, Khlebtsov B, Khlebtsov N, Gopinath P. Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;246:13–39.
180. Zhang F, Lees E, Amin F, Rivera-Gil P, Yang F, Mulvaney P, et al. Polymer-coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments. *Small.* 2011;7(22):3113–27.
181. Valdeperez D, Wang T, Eußner JP, Weinert B, Hao J, Parak WJ, et al. Polymer-coated nanoparticles: Carrier platforms for hydrophobic water- and air-sensitive metallo-organic compounds. *Pharmacol Res.* 2017;117:261–6.
182. Chung HJ, Kim HJ, Hong ST. Tumor-specific delivery of a paclitaxel-loading HSA-haemin nanoparticle for cancer treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2020;23:102089.
183. Kundranda MN, Niu J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: Clinical development and future directions. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3767–77.

-
184. Tang X, Wang G, Shi R, Jiang K, Meng L, Ren H, et al. Enhanced tolerance and antitumor efficacy by docetaxel-loaded albumin nanoparticles. *Drug Deliv.* 2016;23(8):2686–96.
 185. Jin G, Jin M, Jin Z, Gao Z, Yin X. Docetaxel-loaded PEG-albumin nanoparticles with improved antitumor efficiency against non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(2):871–6.
 186. Luis de Redín I, Boiero C, Martínez-Ohárriz MC, Agüeros M, Ramos R, Peñuelas I, et al. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab. *Int J Pharm.* 2018;541(1–2):214–23.
 187. Alonso-Sande M, des Rieux A, Fievez V, Sarmiento B, Delgado A, Evora C, et al. Development of PLGA-mannosamine nanoparticles as oral protein carriers. *Biomacromolecules.* 2013;14(11):4046–52.
 188. Patel BK, Parikh RH, Patel N. Targeted delivery of mannosylated-PLGA nanoparticles of antiretroviral drug to brain. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:97–100.
 189. Fahrländer E, Schelhaas S, Jacobs AH, Langer K. PEGylated human serum albumin (HSA) nanoparticles: Preparation, characterization and quantification of the PEGylation extent. *Nanotechnology* [Internet]. 2015;26(14):145103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/26/14/145103>
 190. Maiti R, Panigrahi S, Tingjie Y, Meirong H. Bovine serum albumin nanoparticles constructing procedures on anticancer activities. *Int J Adv Res Biol Sci.* 2018;5(4):226–39.
 191. Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, Von Briesen H, Schubert D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm.* 2003;257(1–2):169–80.
 192. Woods A, Patel A, Spina D, Riffo-Vasquez Y, Babin-Morgan A, De Rosales

- RTM, et al. In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery. *J Control Release*. 2015;210:1–9.
193. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505–15.
194. Benito AB, Aiertza MK, Marradi M, Gil-Iceta L, Shekhter Zahavi T, Szczupak B, et al. Functional Single-Chain Polymer Nanoparticles: Targeting and Imaging Pancreatic Tumors in Vivo. *Biomacromolecules*. 2016;17(10):3213–21.
195. Quincoces G, Larrañeta E, Vigil C, Dávila MJ, Ecay M, Vidal A, et al. Radiomarcaje de nanopartículas gras con galio-67 mediante transquelación citrato-NOTA y estudios de biodistribución en rata tras administración oral. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2013;32(S1):38.
196. Locatelli E, Gil L, Israel LL, Passoni L, Naddaka M, Pucci A, et al. Biocompatible nanocomposite for PET/MRI hybrid imaging. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:6021–33.
197. Morcillo MÁ, De Lucas ÁG, Oteo M, Romero E, Magro N, Ibáñez M, et al. MT1-MMP as a PET Imaging Biomarker for Pancreas Cancer Management. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018;2018.
198. Geskovski N, Kuzmanovska S, Simonoska Crcarevska M, Calis S, Dimchevska S, Petrussevska M, et al. Comparative biodistribution studies of technetium-99m radiolabeled amphiphilic nanoparticles using three different reducing agents during the labeling procedure. *J Label Compd Radiopharm*. 2013;56(14):689–95.
199. Areses P, Agüeros MT, Quincoces G, Collantes M, Richter JÁ, López-Sánchez LM, et al. Molecular imaging techniques to study the biodistribution of orally administered 99mTc-labelled naive and ligand-tagged nanoparticles. *Mol Imaging Biol*. 2011;13(6):1215–23.

-
200. Frigell J, García I, Gómez-Vallejo V, Llop J, Penadés S. ⁶⁸Ga-labeled gold glyconanoparticles for exploring blood-brain barrier permeability: Preparation, biodistribution studies, and improved brain uptake via neuropeptide conjugation. *J Am Chem Soc.* 2014;136(1):449–57.
201. Llop J, Jiang P, Marradi M, Gómez-Vallejo V, Echeverría M, Yu S et al. Visualising dual radiolabelled poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle degradation in vivo using energy-discriminant SPECT. *J Mater Chem B.* 2013;3:6293–300.
202. Kiratli PO, Aksoy T, Bozkurt MF, Orhan D. Detection of ectopic gastric mucosa using ^{99m}Tc pertechnetate: Review of the literature. *Ann Nucl Med.* 2009;23(2):97–105.
203. Ahn BC. Sodium iodide symporter for nuclear molecular imaging and gene therapy: From bedside to bench and back. *Theranostics.* 2012;2(4):392–402.
204. Ziessman H.A, O'Malley JP, Thrall JH. Gastrointestinal system. In: *Nuclear Medicine The requisites* 4Ed. 2014. p. 288–321.
205. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release.* 2016;240:332–48.
206. Colino CI, Lanao JM, Gutierrez-Millan C. Targeting of Hepatic Macrophages by Therapeutic Nanoparticles. *Front Immunol.* 2020;11(March):218.
207. Ritt P, Vija H, Hornegger J, Kuwert T. Absolute quantification in SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011;38(SUPPL. 1).