



Universidad
de Navarra

TESIS DOCTORAL

Radiomarcaje y biodistribución mediante SPECT-CT de nanopartículas de seroalbúmina humana con bevacizumab

ROCÍO RAMOS MEMBRIVE

Pamplona, 2020



Universidad
de Navarra

Facultad de Medicina

Memoria presentada por Dña. Rocío Ramos Membrive para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

Fdo. Rocío Ramos Membrive

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Radiofarmacia del Servicio de Medicina Nuclear de la Clínica Universidad de Navarra y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Director: Dr. Iván Peñuelas Sánchez Co-Directora: Dra. Gemma Quincoces Fernández

*“Caminante son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar.”*

Antonio Machado

AGRADECIMIENTOS

Un día, como cualquier otro de los que he pasado escribiendo esta memoria, caí en la cuenta que esta etapa se estaba acabando; y es que aun siendo obvio que llegaría porque en esta vida todo llega y todo pasa, no puedo evitar sorprenderme al descubrirme a mí misma a punto de alcanzar lo que, en más de una ocasión, llegó a parecerme una meta infranqueable. Gracias Dios mío, por la oportunidad que me has brindado con este proyecto, por permitirme acabarlo y por poner a tantas personas excepcionales en mi camino que me han ofrecido lo mejor de sí mismas. Por tantas cosas como he recibido de vosotros, quiero daros mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Iván Peñuelas, Director de esta Tesis Doctoral, por transmitirme su pasión por la investigación y su curiosidad por todo lo que le rodea. Me has enseñado el valor del trabajo minucioso y del pensamiento crítico. Has apoyado mis iniciativas y has puesto a mi alcance todos los medios necesarios para llevarlas a cabo. Gracias por cada crítica que me has hecho, porque ninguna ha sido estéril.

A la Dra. Gemma Quincoces, co-directora de esta Tesis Doctoral, por inculcarme su buen hacer y ese espíritu joven y de trabajadora incansable que la caracteriza. Gracias por las horas de laboratorio que hemos compartido, por la paciencia que me has tenido y por el esfuerzo que has hecho, especialmente en las circunstancias tan singulares que estamos viviendo a día de hoy.

De vosotros he aprendido todo lo que sé sobre la radiofarmacia y con ello me he desarrollado no sólo a nivel profesional sino también personal. Para mí sois referente como especialistas, como docentes y como investigadores, pero sobre todo como personas.

A la Dra. María Collantes y a la Dra. Elena Prieto por vuestra disponibilidad a la hora de ayudarme a interpretar resultados y por enseñarme todo lo que sé del manejo del Pmod. Trabajar con vosotras siempre me ha ayudado a ponerlo todo en perspectiva.

A Margarita Ecay, de la Unidad de Investigación MicroPET, por las numerosas horas que me has dedicado (noches, fines de semana, ...); para mí eres un ejemplo de compañerismo y de trabajo bien hecho.

A todo el equipo del Servicio de Medicina Nuclear, pero muy especialmente a mis compañeros de crimen, el Dr. Guillén y la Dra. Morán. La vida nos ha permitido recorrer muchos caminos juntos (la residencia, la puesta en marcha de CUN Madrid y ahora la finalización del doctorado) y en todos ellos me habéis aportado mucho. Para mí es un honor poder compartir mis días con vosotros y que nos hayamos convertido en una familia, dentro y fuera del ámbito profesional.

Gracias a Clara Pinilla por su inestimable colaboración en el trabajo gráfico de esta memoria. Tu optimismo y las múltiples anécdotas que hemos cosechado durante este último año han sido para mí un regalo, sin el que se me habría mucho más duro este último empujón.

Al personal del Departamento de Tecnología y Química Farmacéutica de la Universidad de Navarra, especialmente al Dr. Juan Manuel Irache y la Dra. Inés Luis de Redín, por brindarme toda la ayuda necesaria.

A todos mis amigos, por las “cañitas fresquitas” que habéis compartido conmigo durante este periodo (y que tan bien me han venido). Quiero dar especialmente las gracias a Teresa Fernández Carpintero, a Marta Rúa, a Débora Martínez, a Marta Ivars, a Jorge Arenas y a Leticia Soria; con vosotros la cerveza sabe mejor y la vida simplemente es más bonita.

A Natalia Lázaro, no me cansaré de darle las gracias por animarme a embarcarme en la aventura de opositar al QIR, que se convirtió en principio de una vida maravillosa y el descubrimiento de una pasión: la radioquímica.

Gracias a mi familia, lo más importante de mi vida, por su apoyo incondicional y toda la ayuda que me ha brindado en estos 5 años.

A mi madre, Pura, mi referente. Para mí eres un ejemplo de coraje, de pasión, y de entrega. Me has enseñado a no conformarme y a trabajar duro para alcanzar cada una de las metas que me he propuesto. Gracias por estar siempre al pie de cañón y con una palabra de aliento, incluso cuando ni yo misma sabía que te iba a necesitar.

A mi hija, Gema, por ser mi alegría y mi fuerza; me has dado el impulso que necesitaba para acabar esta etapa; tu llegada revolucionó mi vida y la casa, pero sobretodo ordenó mis prioridades.

Por último, quiero darle las gracias a la persona que ha vivido cada día de este proyecto conmigo, a mi marido, Pablo. Aunque sea mi nombre el que aparece en la portada, esta Tesis es un éxito compartido, y es que los González-Ramos somos un equipazo (o ¿no?). Esto es una realidad por la generosidad que te caracteriza; has puesto el 50 % del esfuerzo, el sacrificio y el entusiasmo que han sido necesarios para realizarla. Gracias por tu fe inquebrantable en mí, por soñar cada proyecto conmigo y por darme alas para volar alto. Hay gente que suma, pero tú, sin duda multiplicas.

A Pablo y Gema, los motores de mi vida

A mi madre, mi modelo

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	25
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	31
1. ANTICUERPOS.....	32
1.1 INMUNOTERAPIA: ANTICUERPOS MONOCLONALES	34
1.1.1 <i>Bevacizumab</i>	36
2. LA BIOIMAGEN.....	36
2.1 APLICACIONES DE LA IMAGEN MOLECULAR CON ISÓTOPOS RADIATIVOS.....	39
2.1.1 <i>Herramienta en el desarrollo de fármacos</i>	39
2.1.2 <i>Herramienta de diagnóstico clínico</i>	41
2.1.2.1. Radiofármacos marcados con tecnecio-99m.....	41
3. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA.....	48
3.1 NANOPARTÍCULAS	48
3.1.1 <i>Mecanismos de acción de las nanopartículas</i>	50
3.1.2 <i>Tipos de nanopartícula</i>	51
3.2 NANOTERAGNÓISIS.....	53
3.2.1 <i>Marcaje radiactivo de nanopartículas</i>	54
4. BIBLIOGRAFÍA.....	56
II. OBJETIVOS.....	73
1. OBJETIVOS.....	74
1.1 <i>OBJETIVOS SECUNDARIOS</i>	74
III. MATERIALES, ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, EQUIPAMIENTO Y PROGRAMAS DE ANÁLISIS.....	79
1. MATERIALES.....	80
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	81
3. EQUIPAMIENTO Y PROGRAMAS DE ANÁLISIS	81

IV. EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES COMO POSIBLE VEHÍCULO PARA LA ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO	87
1. INTRODUCCIÓN	88
2. OBJETIVOS.....	91
3. METODOLOGÍA	91
3.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS: POSIBLE VEHÍCULO PARA LIBERACIÓN DEL BEVACIZUMAB.....	91
3.1.1 <i>Nanopartículas de HSA recubiertas con Gantrez</i>	<i>91</i>
3.1.2 <i>Nanopartículas de HSA recubiertas con PEG-350000.....</i>	<i>92</i>
3.1.3 <i>Nanopartículas de HSA recubiertas con Glutaraldehído</i>	<i>93</i>
3.2 DESARROLLO DE UN SISTEMA TIPO “KIT” PARA EL RADIOMARCAJE DIRECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	94
3.2.1 <i>Optimización de la concentración de la especie reductora, preparación del equipo reactivo de las nanopartículas y radiomarcaje.</i>	<i>94</i>
3.2.2 <i>Determinación de la pureza radioquímica de los equipos reactivos radiomarcados ..</i>	<i>95</i>
3.3 DESARROLLO DE UN SISTEMA TIPO “KIT” PARA EL RADIOMARCAJE DIRECTO DEL HSA CON TECNECIO-99M.....	97
3.3.1 <i>Optimización de las condiciones de marcaje y preparación de un equipo reactivo</i>	<i>97</i>
3.3.2 <i>Radiomarcaje de los equipos reactivos y control de calidad.</i>	<i>97</i>
3.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i>	98
4. RESULTADOS	100
4.1 PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS.....	100
4.2 DESARROLLO DEL SISTEMA TIPO “KIT”.....	101
4.2.1 <i>Radiomarcaje y determinación de la pureza radioquímica de los equipos reactivos de nanopartículas</i>	<i>101</i>
4.2.2 <i>Radiomarcaje y determinación de la pureza radioquímica del equipo reactivo de HSA101</i>	<i>101</i>
4.3 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i>	102
5. DISCUSIÓN	105
6. BIBLIOGRAFÍA	110

V. ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO: EVALUACIÓN DEL NANOSISTEMA	
121	
1. INTRODUCCIÓN	122
2. OBJETIVOS	124
3. METODOLOGÍA	124
3.1 NANOENCAPSULACIÓN DEL BEVACIZUMAB	124
3.1.1 <i>Estabilización de las nanopartículas de HSA con bevacizumab</i>	125
3.2 DESARROLLO DEL SISTEMA TIPO “KIT” PARA EL RADIOMARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	125
3.2.1 <i>Estudio de optimización de la especie reductora del sistema tipo “kit”</i>	125
3.2.2 <i>Efecto de la preparación y radiomarcaje del sistema tipo “kit” sobre la calidad de las formulaciones</i>	126
3.3 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS EQUIPOS REACTIVOS	128
3.3.1 <i>Calidad del radiomarcaje</i>	129
3.3.2 <i>Calidad de la nanopartícula</i>	129
3.3.3 <i>Análisis de los datos</i>	130
3.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i> EN ANIMALES.....	130
4. RESULTADOS	132
4.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE HSA CON BEVACIZUMAB	132
4.2 DESARROLLO DEL SISTEMA TIPO “KIT” PARA EL RADIOMARCAJE DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	133
4.2.1 <i>Estudio de optimización de la cantidad de especie reductora de los equipos reactivos</i> .133	
4.2.2 <i>Efecto de la preparación y radiomarcaje del sistema tipo “kit” sobre la calidad de las formulaciones</i>	134
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CADUCIDAD DE LOS EQUIPOS REACTIVOS.....	134
4.3.1 <i>Calidad del radiomarcaje</i>	134
4.3.2 <i>Calidad de la nanopartícula</i>	136
4.4 ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i> EN ANIMALES.....	137
5. DISCUSIÓN	141

6. BIBLIOGRAFÍA	147
VI. RADIOMARCAJE DEL BEVACIZUMAB CON TECNECIO-99M	157
1. INTRODUCCIÓN	158
2. OBJETIVOS	160
3. METODOLOGÍA	161
3.1 PURIFICACIÓN DE EXCIPIENTES DEL BEVACIZUMAB Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.....	161
3.2 ACTIVACIÓN DEL BEVACIZUMAB.....	162
3.2.1 <i>Concentración y reducción parcial del bevacizumab</i>	162
3.3 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA QUÍMICA DEL BEVACIZUMAB-PE Y EL BEVACIZUMAB-R	163
3.4 MARCAJE DEL BEVACIZUMAB REDUCIDO MEDIADO POR LIGANDO	164
3.5 RADIOMARCAJE DEL ANTICUERPO EMPLEANDO CARBONILOCOMPLEJOS DE ^{99m} Tc(I).	166
3.6 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA QUÍMICA Y RADIOQUÍMICA DE [^{99m} Tc]Tc-BEVACIZUMAB-L Y [^{99m} Tc]Tc(CO) ₃ -BEVACIZUMAB	167
3.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL [^{99m} Tc]Tc-BEVACIZUMAB-L Y [^{99m} Tc]Tc(CO) ₃ -BEVACIZUMAB.....	168
3.7.1 <i>Métodos cromatográficos</i>	169
3.7.1.2. Evaluación del radiomarcage con carbonilocomplejos de ^{99m} Tc(I).....	169
3.7.2 <i>Análisis de los datos</i>	170
3.8 CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO TRAS EL RADIOMARCAJE.....	170
3.8.1 <i>Evaluación del peso molecular del bevacizumab tras su radiomarcage con tecnecio-99m.</i>	170
3.8.2 <i>Determinación de la actividad biológica</i>	172
4. RESULTADOS	173
4.1 PURIFICACIÓN DE EXCIPIENTES DEL BEVACIZUMAB Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.....	173

4.2	DETERMINACIÓN DE LA PUREZA QUÍMICA DEL BEVACIZUMAB-PE Y EL BEVACIZUMAB-R	174
4.3	DETERMINACIÓN DE LA PUREZA QUÍMICA Y RADIOQUÍMICA DEL $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -BEVACIZUMAB-L Y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -BEVACIZUMAB.....	176
4.3.1	<i>Marcaje mediado por ligandos</i>	176
4.3.2	<i>Marcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(I)$</i>	178
4.4	ESTUDIO DE ESTABILIDAD $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -BEVACIZUMAB-L Y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -BEVACIZUMAB.....	180
4.4.1	<i>Determinación de la temperatura de conservación del anticuerpo marcado</i>	180
4.4.2	<i>Incubación del anticuerpo radiomarcado en medio competitivo</i>	181
4.4.3	<i>Incubación del anticuerpo radiomarcado en plasma</i>	182
4.5	CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO TRAS EL RADIOMARCAJE.....	183
4.5.1	<i>Peso molecular del anticuerpo radiomarcado</i>	183
4.5.2	<i>Actividad biológica del anticuerpo radiomarcado</i>	185
5.	DISCUSIÓN	186
6.	BIBLIOGRAFÍA	190
VII. ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO RADIOMARCADO:		
CARACTERIZACIÓN DEL NANOSISTEMA Y EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>. ..201		
1.	INTRODUCCIÓN	202
2.	OBJETIVOS	204
3.	METODOLOGÍA	204
3.1	PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS	204
3.1.1	<i>Nanopartículas de HSA recubiertas con PEG</i>	204
3.1.2	<i>Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab y recubiertas con PEG</i>	205
3.2	RADIOMARCAJE DIRECTO CON TECNECIO-99M DE LAS FORMULACIONES NP-HSA-PEG Y NP-HSA-B-PEG.....	205
3.3	RADIOMARCAJE Y ENCAPSULACIÓN DEL BEVACIZUMAB	206
3.3.1	<i>Purificación de excipientes del bevacizumab, cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS y análisis de la pureza química.</i>	206

3.3.2	<i>Preparación del precursor y control de calidad.</i>	207
3.3.3	<i>Radiomarcaje del bevacizumab y control de calidad.</i>	209
3.3.4	<i>Encapsulación del anticuerpo y control de calidad de la formulación</i>	210
3.4	ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN	210
3.4.1	<i>Análisis estadístico</i>	214
4.	RESULTADOS	214
4.1	PREPARACIÓN Y RADIOMARCAJE DE LAS FORMULACIONES NP-HSA-PEG Y NP-HSA-B-PEG.	214
4.2	RADIOMARCAJE Y ENCAPSULACIÓN DEL BEVACIZUMAB	216
4.2.1	<i>Purificación de excipientes, cuantificación del anticuerpo purificado y análisis de la pureza química.</i>	216
4.2.2	<i>Preparación del precursor y control de calidad.</i>	216
4.2.3	<i>Radiomarcaje del bevacizumab y control de calidad</i>	218
4.2.4	<i>Encapsulación del anticuerpo radiomarcado</i>	219
4.3	ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN	220
5.	DISCUSIÓN	225
6.	BIBLIOGRAFÍA	230
VIII.	CONCLUSIONES	241
IX.	ANEXOS	247
	ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS:	248
	COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS A CONGRESOS DERIVADOS DE ESTA TESIS:	250
X.	ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS, GRÁFICAS Y ECUACIONES	255
1.	FIGURAS	256
CAPÍTULO I		256
CAPÍTULO IV		257
CAPÍTULO V		259
CAPÍTULO VI		259
CAPÍTULO VII		262

2. TABLAS.....	263
CAPÍTULO I.....	263
CAPÍTULO IV.....	263
CAPÍTULO V.....	264
CAPÍTULO VI.....	264
CAPÍTULO VI.....	265
3. GRÁFICAS.....	267
CAPÍTULO V.....	267
CAPÍTULO VI.....	267
CAPÍTULO VII.....	267
4. ECUACIONES.....	265
CAPÍTULO V.....	265
CAPÍTULO VI.....	266
CAPÍTULO VII.....	266

ABREVIATURAS

% ESR: Eliminación de la Suspensión Radiomarcada

% PRQ: Porcentaje de Pureza Radioquímica

% PQ: Porcentaje de Pureza Química

⁹⁹Mo/^{99m}Tc: Generador Molibdeno-Tecnecio

t_{1/2}: Tiempo de vida media de un isótopo

[^{99m}Tc]Tc-Bevacizumab-L: bevacizumab marcado con tecnecio-99m empleando un ligando de transferencia.

[^{99m}Tc]Tc-DPD: Etidronato de tecnecio (^{99m}Tc).

[^{99m}Tc]Tc-HDP: Oxidronato de tecnecio (^{99m}Tc).

[^{99m}Tc]Tc-L: Ligando de transferencia radiomarcado con tecnecio-99m.

[^{99m}Tc]Tc-PYP: Pirofosfato de tecnecio (^{99m}Tc).

Ac: Anticuerpo

An: Antígeno

CT: Tomografía Computarizada

DAD: Diodos en línea

DTPA: Ácido dietiltri Aminopentaacético

EPR: Efecto de Permeabilidad y Retención aumentada

FcRn: Receptor Fc neonatal

Gantrez ES-425: Copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico

GLU: Glutaraldehído

HIS: Histidina

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

HSA: Albúmina sérica humana

Ig: Inmunoglobulina

I.v: intravenoso

KDa: Kilodaltons

L: Ligando

L_{transferencia}: Ligando de transferencia

NAB: *Nanoparticle Albumin Bound*

NIS: Transportador de Na/I

NP: Nanopartícula

NP-HSA: Nanopartícula de HSA

NP-HSA-B: Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab

NP-HSA-B-GLU: Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab y recubiertas con glutaraldehído

NP-HSA-B-PEG: Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab y recubiertas con polietilenglicol

NP-HSA-Gantrez: Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab y recubiertas con gantrez

NP-HSA-GLU: Nanopartículas de HSA recubiertas con glutaraldehído

NP-HSA-PEG: Nanopartículas de HSA recubiertas con polietilenglicol

mAb: Anticuerpo monoclonal

MBq: Megabequerelios

PDI: Índice de Polidispersión

PEG: Polietilenglicol

PQ: Pureza química

Radio-SEC-HPLC: Radiocromatografía de exclusión molecular de alta eficacia

PRQ: Pureza radioquímica

Rf: Factor de Retardo

Radio-TLC: Radiocromatografía en capa fina

RIF: Radioinmunofármacos

RF: Radiofármaco

SEC: Cromatografía de exclusión molecular

SPECT: Tomografía por emisión de fotón único

TC: Tomografía computarizada

TP: Tamaño de partícula

UV: Ultravioleta

VEGF: Factor de crecimiento endotelial

VIS: Visible

VOI: Volumen de interés

VTP: Variación del tamaño de partícula.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En este capítulo se introduce de forma breve la radiofarmacia, la imagen molecular como herramienta diagnóstica y la nanotecnología.

1. ANTICUERPOS

Los **anticuerpos (Ac)** son glicoproteínas que pertenecen a la superfamilia de las **inmunoglobulinas (Igs)**. Forman parte de la respuesta humoral del sistema inmune, protegiendo al organismo frente a bacterias, virus y parásitos; se secretan, en las células B maduras y las células plasmáticas, en respuesta a un estímulo antigénico [1,2].

La estructura básica de las Igs consiste en cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas ligeras (25 KDa) y dos cadenas pesadas (50 KDa) conectadas entre sí mediante puentes disulfuro (Figura I. 1).

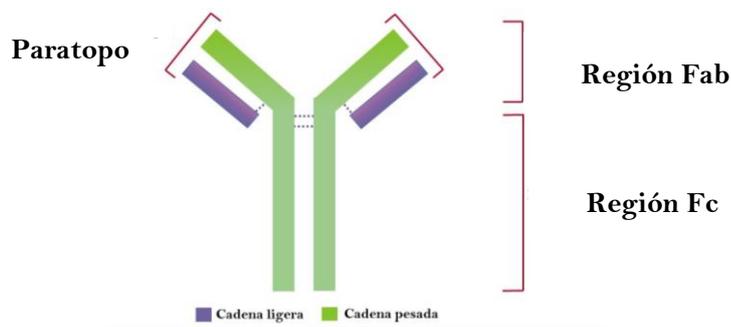


Figura I. 1. Representación de un monómero de Ig

Desde el punto de vista funcional cada monómero de las Igs consta de dos regiones: la región Fab (encargada del reconocimiento y la unión con el antígeno (Ag)), y la

región Fc (involucrada en el periodo de circulación en sangre) [3]. El reconocimiento y la unión entre Ac-Ag, comúnmente, tienen lugar entre el paratopo (lugar de reconocimiento y unión del antígeno) y el epítipo (lugar del antígeno que se une al paratopo).

El ser humano tiene de forma “natural” cinco tipos de Igs (Tabla I. 1); cada una de ellas tiene varios subtipos, que se distinguen entre sí por las diferencias estructurales en las regiones Fc [4]. De los cinco tipos de Igs, las de tipo G son las más abundantes (70 - 80 % de las Ig) y las que mayor potencial terapéutico presentan.

 <p>Inmunoglobulina tipo G</p>	<p>Isotipo predominante en sangre; tiene mayor tiempo de circulación en suero sanguíneo. Se encarga de la neutralización de antígenos, la activación del complemento para eliminar los patógenos opsonizados y participa en la respuesta inmunitaria secundaria.</p>
 <p>Inmunoglobulina tipo M</p>	<p>Asociada a la respuesta inmune primaria y participa en los procesos inmunoregulatorios. Sirve como biomarcador para diagnosticar la exposición a un patógeno. Se encarga de la opsonización de antígeno y de fijar el complemento.</p>
 <p>Inmunoglobulina tipo E</p>	<p>Es la inmunoglobulina con menor vida media. Se asocia con las reacciones alérgicas y la hipersensibilidad. Constituye una línea de defensa directa contra parásitos.</p>
 <p>Inmunoglobulina tipo A</p>	<p>Se presenta en mucosas y secreciones. Se localiza en las barreras primarias del sistema inmunológico. Protege frente a toxinas, virus y bacterias por neutralización directa o impidiendo que se unan a la superficie de la misma.</p>
 <p>Inmunoglobulina tipo D</p>	<p>Es la inmunoglobulina que menor concentración en suero presenta. Está involucrada en la activación de las células B por parte de un antígeno.</p>

Tabla I. 1. Características y funciones de las inmunoglobulinas. Información obtenida del artículo de Schroeder y Cavacini [4].

1.1 Inmunoterapia: anticuerpos monoclonales

La **inmunoterapia** puede definirse como el tratamiento de enfermedades mediante la potenciación de los mecanismos inmunitarios (ej. Solo o como tratamiento concomitante para el cáncer), o por el contrario de su debilitamiento (ej. inmunoterapia con extractos de alérgenos) [5,6].

La inmunoterapia basada en la potenciación de los mecanismos de defensa ha sido clasificada clásicamente [7] como pasiva (efectiva generando respuesta inmunológica frente al Ag) o activa (estimula el sistema inmunológico para atracar al Ag).

Un Ag puede presentar distintos epítomos, estimulando la producción de diferentes poblaciones de Ac que reconozcan de forma específica uno de ellos; al conjunto de estas poblaciones se denominan anticuerpos policlonales y se producen en distintos linajes de células B [8]. Por el contrario, los **anticuerpos monoclonales (mAb)** son específicos para un solo epítipo y están producidos por un único clon celular mediante métodos *in vitro* (Figura I. 2); comúnmente se generan por hibridomas procedentes de la fusión de un plasmocitoma no secretor y un linfocito B [9]. Los anticuerpos policlonales y monoclonales son considerados inmunoterapéuticos pasivos [10].

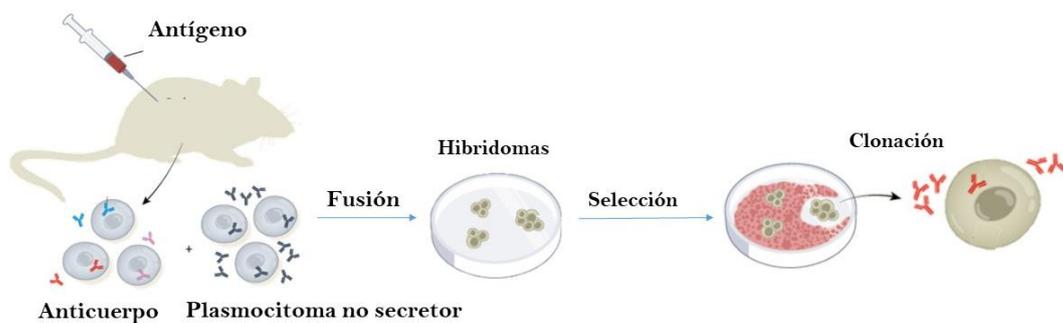


Figura I. 2. Resumen de la obtención de mAbs mediante la tecnología del hibridoma. Adaptación de la imagen de la referencia [11].

Por su especificidad antigénica permiten obtener reacciones Ac-Ag homogéneas y reproducibles. Se emplean con tres finalidades terapéuticas [12]:

- Estimulación de la respuesta inmune del huésped.
- Interferencia del crecimiento y diferenciación de las células antigénicas mediante bloqueo de factores de crecimiento y sus receptores.
- Formación de inmunocombinados que aumente la eficacia terapéutica mediante la unión de un citotóxico o un radioisótopo.

La **inmunogenicidad** se define como la capacidad de una sustancia para desencadenar una respuesta inmune celular adaptativa y celular humoral (que conduce a la memoria inmunológica) [13,14]. Todas las proteínas terapéuticas, entre las que se incluyen los mAb, presentan un potencial inmunogénico, pudiendo desencadenar una respuesta de este tipo; cómo resultado se produce una disminución de la biodisponibilidad del fármaco y se puede comprometer la eficacia, e incluso, la seguridad del tratamiento [15].

Los mAb de origen murino han demostrado tener un elevado potencial inmunogénico. Las aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante permite humanizar los mAb y disminuir su potencial inmunogénico (Figura I. 3).

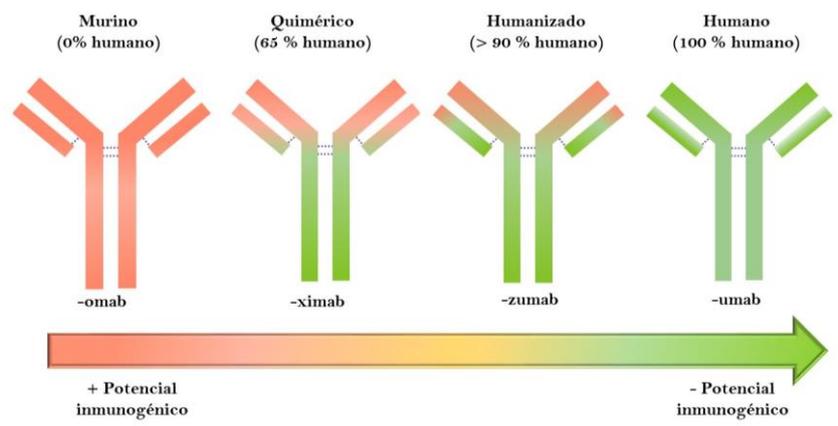


Figura I. 3. Representación de la humanización de los mAb y de su potencial inmunogénico.

1.1.1 Bevacizumab

El **factor de crecimiento endotelial vascular** (VEGF) es un regulador esencial para la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente (procesos angiogénicos) con carácter fisiológico [16]. Además de participar en distintos procesos fisiológicos, la angiogénesis también se presenta en desarrollos patológicos como el cáncer. La sobrexpresión del VEGF en procesos cancerígenos está relacionada con los procesos de crecimiento y diseminación tumoral [17].

El **bevacizumab** es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une de forma selectiva a todas las isoformas de la proteína del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), impidiendo la unión con el receptor e inhibiendo el proceso de angiogénesis [18,19]. Su uso está indicado [20], en combinación con quimioterápicos, para el tratamiento de determinados tipos de tumores. Asimismo, en la práctica clínica también se emplea fuera de ficha técnica para el tratamiento de enfermedades en las que el VEGF está significativamente aumentado, tales como la telangiectasia hereditaria hemorrágica [21], diversos tipos de retinopatías [22–24], la neovascularización corneal [25] o el glaucoma [26].

2. LA BIOIMAGEN

El término **bioimagen** engloba a todo método que permite visualizar un proceso biológico de un organismo vivo [27]. Este tipo de técnicas han revolucionado la forma en la que se entienden, se detectan y se tratan los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, porque son capaces de proporcionar una gran cantidad de información biológica, de una forma rápida, precisa y no invasiva. Las técnicas de bioimagen pueden agruparse en función del tipo de onda que utilizan para la visualización (onda acústica o electromagnética), la resolución espacial que tienen (macroscópica, mesoscópica o microscópica) y la información que se puede obtener de ellas (anatómica, fisiológica, celular o molecular) [28]. No obstante, la mayoría de las técnicas de bioimagen

emplean radiación electromagnética como principio físico (Figura I. 4), siendo las otras dos variables las que las definen.

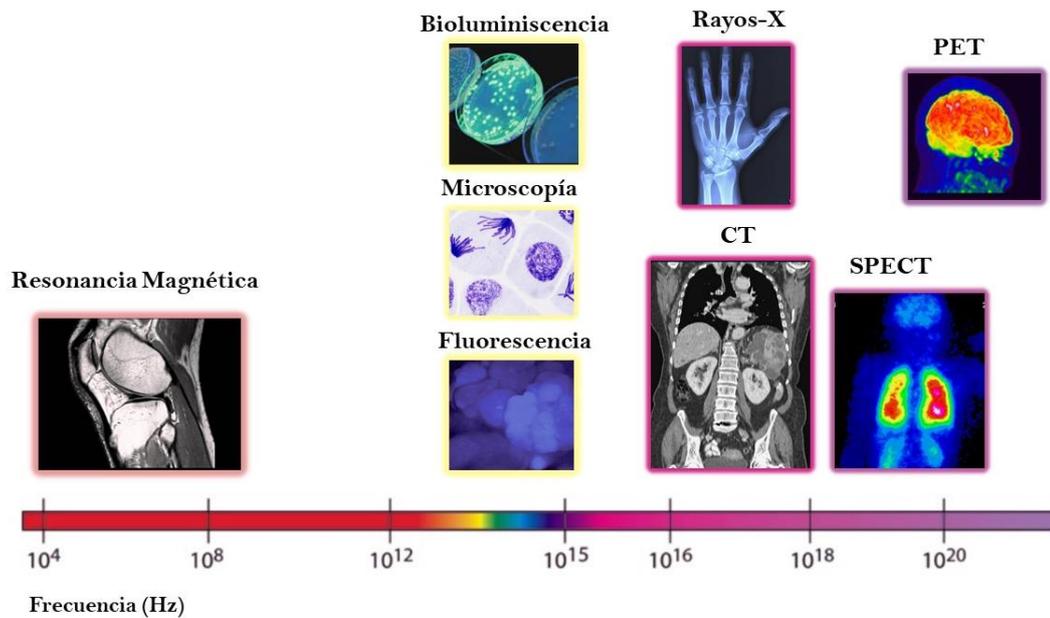


Figura I. 4. Ejemplos de diferentes técnicas de bioimagen en función del tipo de radiación electromagnética que emplean para obtener la imagen.

Las técnicas de imagen macroscópica ofrecen información morfológica, anatómica y/o fisiológica; su uso está muy extendido en el ámbito clínico y preclínico. Presentan una elevada resolución espacial, pero no son capaces de detectar patologías hasta que hay un cambio estructural en el tejido, cuya visualización está condicionada por el tamaño de dicho cambio y por el equipo empleado [29,30].

Por su parte, **las técnicas de imagen microscópica**, como **la imagen molecular**, posibilitan la visualización, caracterización y medida de los procesos biológicos (normales o patológicos) de un organismo vivo a nivel molecular o incluso genético [31,32]. Estas técnicas emplean agentes de imagen que habitualmente se administran al organismo vivo en estudio. Un **agente de imagen** es un compuesto con capacidad

de dirigirse de forma selectiva hacia una diana biológica específica y que al mismo tiempo puede emitir una señal detectable por un equipo de imagen [33–35].

La **imagen molecular con isótopos radioactivos** utiliza como agentes de imagen compuestos que contienen uno o más radionucleidos. Dichos radionucleidos emiten una energía electromagnética durante su decaimiento que es detectada por un tomógrafo (Figura I. 5). El tipo de emisión del isótopo condiciona el equipo que puede utilizarse [36,37]; para detectar compuestos que contengan radionucleidos con emisión gamma se emplea una gammacámara o un tomógrafo SPECT, mientras que para los emisores de positrones se utiliza un tomógrafo PET.

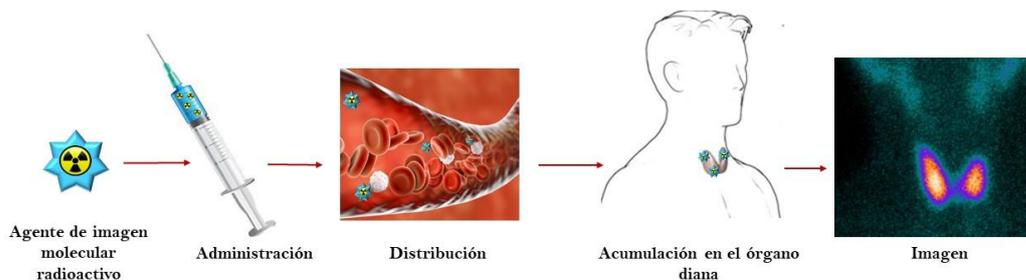


Figura I. 5. Esquema de la imagen molecular con isótopos radioactivos

La información que aportan las técnicas macroscópicas y microscópicas es complementaria, razón por la que en la actualidad lo más habitual es combinar los tomógrafos de SPECT o PET con un equipo de imagen anatómico, como la Tomografía Computerizada (CT). Esta combinación, conocida como técnica multimodal [38–40], posibilita la adquisición de ambos tipos de imagen en el mismo estudio, que se pueden fusionar y evaluar en conjunto [41], aumentando así la precisión en la localización de los focos de radiactividad (Figura I. 6).

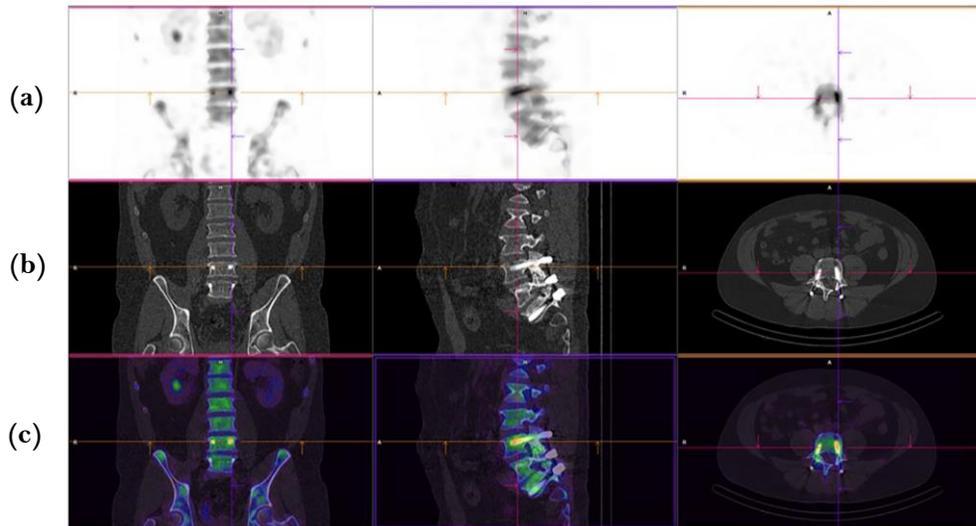


Figura I. 6. (a) imagen funcional (SPECT), (b) imagen anatómica (CT), (c) imagen multimodal (SPECT-CT).

2.1 Aplicaciones de la imagen molecular con isótopos radiactivos.

2.1.1 Herramienta en el desarrollo de fármacos

El desarrollo de fármacos es un proceso largo, tedioso y con un coste elevado [42]. Desde que se diseña o descubre una molécula con potencial farmacológico, hasta que se comercializa, es necesario evaluar numerosos aspectos de la misma (Figura I. 7). Todos estos ensayos se agrupan en tres fases en general:

- I. **Descubrimiento del fármaco:** en esta fase se seleccionan los compuestos “candidatos” según sus propiedades farmacológicas.
- II. **Desarrollo preclínico:** en esta etapa se realizan estudios en animales; entre las pruebas que se realizan en esta fase se encuentran las pruebas de toxicidad, el análisis farmacocinético/farmacodinámico o la formulación más adecuada.

III. Desarrollo clínico: esta fase se centra en la determinación de la eficacia, los efectos secundarios y los peligros potenciales asociados a la administración del fármaco. Se realiza en voluntarios sanos y en pacientes.

DESCUBRIMIENTO DEL FÁRMACO	DESARROLLO PRECLÍNICO	DESARROLLO CLÍNICO			APROBACIÓN POR LAS AUTORIDADES SANITARIAS	FASE IV
<ul style="list-style-type: none"> Selección de la diana Búsqueda de la molécula de partida Optimización de la molécula de partida Evaluación de características farmacológicas 	<ul style="list-style-type: none"> Farmacocinética Toxicología a corto plazo Formulación Síntesis a gran escala 	Fase I Farmacocinética, tolerabilidad, efectos secundarios en voluntarios sano	Fase II Ensayos a pequeña escala en pacientes para valorar eficacia y dosis Estudios toxicológicos a largo plazo	Fase III Ensayos clínicos controlados a gran escala	Se remiten los datos completos y son revisados por las autoridades sanitarias	Vigilancia tras la comercialización
2-5 años	1-5 años	5-7 años			1-2 años	
100 proyectos	20 compuestos	10	5	2	1,2	1
Fármaco candidato						
Compuesto en desarrollo						
					Remisión a la comisión de registro sanitario	
					Fármaco aprobado para su comercialización	

Figura I. 7. Resumen de las etapas necesarias para desarrollar un fármaco [43].

Debido a la cantidad de tiempo y recursos que hay que emplear en el proceso de desarrollo de un fármaco, las fases no suelen desarrollarse de forma secuencial, sino que algunas transcurren en paralelo. Sin embargo, este modelo de desarrollo de varios estudios simultáneos requiere una inversión mayor, sin la certeza de que el producto alcance finalmente el mercado.

El empleo de la **imagen molecular con isótopos radioactivos**, como una herramienta de evaluación en las etapas preclínicas, ofrece una optimización del tiempo y los recursos necesarios para lograr de forma segura el desarrollo de nuevos fármacos. Puede proporcionar información, de forma rápida y precisa, de la farmacocinética y el tiempo de permanencia del compuesto sin alterar el funcionamiento natural del organismo [44,45]. Asimismo, posibilita la valoración del mismo animal durante

largos periodos de tiempo, reduciendo el número de experimentos *ex vivo* necesarios para obtener determinada información [46].

2.1.2 Herramienta de diagnóstico clínico

La imagen molecular con isótopos radioactivos es extensamente utilizada en la rutina clínica, siendo la Medicina Nuclear la especialidad que la emplea para el diagnóstico de múltiples patologías [47]. Los agentes de imagen que se emplean en este campo se denominan radiofármacos. Un **radiofármaco (RF)** es cualquier producto que, cuando está preparado y listo para su uso con finalidad diagnóstica o terapéutica, contiene uno o más isótopos radioactivos [48,49]. El tipo de emisión del radionucleido de un RF determina su aplicación, siendo los emisores gamma (conocidos como RF convencionales) y los emisores de positrones (RF PET) los que se emplean para diagnóstico.

Los radiofármacos según su estructura química pueden ser [50] **un radionucleido simple** con capacidad de alcanzar la diana biológica por sí mismo (ej. [^{131}I]NaI) o **un compuesto radiomarcado**, es decir, un isótopo radioactivo se une a una molécula capaz de dirigirse a una diana específica en respuesta a condiciones fisiológicas o fisiopatológicas específicas (ej. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-tetrofosmina) [51,52].

2.1.2.1. Radiofármacos marcados con tecnecio-99m

Alrededor del 80 % de los radiofármacos con finalidad diagnóstica están marcados con tecnecio-99m [37,53]; su extendido uso clínico se debe a las características físicas y químicas que presenta el isótopo [54,55], así como la posibilidad de obtener este tipo de RF de forma rápida, fácil y económica, a partir de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ y un equipo reactivo [56,57].

2.1.2.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL TECNECIO-99M

En general, los RF convencionales utilizan radionucleidos emisores gamma puros de baja energía (80-200keV) por diversos motivos [58]:

- Tienen mayor número fotones disponible para la adquisición de una imagen, lo que aumenta la estadística de contaje y mejora la capacidad diagnóstica de la misma.
- Facilitan el blindaje y la colimación del haz fotónico en el detector, optimizando la resolución espacial sin que haya una pérdida de sensibilidad.
- Disminuyen la dosimetría del paciente en comparación con aquellos que emiten con una energía inferior a 50 KeV o radiaciones corpusculares, ya que la interacción con el cuerpo del sujeto es menor.

En este contexto el tecnecio-99m es un excelente candidato [59], ya que decae a tecnecio-99 con una riqueza fotónica del 90 % y una energía gamma de 140 KeV (Figura I. 8).

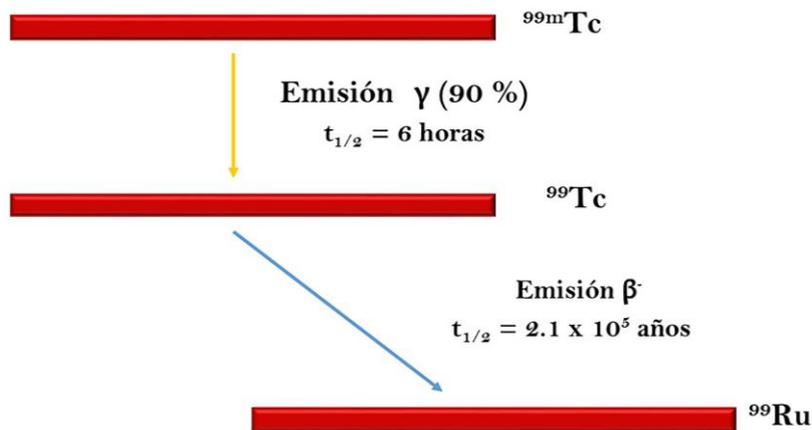


Figura I. 8. Diagrama de decaimiento del $^{99m}\text{Tc} \rightarrow ^{99}\text{Tc} \rightarrow ^{99}\text{Ru}$. El tiempo de vida media del ^{99}Tc y el tipo de emisión que tienen permite que la intervención de este fenómeno físico durante la adquisición de imagen sea despreciable.

Por otro lado, el periodo de semidesintegración ($t_{1/2}$) del tecnecio-99m es de 6 horas, que es suficiente para realizar la preparación, el transporte y la administración del RF de una forma fácil, pero permite una baja dosis de radiación del paciente tras la finalización del procedimiento diagnóstico [60].

2.1.2.1.2 OBTENCIÓN DEL ISÓTOPO: GENERADOR $^{99}\text{MO}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

El procedimiento más común para obtener este radionucleido sigue siendo a partir de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ [61]. El generador es un sistema que incorpora un isótopo radioactivo, denominado radionucleido padre, que en su desintegración radiactiva origina otro radionucleido, el hijo [62]. El generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ contiene como padre ^{99}Mo (en forma de $[\text{}^{99}\text{Mo}]\text{MoO}_4^{2-}$), que decae con un $t_{1/2} = 66 \text{ h}$ a $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ (isótopo hijo).

El $[\text{}^{99}\text{Mo}]\text{MoO}_4^{2-}$ se carga sobre una columna de alúmina acidificada (fase estacionaria); en estas condiciones el anión molibdato se adsorbe fuertemente sobre la fase estacionaria de la columna, mientras la afinidad del $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ por la alúmina es menor. Esta diferencia permite que pueda darse un intercambio aniónico con otro ion, que suele introducirse como fase móvil [63]. Este proceso se denomina **elución** y rutinariamente suele hacerse con una solución isotónica de NaCl 0,9 % (Figura I. 9). El eluido contiene una solución de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, que tiene una vida útil de 8-12 horas.

El generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ se comercializa a un bajo coste y con una vigencia de 15 días, lo que da la posibilidad de obtener el isótopo directamente en el laboratorio durante este periodo, proporcionando mayor flexibilidad en el flujo de trabajo de un Unidad de Radiofarmacia y optimizando el coste de la preparación de los RF.

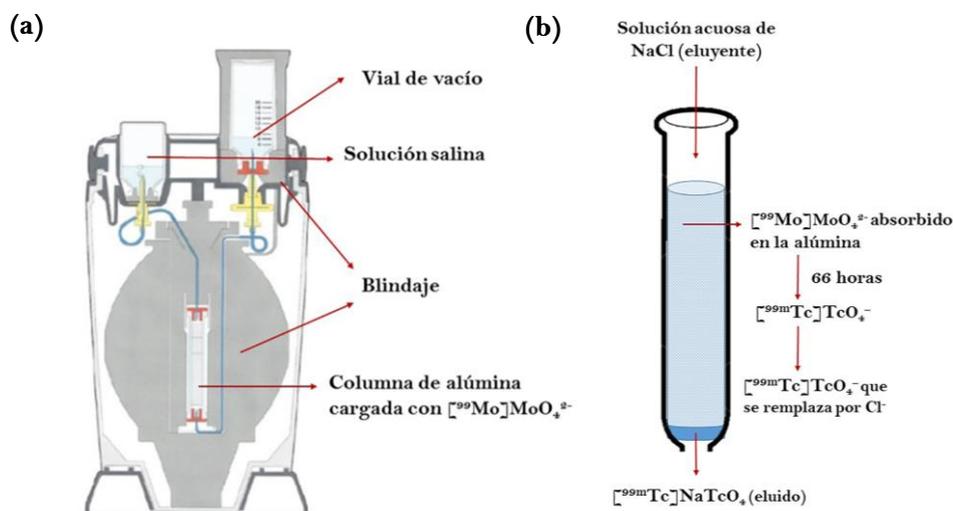


Figura I. 9 (a) Esquema de un generador comercial de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. El vial de elución está en depresión, de modo que tras conectarlo al puerto de elución por diferencia de presión provoca que pase la solución salina a través de la columna de alúmina, realizando el intercambio aniónico y permitiendo la obtención del $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$. (b) Principio de producción y elución del isótopo hijo. Imágenes modificada de la referencia [63].

2.1.2.1.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL TECNECIO-99M

El tecnecio-99m es un metal de transición con ocho estados de oxidación posibles, comprendidos entre el (-I) y el (VII), de los cuales el cuadrivalente y el heptavalente son los más estables [64]. El único compuesto conocido con un estado de oxidación VII (configuración electrónica d^0) es el $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, que se obtiene en forma de disolución acuosa a partir del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (como ya se ha explicado en el apartado 2.1.2.1.2.). En este estado de oxidación, su capacidad de unirse directamente a un ligando (L) es negligible, de modo que para obtener un compuesto radiomarcado con tecnecio-99m es necesario reducirlo previamente [65,66]. El L puede ser el propio farmacóforo del RF o un quelante bifuncional previamente unido a la molécula vehicular del mismo.

De los diversos agentes reductores empleados, el más común es el cloruro de estaño (II). Esto se debe a su baja toxicidad, su capacidad de proporcionar elevados rendimientos en un medio acuoso y el amplio rango de pH (3-6) y de temperatura (25-120 °C) en el pueden reducir al tecnecio [67,68].

La modificación de estas dos variables (pH y temperatura) permiten que, empleando SnCl_2 , el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (VII) pueda reducirse a diferentes estados de oxidación (Figura I. 10), siendo los más comunes el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (V), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (III) y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I) [69]. Sin embargo, una vez obtenidos deben ser estabilizados mediante la formación de un complejo de coordinación con uno o más L; en estos complejos el tecnecio-99m es el centro metálico y el L actúa como una base de Lewis, donándole pares de electrones, que estabilizan el “nuevo” estado de oxidación, evitando que el radiometal pueda sufrir nuevas reacciones de óxido-reducción [70].

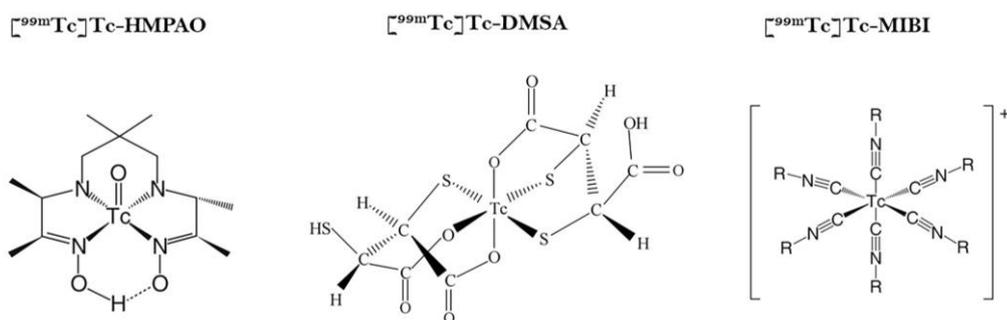
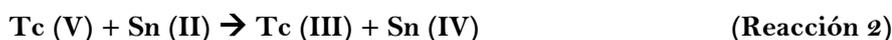
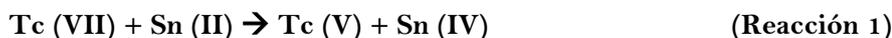


Figura I. 10. RF tecnecios comerciales [62] que han empleado SnCl_2 como agente reductor, pero han obtenido un estado de oxidación distinto en función de la naturaleza del ligando, el pH y la temperatura de incubación de la mezcla. El $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-DMSA}$ y el $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MIBI}$ tiene un estado de oxidación (V), (III) y (I), respectivamente.

Según Spies y Pietzsch [71] la reducción más habitual del tecnecio-99m cuando se emplea el SnCl_2 como reductor, es a un estado de oxidación (V) (Reacción 1) y mediante la reducción de este se obtienen otros estados de oxidación más bajos (Reacción 2).



Que la reacción de reducción se detenga en un estado de oxidación u otro depende de estabilidad del compuesto resultante, que está supeditado a la naturaleza del L y al tipo de átomo donador que este tenga disponible (nitrógeno, oxígeno, fósforo, etc.) [72].

Cuando no hay una estabilización del radiometal éste tenderá a reoxidarse hasta el estado heptavalente ($^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$) o a dismutar en los dos estados de oxidación más estables (Reacción 3) [73]. El $^{99m}\text{Tc(IV)}$ generalmente forma $^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$, considerado una impureza en el proceso de radiomarcaje.



2.1.2.1.4 OBTENCIÓN DE RADIOFÁRMACOS MEDIANTE UN SISTEMA TIPO “KIT”

Se denomina **equipo reactivo o “kit” frío** a cualquier preparado industrial que, tras combinarse con el radionucleido, permite obtener un RF; en el caso de un RF tecneciado la reconstitución se realiza con la solución de $^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ obtenida del generador.

Estos equipos reactivos están compuestos por uno o varios viales que contienen:

- **El sustrato** que se desea radiomarcarse (molécula vehicular del RF), que como ya se ha descrito anteriormente, puede constituir en sí misma el L que se unirá al radiometal o tener unido un L adecuado para ello.
- **El agente reductor** que generalmente es cloruro de estaño (II).
- **Diversos excipientes**, entre los que se incluyen soluciones tampón para el control del pH de la reacción.

Todos los ingredientes están liofilizados, bajo una atmósfera inerte [71], que tiene como objetivo minimizar la reoxidación del tecnecio-99m una vez se ha reducido,

permitiendo que el rendimiento de la reacción de coordinación entre el isótopo y el sustrato sea el más elevado posible.

La reconstitución de estos kits da como resultado una solución isotónica y con un pH cercano al fisiológico. Dado que el proceso de reconstitución permite preparar los RF en un corto periodo de tiempo y con una manipulación mínima, desde hace décadas el sistema tipo “kit” es el método de elección para la preparación de RF tecneciados en la rutina clínica.

2.1.2.1.4.1 CONTROL DE CALIDAD DEL RADIOFÁRMACO

Una vez reconstituido es necesario asegurar la idoneidad del RF, para lo cual se evalúa su porcentaje de pureza radioquímica (% PRQ). Este parámetro, indica el porcentaje del isótopo que se encuentra en una forma química determinada, permitiendo evaluar el porcentaje que se ha unido al vehículo. Este procedimiento es crítico, porque una vez administrado, los focos de radioactividad que se observen en la imagen corresponderán a la emisión gamma del tecnecio-99m como radionucleido, con independencia de la forma química en el que se encuentre el radiometal

El análisis del %PRQ puede realizarse con diferentes técnicas cromatográficas; la elección de uno u otro depende del RF y de las impurezas producidas en la reconstitución del “kit”. No obstante, todas ellas aprovechan la radiación emitida por el radionucleido como principio de detección. La radiación puede ser medida en la fase estacionaria y/o en la fase móvil (según la técnica cromatográfica), bien con un activímetro, contador gamma o con un radiocromatógrafo (Figura I. 11).



Figura I. 11. Detectores empleados en radiocromatografía para determinar el % PRQ. (a) activímetro: basado en una cámara que contiene un gas que se ioniza por la radiación emitida por el radionucleido; (b) contador gamma; (c) radiocromatógrafo. Ambos emplean cristales de centello como sistema de detección; los átomos que conforman el cristal centellean en presencia de radiaciones ionizantes.

3. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

La **nanotecnología** es la ciencia que permite el control, la manipulación, el estudio y el desarrollo de estructuras de tamaño nanométrico [74]. Las características físicas y químicas de los materiales pueden mejorar o cambiar radicalmente a medida que disminuye su tamaño, ya que se produce una reorganización superficial de los átomos que condiciona sus propiedades [75].

Existen multitud de ejemplos de este tipo de sistemas artificiales con aplicación en diversos campos de la ciencia. Un ejemplo de ello es la **nanomedicina**, disciplina que aplica la nanotecnología al diagnóstico, el tratamiento y el manejo de salud humana [76].

3.1 Nanopartículas

Las **nanopartículas (NPs)** son una de las múltiples plataformas que pueden utilizarse en el campo de la nanomedicina; se emplean como vehículos de liberación sostenida de un compuesto con el objetivo de mejorar la eficacia y/o reducir la toxicidad asociada al mismo [77]. Aunque clásicamente han sido empleados como

plataforma para agentes terapéuticos, también pueden ser empleadas para transportar agentes de imagen [78]. Entre los beneficios que ofrece su utilización, se encuentra:

- I. La solubilización de moléculas hidrófobas, y como consecuencia la sustitución de los medios orgánicos en los que generalmente están dispersadas, y que tienen una mayor toxicidad asociada [79].
- II. La superación de barreras biológicas que impiden utilizar determinadas vías de administración (oral, oftálmica, etc.) [80].
- III. Un incremento de la biodisponibilidad del compuesto por una disminución de la degradación prematura que puede sufrir en el organismo [81].
- IV. Un mejor perfil de biodistribución mediante la facilitación de su difusión a través del epitelio y/o de la penetración intracelular [82].
- V. Una liberación del compuesto progresiva que disminuye la toxicidad a la que se expone el resto del organismo [83].
- VI. La posibilidad de administrar más de un compuesto utilizando la misma plataforma (co-encapsulación) [84].

Clásicamente las NPs se han diseñado como agentes pasivos, cuyas características fisicoquímicas han determinado sus propiedades y su distribución. Sin embargo, en las últimas décadas han ido evolucionado hasta convertirse en plataformas multifuncionales (Figura I. 12), que contienen más de un compuesto con diferentes funciones. Estas funciones abarcan desde la acumulación activa por reconocimiento específico de una diana (funcionalización con ligandos) [85], la liberación de la carga tras un cambio en el medio biológico (cambio de pH del medio celular), hasta mejorar la permeabilidad del tejido diana [86,87].

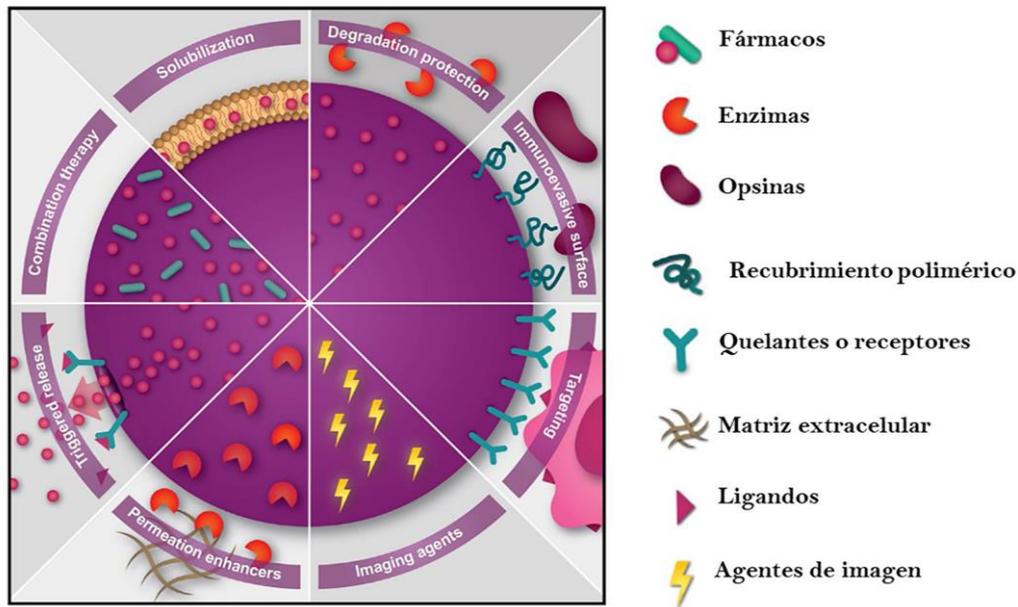


Figura I. 12. Resumen del carácter multifuncional de la NP. Imagen modificada de la referencia [86].

3.1.1 Mecanismos de acción de las nanopartículas

Las aplicaciones terapéuticas de las NPs se basan principalmente en dos estrategias (Figura I. 13) [88]:

- La **acumulación pasiva:** se basa en una respuesta inherente del organismo que dirige y/o acumula el nanotransportador en un tejido u órgano concreto. Uno de los ejemplos más característicos de esta estrategia es la terapia de los tumores sólidos basándose en el **efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR)**; los procesos angiogénicos tumorales son rápidos y dan lugar a una vasculatura defectuosa con fenestraciones que pueden alcanzar hasta los 800 nm; esto permite penetrar al nanotransportador y acumularse en el tejido tumoral, donde es degradado por los macrófagos, liberando el agente terapéutico.

- La **acumulación activa**: emplea mecanismos de transporte específicos para que alcance un tejido u órgano diana. Las células en procesos patológicos pueden sobre-expresar transportadores o receptores; la modificación de un nanotransportador con un ligando afín permiten una unión específica con la célula, su internalización y la liberación intracelular del agente terapéutico.

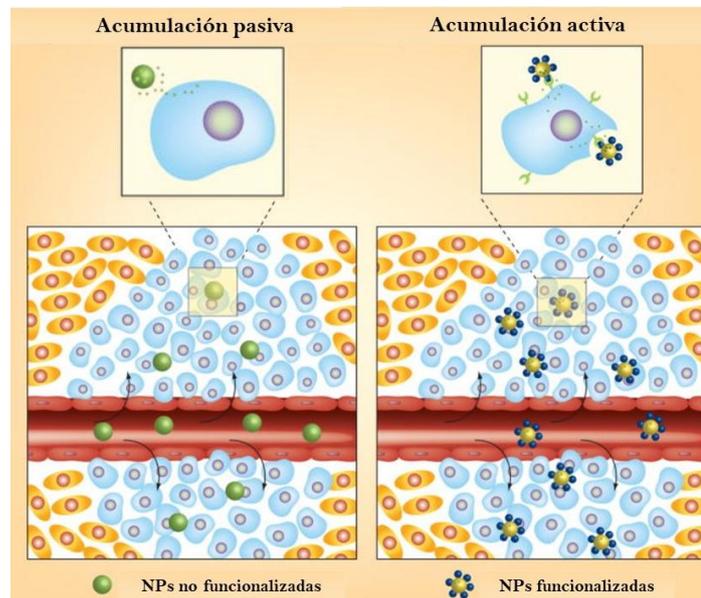


Figura I. 13. Diferentes tipos de transporte de NPs. Imagen modificada de la referencia [89]

3.1.2 Tipos de nanopartícula

Existen numerosos criterios para la categorizar las NPs, siendo la composición de su matriz uno de los más determinantes, ya que condiciona sus características fisicoquímicas y con ello sus posibles aplicaciones biomédicas [46]; en este contexto pueden clasificarse principalmente en **NPs inorgánicas** (cómo óxidos metálicos, las NPs de oro, etc.) y **NPs orgánicas** (cómo las NPs proteicas, NPs lipídicas, etc.) (Figura I. 14)



Figura I. 14. Tipos de nanopartículas en función de la naturaleza de su matriz. Imagen modificada de la referencia [90].

De los dos tipos de NPs, las de matriz orgánica han sido clásicamente más estudiadas y, por tanto, más empleadas para fines biomédicos. Esto se debe a que el material que conforma la matriz es no tóxico, biodegradable, fácilmente funcionalizable y con un bajo coste asociado a su producción [91].

La **albúmina sérica humana (HSA)** es una proteína abundante en el plasma que por sus características (sustancia natural, no inmunogénica, fácil de purificar, soluble en agua y cuyos productos catabólicos son inocuos) es considerado como un material muy atractivo en el diseño y desarrollo de NPs [92–94].

Su cadena polipeptídica contiene un gran número de aminoácidos cargados que, en condiciones fisiológicas le permite actuar como reservorio y transportador de proteínas endógenas y compuestos exógenos [95]. Esta propiedad le permite interactuar con gran variedad de moléculas y cargar multitud de fármacos por adsorción electrostática, con independencia de la polaridad que tengan [96,97]. El Abraxane® es un ejemplo de ello; este fármaco, aprobado desde 2008 en España [98], se sirve de una suspensión de

NP-HSA para el transporte de paclitaxel (quimioterápico). Su encapsulación mejora su solubilidad y facilita la inyectabilidad. Está demostrado que en monoterapia es más eficaz tratando el cáncer de mama metastásico, y cuando se aplica en combinación con otras quimioterapias aumenta la supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de páncreas [99,100].

Las NP-HSA pueden prepararse utilizando diferentes métodos, que pueden categorizarse en [101]:

- **Métodos físicos**, como la gelación térmica, el nanosecado por aspersion o la técnica NAB.
- **Métodos químicos**, tales como la desolvatación, la emulsificación o el autoensamblaje.

3.2 Nanoteragnósis

La necesidad de buscar una atención personalizada para los pacientes se ha convertido en los últimos años en la principal aspiración dentro del ámbito clínico. El crecimiento de disciplinas que realizan estudios moleculares y genéticos, es un ejemplo del enfoque predictivo y específico al que se aspira para que los tratamientos sean cada vez más efectivos. En este contexto la imagen molecular tiene un papel fundamental por su capacidad de proporcionar información molecular de forma no invasiva. La integración de la terapia con el diagnóstico clínico se conoce como **teragnósis**. La **nanoteragnósis** desarrolla este concepto dentro del campo de la nanomedicina mediante el diseño de nanotransportadores (como por ejemplo las NPs) que además de contener agentes terapéuticos pueden emitir una señal que permitan su detección o visualización [102]. Dicha señal puede emitirse siguiendo dos mecanismos:

- **Emisión tras irradiación**: este mecanismo se basa en las propiedades electromagnéticas que algunas NPs poseen, bien porque se las confiera el material del que están hecho o por su carga. Requieren ser irradiadas con

una fuente externa (luz infrarroja, campo magnético, etc.). Tras la irradiación, los átomos de dicho material se excitan y al volver al estado basal se emite energía que puede ser detectada y/o cuantificada por un equipo de imagen [103]. Este tipo de imagen suele ofrecer información anatómica [104,105] y está limitada por la atenuación que los tejidos ejercen sobre la señal durante la irradiación y la detección

- **Emisión directa:** la NP está unida o cargada a un agente de imagen que emite una señal por sí mismo [106], permitiendo la detección y/o visualización del nanosistema. Un ejemplo de detección por emisión directa es el marcaje de las NPs con isótopos radiactivos.

3.2.1 Marcaje radiactivo de nanopartículas

Para la detección directa empleando isótopos radioactivos se debe unir el radionucleido a la NP, siendo esta última la parte vehicular del agente de imagen. Esta unión puede llevarse a cabo siguiendo cuatro estrategias distintas (Figura I. 15):

- I. **Marcaje radiactivo de uno de los componentes** del nanosistema antes de la preparación del nanosistema [88]
- II. El **radiomarcaje directo de la cubierta** de la nanopartícula mediante un proceso de quimiadsorción (formación de un enlace entre el radionucleido y la cubierta de la NP) [107].
- III. **Encapsulación de un RF en la NP** mediante su dilución en la fase acuosa antes de la formación del nanosistema [108].
- IV. La **funcionalización con un quelante bifuncional** de la superficie de la NP que pueda a posteriori reaccionar con el isótopo [109].

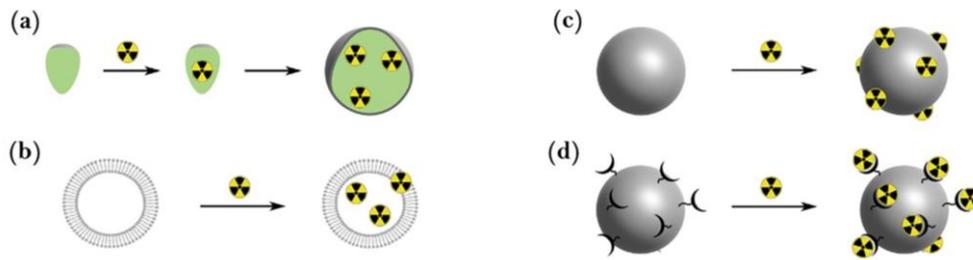


Figura I. 15. Estrategias de marcaje con isótopos de un nanosistema. (a) marcaje de un material de la matriz, (b) encapsulación de un RF, (c) marcaje de la superficie, (d) marcaje de NP previamente unida a un ligando bifuncional. Imagen modificada de la referencia [110]

La integración de un isótopo radiactivo y una NP permite conocer con una elevada precisión su biodistribución *in vivo*, su tiempo de permanencia en el organismo y su capacidad de alcanzar el tejido diana [111]. Una potencial aplicación es conocer la eficacia de la administración y la distribución homogénea de las NPs debido al EPR; existe una variabilidad de este mecanismo no sólo entre pacientes, sino en el mismo tejido tumoral a lo largo del tiempo; el crecimiento descontrolado de la vasculatura tumoral da lugar a una estructura de vasos heterogénea y con zonas poco irrigadas, en las que las NPs no pueden acumularse. En este contexto el empleo de imagen molecular con isótopos radiactivos permite a los nanosistemas de carácter nanoteragnóstico, que ayuda a monitorizar la biodistribución a tiempo real y poder realizar una evaluación individualizada de una forma sencilla [112,113].

Por otra parte, si la aplicamos a nanosistemas capaces de acumularse activamente, su visualización favorece la evaluación del nivel de expresión de la diana terapéutica, permitiendo correlacionar la acumulación de la NP y con ello predecir el beneficio terapéutico que el paciente puede recibir [114].

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. August, Immunoglobulins, in: *Encycl. Respir. Med.*, Elsevier, 2006: pp. 314–320. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00184-8>.
- [2] E. Mix, R. Goertsches, U.K. Zett, Immunoglobulins - Basic considerations, *J. Neurol.* 253 (2006) 9–17. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-5002-2>.
- [3] A. Prieto Martín, J. Barbarroja Escudero, S. Haro Girón, J. Monserrat Sanz, Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas, *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado.* 12 (2017) 1398–1407. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.12.008>.
- [4] H.W. Schroeder, L. Cavacini, Structure and function of immunoglobulins, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- [5] S.N.J. Korsman, G.U. van Zyl, L. Nutt, M.I. Andersson, W. Preiser, Immunotherapy and immunoprophylaxis–, in: *Virology*, Elsevier, 2012: pp. 46–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-07367-0.00020-3>.
- [6] R.A. de la lengua española (RAE), Definición de inmunoterapia, (2020). <https://dle.rae.es/inmunoterapia> (accessed September 11, 2020).
- [7] R. Zhang, M.M. Billingsley, M.J. Mitchell, Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy, *J. Control. Release.* 292 (2018) 256–276. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.008>.
- [8] M.M. Durán de Rueda, Anticuerpos monoclonales, *Univ. Med.* 26 (1984) 111–118.
- [9] H.A. Parray, S. Shukla, S. Samal, T. Shrivastava, S. Ahmed, C. Sharma, R. Kumar, Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future

- perspectives, *Int. Immunopharmacol.* 85 (2020) 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>.
- [10] E.R. Stiehm, M.A. Keller, Passive immunization, in: *Vaccines*, Elsevier, 2013: pp. 80–87. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00001-X>.
- [11] K. Rajewsky, The advent and rise of monoclonal antibodies, *Nature*. 575 (2019) 47–49. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02840-w>.
- [12] Believing in seeing, *Nat. Mater.* 13 (2014) 99–99. <https://doi.org/10.1038/nmat3879>.
- [13] L. Valor, I. de la Torre, Understanding the Immunogenicity Concept, *Reumatol. Clínica (English Ed.* 9 (2013) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2012.09.001>.
- [14] L. Valor, I. De la Torre, Comprender el concepto de inmunogenicidad, *Reumatol. Clin.* 9 (2013) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2012.09.002>.
- [15] W.S. Putnam, S. Prabhu, Y. Zheng, M. Subramanyam, Y.M.C. Wang, Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.001>.
- [16] A.K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, VEGF receptor signalling - In control of vascular function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 359–371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>.
- [17] J. Sebastian, S. Torres, L. Fernanda, Z. Cerón, S. Isabel, F. Bernal, G. Wilson, M. Ordoñez, A. De Revisión, J. Sebastián, S. Torres, L. Fernanda, Z. Cerón, S. Isabel, F. Bernal, G. Wilson, M. Ordoñez, C. Salguero, El rol de VEGF en la Angiogénesis fisiológica y tumoral, *Medicina (B. Aires)*. 39 (2017) 190–209.
- [18] G.J. Weiner, Building better monoclonal antibody-based therapeutics, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc3930>.

- [19] A. Wang, Y., Fei, D., Vanderlaan, M., Song, Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro, *Angiogenesis*. 7 (2004) 335–345. <https://doi.org/10.1007/s10456-004-8272-2>.
- [20] EMA, Ficha técnica avastin, in: Gen. Sess. Abstr., ema, 2012: pp. S5-3-S5-3. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avastin-epar-product-information_es.pdf.
- [21] B.T. Brinkerhoff, N.W. Choong, J.S. Treisman, D.M. Poetker, Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Am. J. Otolaryngol.* 33 (2012) 349–351. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2011.07.012>.
- [22] J.E. Parada Vásquez., H. R., De León Ortega, Efecto del bevacizumab intravítreo en el edema macular diabético, *Oftalmol Clin Exp*. 8 (2331) 39–46.
- [23] A.M. Dascalu, A. Popa-Cherecheanu, M. Popa-Cherecheanu, A. Nica, D. Serban, “Off-label” use of intravitreal bevacizumab in non-ischemic macular edema secondary to retinal vein obstructions, *Rom. J. Ophthalmol.* 60 (2016) 90–95.
- [24] L.M. Jampol, A.R. Glassman, J. Sun, Evaluation and Care of Patients with Diabetic Retinopathy, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 1629–1637. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1909637>.
- [25] W. Stevenson, S.-F. Cheng, M.H. Dastjerdi, G. Ferrari, R. Dana, Corneal Neovascularization and the Utility of Topical VEGF Inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs Bevacizumab (Avastin), *Ocul. Surf.* 10 (2012) 67–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2012.01.005>.
- [26] A. Khanna, Bevacizumab in Glaucoma: Where do We Stand?, *J. Curr. Glaucoma Pract.* 6 (2012) 75–78. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10008-1110>.

- [27] N. Malik, T. Arfin, A.U. Khan, Graphene nanomaterials: chemistry and pharmaceutical perspectives, in: A.M. Grumezescu (Ed.), *Nanomater. Drug Deliv. Ther.*, Elsevier, 2019: pp. 373–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00002-3>.
- [28] R. Weissleder, M.J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology, *Nature*. 452 (2008) 580–589. <https://doi.org/10.1038/nature06917>.
- [29] M. Desco, J. Vaquero, H. General, U. Gregorio, Imagen molecular en medicina, *cicNetwork Imagen Mol.* 2 (2007) 31–35.
- [30] J. Seeram, E., Sil, Computed Tomography: Physical Principles, Instrumentation, and Quality Control, in: E. Jones, D.W., Hogg, P., Seerman (Ed.), *Pract. SPECT/CT Nucl. Med.*, Springer London, London, 2013: pp. 77–107. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4703-9_5.
- [31] M.A. Pysz, S.S. Gambhir, J.K. Willmann, Molecular imaging: current status and emerging strategies, *Clin. Radiol.* 65 (2010) 500–516. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2010.03.011>.
- [32] G.B. Saha, Molecular Imaging, in: G.B. Saha (Ed.), *Fundam. Nucl. Pharm.*, 7th ed., Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 355–371. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57580-3_14.
- [33] A. Marcos Moreno, M.L., Torralba Arranz, Unidad de Radiofarmacia Hospitalaria: creación y desarrollo, *Farm. Hosp.* 27 (2003) 42–49.
- [34] C.J. Halbrook, H.-J. Lee, L.C. Cantley, C.A. Lyssiotis, A Topical Report on the Design Principles of Metabolism, in: J.S. and K.R.K. Lewis (Ed.), *Imaging Metab.*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 29–44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61401-4_2.
- [35] H.A. Ziessman, J.P. O'Malley, J.H. Thrall, Radiopharmaceuticals, in: F.H. Fahey (Ed.), *Nucl. Med.*, 4th ed., Elsevier, 2014: pp. 1–15.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00001-8>.

- [36] H.A. Ziessman, J.P. O'Malley, J.H. Thrall, Single-Photon Emission Computed Tomography, Positron Emission Tomography, and Hybrid Imaging, in: F.H. Fahey (Ed.), Nucl. Med., 4th ed., Elsevier, 2014: pp. 51–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00005-5>.
- [37] S.M. Janib, A.S. Moses, J.A. MacKay, Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles, Adv. Drug Deliv. Rev. 62 (2010) 1052–1063. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.004>.
- [38] J. Dimastromatteo, K.A. Kelly, Target Identification, Lead Discovery, and Optimization, in: B.M. Lewis, Jason S.;Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), Radiopharm. Chem., Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 555–567. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_32.
- [39] P. Zanzonico, An Overview of Nuclear Imaging, in: B.M. Lewis, Jason S.; Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), Radiopharm. Chem., Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 101–117. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_6.
- [40] A.R. Fernandes, A. Oliveira, J. Pereira, P.S. Coelho, Nuclear Medicine and Drug Delivery, in: K. Maiti, S. and Kumar Sen (Ed.), Adv. Technol. Deliv. Ther., InTech, 2017: p. 13. <https://doi.org/10.5772/65708>.
- [41] M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps, Hybrid Imaging:SPECT/CT and PET/CT, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), Phys. Nucl. Med., 4th ed., 2012: pp. 345–361. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5198-5.00019-8>.
- [42] J.K. Willmann, N. van Bruggen, L.M. Dinkelborg, S.S. Gambhir, Molecular imaging in drug development, Nat. Rev. Drug Discov. 7 (2008) 591–607. <https://doi.org/10.1038/nrd2290>.

- [43] Fases de desarrollo de un nuevo fármaco, (n.d.). <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/edu-fases-de-desarrollo-de-un-nuevo-farmaco> (accessed September 15, 2020).
- [44] S. Lim, J. Park, M.K. Shim, W. Um, H.Y. Yoon, J.H. Ryu, D.K. Lim, K. Kim, Recent advances and challenges of repurposing nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy, *Theranostics*. 9 (2019) 7906–7923. <https://doi.org/10.7150/thno.38425>.
- [45] M. Yu, J. Zheng, Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles, *ACS Nano*. 9 (2015) 6655–6674. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01320>.
- [46] D.E. Lee, H. Koo, I.C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim, I.C. Kwon, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/c2cs15261d>.
- [47] F. Boccato Payolla, A.C. Massabni, C. Orvig, Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: a short review, *Eclética Química J.* 44 (2019) 11–19. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v44.3.2019.p11-19>.
- [48] D. Mankoff, Why Nuclear Imaging and Radiotherapy?, in: B.M. Lewis, Jason S.; Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), *Radiopharm. Chem.*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 3–10. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_1.
- [49] S.G. Neubauer, Medicina nuclear e imágenes moleculares, *Rev. Médica Clínica Las Condes*. 24 (2013) 324–336. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70168-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70168-8).
- [50] L. Chain, Y. and Illanes, Radiofármacos, in: L. Chain, Y. and Illanes (Ed.), *Radiofármacos En Med. Nucl. Fundam. Y Apl. Clínicas*, 1st ed., 2015: pp. 7–11.
- [51] G.B. Saha, Radiopharmaceuticals and General Methods of Radiolabeling, in:

- G.B. Saha (Ed.), *Fundam. Nucl. Pharm.*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 93–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57580-3_6.
- [52] M.I. Definitions, Chapter 2 – Molecular Imaging, *Nucl. Med.* 36 (2014) 16–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00002-X>.
- [53] A. Kamkaew, E.B. Ehlerding, W. Cai, Nanoparticles as Radiopharmaceutical Vectors, in: B.M. Lewis, Jason S.;Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), *Radiopharm. Chem.*, 4th ed., Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 181–203. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_10.
- [54] P. Martini, M. Pasquali, A. Boschi, L. Uccelli, M. Giganti, A. Duatti, Technetium complexes and radiopharmaceuticals with scorpionate ligands, *Molecules.* 23 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23082039>.
- [55] S.R. Banerjee, K.P. Maresca, L. Francesconi, J. Valliant, J.W. Babich, J. Zubieta, New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : A reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design, *Nucl. Med. Biol.* 32 (2005) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001>.
- [56] M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps, Radionuclide and Radiopharmaceutical Production, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), *Phys. Nucl. Med.*, 4th ed., Elsevier, 1987: pp. 43–68. <https://doi.org/10.1186/2197-7364-1-2>.
- [57] G.B. Saha, Radionuclide Generators, in: G.B. Saha (Ed.), *Fundam. Nucl. Pharm.*, 4th ed., Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 77–92. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57580-3_5.
- [58] R. Herbert, P.W. Kulke, R.T.H. Shepherd, The use of technetium 99m as a clinical tracer element, *Postgrad. Med. J.* 41 (1965) 656–662. <https://doi.org/10.1136/pgmj.41.481.656>.
- [59] M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps, The Gamma Camera: Performance

- Characteristics, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), *Phys. Nucl. Med.*, 4th ed., 2012: p. 544. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5198-5.00013-7>.
- [60] V. Morán, E. Prieto, B. García-García, B. Barbés, M.J. Ribelles, J.Á. Richter, J.M. Martí-Climent, Radiation dose produced by patients during radiopharmaceutical incorporation in nuclear medicine diagnostic procedures, *Rev. Española Med. Nucl. E Imagen Mol.* (English Ed. 35 (2016) 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.remnie.2016.02.004>.
- [61] T.J. Ruth, The Shortage of Technetium-99m and Possible Solutions, *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.* 70 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev-nucl-032020-021829>.
- [62] R. Alberto, U. Abram, 99mTc: Labeling Chemistry and Labeled Compounds, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), *Handb. Nucl. Chem.*, Springer US, Boston, MA, 2011: pp. 2073–2120. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2_43.
- [63] C. Green, Technetium-99m production issues in the United Kingdom, *J. Med. Phys.* 37 (2012) 66. <https://doi.org/10.4103/0971-6203.94740>.
- [64] M.K. Dewanjee, The chemistry of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals, *Semin. Nucl. Med.* 20 (1990) 5–27. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(05\)80173-4](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(05)80173-4).
- [65] N. Chemistry, *Handbook of Nuclear Chemistry*, Springer US, Boston, MA, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2>.
- [66] W.C. Eckelman, S.M. Levenson, Radiopharmaceuticals labelled with Technetium, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 28 (1977) 67–82. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(77\)90161-2](https://doi.org/10.1016/0020-708X(77)90161-2).
- [67] D.. Fritzberg, A.R., Lyster, D.M, Dolphin, Evaluation of formamidine sulfinic acid and other reducing agents for use in the preparation of Tc-99m labeled

- radiopharmaceuticals., *Jounal Nucl. Med.* 18 (1977) 553–557.
- [68] A.G. Jones, C. Orvig, H.S. Trop, A. Davison, M.A. Davis, A survey of reducing agents for the synthesis of tetraphenylarsonium oxotechnetiumbis(ethanedithiolate) from [^{99}Tc] pertechnetate in aqueous solution, *J. Nucl. Med.* 21 (1980) 279–281.
- [69] C.D. Russell, A.G. Speiser, Complexes of technetium with hydroxycarboxylic acids: gluconic, glucoheptonic, tartaric, and citric., *J. Nucl. Med.* 21 (1980) 1086–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7431109> (accessed March 19, 2020).
- [70] U. Mazzi, The coordination chemistry of technetium in its intermediate oxidation states, *Polyhedron.* 8 (1989) 1683–1688. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(00\)80617-8](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)80617-8).
- [71] H. Spies, H.J. Pietzsch, Stannous chloride in the preparation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pharmaceuticals, in: I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharm. Prep. Qual. Control Nucl. Med.*, 1st ed., 2007: pp. 59–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_3.
- [72] J.R. Dilworth, S.J. Parrott, The biomedical chemistry of technetium and rhenium, *Chem. Soc. Rev.* 27 (1998) 43–55. <https://doi.org/10.1039/a827043z>.
- [73] C. Maass, R.; Alvarez, J.; Arriaga, On a New Tracer for Liver Scanning, *JInternational Ournal Appl. Radiat. Isot.* 18 (1967) 653–654.
- [74] L. Dehaini, Di., Fang, R. H., Zhang, Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 30–46. <https://doi.org/10.1002/btm2.10004>.
- [75] I. Ojer, P., López De Cerain, A., Areses, P., Peñuelas, J.M. Irache, Toxicity Studies of Poly(Anhydride) Nanoparticles as Carriers for Oral Drug Delivery,

- Pharm. Res. 29 (2012) 2615–2627. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0791-8>.
- [76] E.L. Kristoffersen, M.L. Jepsen, B.R. Knudsen, Nanomedicine, Springer New York, New York, NY, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3634-2>.
- [77] M.C. Urrejola, L. V Soto, C.C. Zumarán, J.P. Peñaloza, B. Álvarez, I. Fuentevilla, Z.S. Haidar, Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly), Int. J. Morphol. 36 (2018) 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>.
- [78] S. Vijayakumar, ; M Priya, Nanomedicine for cancer targeted drug delivery, early detection mechanism and therapeutics 1 MedDocs eBooks, 2019. <http://meddocsonline.org/> (accessed December 27, 2019).
- [79] H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari, Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem., Nano Today. 10 (2015) 487–510. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>.
- [80] M.A. Kamaledin, Nano-ophthalmology: Applications and considerations, Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 13 (2017) 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.007>.
- [81] Z. Cheng, A. Al Zaki, J.Z. Hui, V.R. Muzykantov, A. Tsourkas, Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, Science (80-.). 338 (2012) 903–910. <https://doi.org/10.1126/science.1226338>.
- [82] P. Couvreur, Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future, Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (2013) 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.010>.
- [83] L.-P. Wu, D. Wang, Z. Li, Grand challenges in nanomedicine, Mater. Sci. Eng.

- C. 106 (2020) 110302. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110302>.
- [84] A. Dicko, S. Kwak, A.A. Frazier, L.D. Mayer, B.D. Liboiron, Biophysical characterization of a liposomal formulation of cytarabine and daunorubicin, *Int. J. Pharm.* 391 (2010) 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.014>.
- [85] R. van der Meel, L.J.C. Vehmeijer, R.J. Kok, G. Storm, E.V.B. van Gaal, Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1284–1298. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.012>.
- [86] J. Wolfram, M. Ferrari, Clinical cancer nanomedicine, *Nano Today*. 25 (2019) 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.02.005>.
- [87] J. Zhao, M. Zhou, C. Li, Synthetic nanoparticles for delivery of radioisotopes and radiosensitizers in cancer therapy, *Cancer Nanotechnol.* 7 (2016) 9. <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0022-9>.
- [88] P.P. Di Mauro, V. Gómez-Vallejo, Z. Baz Maldonado, J. Llop Roig, S. Borrós, Novel 18 F Labeling Strategy for Polyester-Based NPs for in Vivo PET-CT Imaging, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 582–592. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00040>.
- [89] S. Ramishetti, L. Huang, Intelligent design of multifunctional lipid-coated nanoparticle platforms for cancer therapy, *Ther. Deliv.* 3 (2012) 1429–1445. <https://doi.org/10.4155/tde.12.127>.
- [90] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón, I. González-Méndez, La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?, *Educ. Quim.* 27 (2016) 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- [91] M. Otagiri, V.T. Giam Chuang, Albumin nanoparticles, in: M. Otagiri, V.T.G. Chuang (Eds.), *Albumin Med. Pathol. Clin. Appl.*, Springer Singapore,

- Singapore, 2016: pp. 91–96. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9>.
- [92] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release.* 157 (2012) 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>.
- [93] B. Wilson, Y. Lavanya, S.R.B. Priyadarshini, M. Ramasamy, J.L. Jenita, Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.056>.
- [94] N. Qu, Y. Sun, Y. Li, F. Hao, P. Qiu, L. Teng, J. Xie, Y. Gao, Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: synthesis, characterization, and evaluation, *Biomed. Eng. Online.* 18 (2019) 11. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0624-7>.
- [95] K. Yamasaki, V.T.G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Albumin-drug interaction and its clinical implication, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 5435–5443. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>.
- [96] J. Mariam, S. Sivakami, P.M. Dongre, Albumin corona on nanoparticles – a strategic approach in drug delivery, *Drug Deliv.* 23 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1048488>.
- [97] F. Yang, Y. Zhang, H. Liang, Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3580–3595. <https://doi.org/10.3390/ijms15033580>.
- [98] AEMPS (Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios), Ficha técnica Abraxane, (2006) 1–27.
- [99] H. Lee, S. Park, J.E. Kang, H.M. Lee, S.A. Kim, S.J. Rhie, Efficacy and safety of nanoparticle-albumin-bound paclitaxel compared with solvent-based taxanes for metastatic breast cancer: A meta-analysis, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–9.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-57380-0>.

- [100] D. Yuan, Y. Lv, Y. Yao, X. Miao, Q. Wang, X. Xiao, J. Yin, Y. Shi, M. Shi, X. Zhang, Y. Song, Efficacy and safety of Abraxane in treatment of progressive and recurrent non-small cell lung cancer patients: A retrospective clinical study, *Thorac. Cancer*. 3 (2012) 341–347. <https://doi.org/10.1111/j.1759-7714.2012.00113.x>.
- [101] F.F. An, X.H. Zhang, Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery, *Theranostics*. 7 (2017) 3667–3689. <https://doi.org/10.7150/thno.19365>.
- [102] B.R. Smith, S.S. Gambhir, Nanomaterials for in Vivo Imaging, *Chem. Rev.* 117 (2017) 901–986. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00073>.
- [103] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5818–5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>.
- [104] Sonali, M.K. Viswanadh, R.P. Singh, P. Agrawal, A.K. Mehata, D.M. Pawde, Narendra, R. Sonkar, M.S. Muthu, Nanotheranostics: Emerging strategies for early diagnosis and therapy of brain cancer, *Nanotheranostics*. 2 (2018) 70–86. <https://doi.org/10.7150/ntno.21638>.
- [105] S. Mura, P. Couvreur, Nanotheranostics for personalized medicine, *Nanotheranostics Pers. Med.* 13 (2016) 1–337. <https://doi.org/10.1142/9741>.
- [106] H. Hong, Y. Zhang, J. Sun, W. Cai, Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles, *Nano Today*. 4 (2009) 399–413. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.07.001>.
- [107] A. Polyák, I. Hajdu, M. Bodnár, G. Trencsényi, Z. Pöstényi, V. Haász, G. Jánoki, G.A. Jánoki, L. Balogh, J. Borbély, ^{99m}Tc-labelled nanosystem as

- tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities, *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.049>.
- [108] M.M. Kleiter, D. Yu, L.A. Mohammadian, N. Niehaus, I. Spasojevic, L. Sanders, B.L. Viglianti, P.S. Yarmolenko, M. Hauck, N.A. Petry, T.Z. Wong, M.W. Dewhirst, D.E. Thrall, A tracer dose of technetium-99m- labeled liposomes can estimate the effect of hyperthermia on intratumoral doxil extravasation, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6800–6807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0839>.
- [109] L. Farzin, S. Sheibani, M.E. Moassesi, M. Shamsipur, An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 107 (2019) 251–285. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36550>.
- [110] C. Pérez-Medina, A.J.P. Teunissen, E. Kluza, W.J.M. Mulder, R. van der Meel, Nuclear imaging approaches facilitating nanomedicine translation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.017>.
- [111] H. Choi, Y.-S. Lee, D.W. Hwang, D.S. Lee, Translational radionanomedicine: a clinical perspective, *Eur. J. Nanomedicine.* 8 (2016) 71–84. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0052>.
- [112] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [113] I. Colombo, M. Overchuk, J. Chen, R.M. Reilly, G. Zheng, S. Lheureux, Molecular imaging in drug development: Update and challenges for radiolabeled antibodies and nanotechnology, *Methods.* 130 (2017) 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2017.07.018>.
- [114] D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, G. Loudos, Molecular Nanomedicine Towards Cancer, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2271–2280.

<https://doi.org/10.1002/jps>.

II. OBJETIVOS

En este capítulo se definen los objetivos que se han fijado para el desarrollo del presente estudio de investigación.

1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido el radiomarcaje y la determinación de la biodistribución de distintas formulaciones de nanopartículas de seroalbúmina humana con bevacizumab. Para ello se han desarrollado distintos métodos de marcaje para la cubierta de la nanopartícula y el bevacizumab contenido en ella; ambos tipos se han evaluado mediante adquisición de imágenes SPECT/CT y posterior cuantificación de radiactividad en muestras biológicas en dos modelos animales. Este objetivo principal se ha dividido en objetivos secundarios.

1.1 *Objetivos secundarios*

1. Elaboración de un sistema tipo “kit” para el radiomarcaje directo con tecnecio-99m de las formulaciones de NP-HSA vacías o con bevacizumab encapsulado.
2. Evaluación del efecto del sistema tipo “kit” sobre las NP-HSA tras su preparación y radiomarcaje.
3. Estimación del tiempo de estabilidad de un sistema tipo “kit”, desde su preparación hasta su reconstitución, para el marcaje de NP-HSA con tecnecio-99m.

4. Desarrollo de distintos métodos, directos e indirectos, para el radiomarcaje del bevacizumab con tecnecio-99m.
5. Evaluación *in vitro* de la estabilidad del [^{99m}Tc]Tc-bevacizumab.
6. Determinación de la actividad y la integridad del anticuerpo tras el proceso de radiomarcaje.
7. Encapsulación del anticuerpo radiomarcado con tecnecio-99m en NP-HSA.
8. Evaluación *in vivo* de la biodistribución de las NPs radiomarcadas en dos modelos animales mediante imagen SPECT/CT.
9. Evaluación *ex vivo* de la biodistribución de las NPs radiomarcadas mediante medida de la radiactividad en distintos órganos.

III. MATERIALES, ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, EQUIPAMIENTO Y PROGRAMAS DE ANÁLISIS

En este capítulo se recogen todos los materiales, los equipos y los softwares empleados los capítulos posteriores, así como los modelos y los protocolos éticos utilizados en la experimentación animal.

1. MATERIALES

La albúmina sérica humana (fracción V, pureza 96–99 %) y el glutaraldehído solución al 25 %) fueron suministradas por Sigma (Madrid, España). El bevacizumab se obtuvo en su forma farmacéutica (Avastin®) de Roche (Madrid, España) en viales con una concentración nominal de 25 mg/ml. El ELISA Shikari® Q-beva para detección de bevacizumab se adquirió de Matriks Biotech (Gölbaşı, Turquía). Las columnas MidiTrap G-25, el generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc (Drytec) y los papeles Whatmann 3MM, Whatmann 31 y Whatmann 1 se adquirieron de GE Healthcare Bio-science (Coventry, Inglaterra, Reino Unido). El polietilenglicol 35000 fue suministrado por Sigma–Aldrich (San Luis, Estados Unidos) y el agua destilada por Teknokroma (Barcelona, España). El Gantrez® ES-425 fue donado por Ashland Inc (Barcelona, España). El PBS Gibco se adquirió de ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Los equipos reactivos HDP Technescan®, Teceos® y PYP Technescan® se adquirieron de CURIUM Pharma, Madrid, España. Los kits Isolink™ se adquirieron del Instituto Paul Scheffe (Villigen, Suiza). El suero fisiológico se obtuvo de Braun Medical S.A. (Kronberg, Alemania). La columna de exclusión molecular Yarra x150 se adquirió de Phenomenex, Torrance, California, Estados Unidos. Las tiras ALUGRAM® RP-18 se obtuvieron de Macherey-Nagel

(Düren, Alemania). Las tiras de ITLC-SG fueron suministrada por Agilent Technologies (Santa Clara, California, Estados Unidos.). El DTPA, el etanol absoluto, el cloruro de estaño dihidratado, el etanol, el metanol, el dihidrógeno fosfato de sodio, el hidrógeno fosfato de sodio, el citrato de sodio dihidratado, el cloruro de estaño dihidratado, metiletilcetona y el ácido clorhídrico fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). El isofluorano de Piramal (Mumbai, India) y el agente eutanásico T-61 de MSD Animals Health (Kirkland, Canadá). Los concentradores Amicon®, el 2-Mercaptoetanol, la L-histidina, el acetato de sodio y el ácido dietilentriaminopentaacético fueron adquiridos de Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos). El dodecilsulfato sódico, el gel de poliacrilamida MiniTGX, las membranas de nitrocelulosa, el azul de Coomassie, el buffer Tris/Gly fue suministrado por Bio Rad (Hercules, Estados Unidos). Todos los reactivos usados en este estudio fueron de calidad analítica.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para los estudios de biodistribución se utilizaron ratas Wistar hembra de seis semanas de edad y un peso promedio de 250 ± 20 gramos. Fueron estabuladas en la Unidad de Investigación MicroPET de la Universidad de Navarra, con una alimentación estándar y 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 (protocolo 066/16) en línea con la legislación europea de experimentación (86/609/EU).

3. EQUIPAMIENTO Y PROGRAMAS DE ANÁLISIS

Los equipos empleados en el desarrollo de las formulaciones de nanopartículas no radioactivas preparadas por el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra han sido:

- Una centrifugadora Sigma 3K30 (Osterodeam Harz, Alemania)
- Un rotavapor Büchi R-144 (Büchi, Postfach, Suiza).

- Un liofilizador Génesis 12EL (Virtis, Nueva York, Estados Unidos).
- Un analizador Zeta Plus (Brookhaven Inst. Corp., NY, Estados Unidos).

Los equipos y software de análisis empleados en el desarrollo y evaluación de las especies y formulaciones de nanopartículas radiomarcadas en la Unidad de Radiofarmacia de la Clínica Universidad de Navarra han sido:

- Un espectrofotómetro de haz simple UV-3100 PC (VWR, Alemania) para la determinación de la concentración bevacizumab purificado.
- Un termomezclador Eppendorf ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para la incubación de los radiomarcajes en los estudios de estabilidad.
- Un bloque térmico Tembloc Selecta (Abrera, Barcelona, España) para la preparación del precursor $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$.
- Un radiocromatógrafo MiniGITA empleando el software Nina (Raytest GmbH, Dortmund, Alemania) o un radiocromatógrafo Scan-RAM equipado con un detector 2x2 de NaI(Tl) y el software Laura (Lablogic System, Broomhill, Sheffield, Reino Unido) para determinar el Rf o el %PRQ de los radiomarcajes. La elección de equipo dependió de la instalación en la que se desarrolló el radiomarcaje (Unidad de Radiofarmacia de CUN Pamplona o Unidad de Radiofarmacia de CUN Madrid).
- Un equipo Agilent 1200A con un detector DAD (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) al que se acopló un detector de radioactividad Raytest (Straubenhardt, Alemania) para determinación de la pureza química y radioquímica por HPLC. Los cromatogramas se analizaron con el software CHEM32 (Agilent Technologies, California, Estados Unidos).
- El sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad, Hercules, Estados Unidos) para desarrollo de la electroforesis y el sistema Trans-Blot Turbo (Bio Rad, Hercules, Estados Unidos) para realizar la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa.

- Una gammacámara SPECT/CT de doble cabezal Symbia T2 Truepoint (Siemens Medical System, USA) para la adquisición de imágenes de los estudios de biodistribución *in vivo*.
- Contador gamma LKB 1282 para determinación de la radioactividad en tiras de radiocromatografía y en órganos.
- El software Syngo MI Applications TrueD (Siemens, Munich, Alemania) para análisis cualitativo de las imágenes de biodistribución *in vivo*
- El software Pmod versión 3.0 (Pmod, Adlisvil, Switzerland) para análisis cuantitativo de las imágenes de biodistribución *in vivo*.
- El software STATA (StataCorp, Texas, Estados Unidos) para el análisis estadístico.

IV.EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES COMO POSIBLE VEHÍCULO PARA LA ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO

En este capítulo se describe el diseño, desarrollo y la optimización del radiomarcaje directo con tecnecio-99m de tres formulaciones de nanopartículas y se evalúa la biodistribución mediante imagen SPECT/CT.

1. INTRODUCCIÓN

La **nanotecnología** diseña y desarrolla materiales de escala nanométrica (1), cuya aplicación en el ámbito biosanitario se erige como uno de los campos con mayor potencial (2,3). Una de las plataformas empleadas en este ámbito son las NPs.

Las **NPs como vehículos de liberación sostenida** son diseñadas y desarrolladas para mejorar la eficacia de una amplia gama de fármacos, ya que permiten mejorar su biodisponibilidad (4) (aumentando el tiempo de circulación y evitando la degradación prematura del fármaco), mantener la concentración terapéutica (modulando la velocidad de liberación) (5) y al mismo tiempo reducir los efectos secundarios que puedan estar asociados al tratamiento (dirigiendo el fármaco al órgano diana y reduciendo la toxicidad para el resto del organismo) (6).

El HSA es una de las proteínas más utilizadas en la fabricación de NPs proteicas (7). Existen diversas técnicas de preparación (8), de las cuales la desolvatación presenta la ventaja de ser una técnica rápida y sencilla. Sin embargo, esta técnica requiere una estabilización física o química posterior, para aumentar la permanencia de las NPs en medios acuosos y evitar que formen agregados (9). La combinación de la albúmina de las nanopartículas con un agente estabilizante es uno de los métodos más empleados en el proceso de estabilización de las mismas, por ser un procedimiento sencillo que

presenta elevados rendimientos y una elevada reproducibilidad (10). En función de la naturaleza del agente, las características farmacocinéticas de las NPs pueden ser modificadas, prolongando su tiempo de circulación, ralentizando la velocidad de liberación del fármaco, etc. (11,12).

Con el fin de modificar las características superficiales de las nanopartículas de albúmina se trataron con diferentes agentes:

- **El Glutaraldehído (GLU)**, que es ampliamente utilizado como agente estabilizante de NP-HSA, por su efectividad a la hora de controlar parámetros críticos, tales como el tamaño de partícula (TP), potencial Z, etc. (13). Sin embargo, su uso es controvertido por su potencial toxicidad celular cuando existe una degradación o una hidrólisis de la nanopartícula que está recubierta con dicho agente (14,15).
- **El Polietilenglicol (PEG)**, que se describe en la literatura como un polímero relativamente inerte y que, por el impedimento estérico que genera en la NP, minimiza su interacción con las proteínas plasmáticas (16).
- **El Gantrez**, es un copolímero sintético que presenta excelentes propiedades mucoadhesivas (17) y una baja toxicidad tras administración oral (18), por lo que puede exhibir excelentes propiedades para el modelo de administración oftálmica propuesto en este capítulo.

Como ya se detalló en el Capítulo I, el empleo de la **imagen molecular con isótopos radiactivos** ofrece numerosas ventajas para realizar la valoración de nanosistemas:

- Presenta una elevada sensibilidad, ya que un nanosistema puede estar unido a más de un átomo del isótopo (19)
- Posibilita la valoración de los órganos en los que se acumula el nanosistema, siendo una herramienta útil en la predicción de su potencial eficacia terapéutica como vehículo de liberación sostenida, así como en la valoración de la seguridad de su administración (20,21).

- Permite simplificar los ensayos necesarios para su evaluación proporcionando información de la distribución *in vivo*, así como del tiempo de permanencia en el organismo sin alterar su funcionamiento natural (22–24)

Todo esto posibilita que el desarrollo y la optimización de estos nanosistemas sean más rápidos para su posible traslación a la práctica clínica (25,26).

Existen numerosos isótopos que pueden utilizarse para obtener imágenes moleculares de estos nanosistemas (27,28), siendo el tecnecio-99m uno de los más empleados por sus características físicas (29) y químicas (30), así como por la posibilidad de obtenerlo de una forma sencilla, rápida y económica a partir de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (31,32).

El **tecnecio-99m** de la disolución de eluido se encuentra en su estado termodinámicamente más estable ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$), que como ya se ha explicado anteriormente, químicamente es inerte frente a ligandos por el estado de oxidación que presenta el metal en este compuesto (Tc (VII)). Para reducirlo existen distintos agentes reductores empleados para este fin (33,34). No obstante, el reductor más utilizado es el cloruro de estaño (II) (35,36).

En la literatura se describen diversas estrategias para realizar **radiomarcajes de NP con tecnecio-99m** (37–39), de los cuales el marcaje directo de cubierta de la NP es el más versátil ya que no implica modificaciones químicas de las estructuras ni cambios en los parámetros de formación de las NP.

Para realizar el marcaje directo de cubierta empleando un sistema tipo “kit”, como el que los utilizados en la preparación RF convencionales en la Unidades de Radiofarmacia hospitalarias, es necesario optimizar los diversos parámetros que influyen en el proceso de unión entre la NP y el tecnecio-99m: el pH de la disolución, la cantidad de nanopartícula a utilizar en el “kit” (ligando), la cantidad de agente

reductor en el “kit” para la reacción redox, la actividad de $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ para el radiomarcaje y el tiempo de incubación (40).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo ha sido la valoración mediante imagen SPECT/CT de tres tipos de formulaciones de nanopartículas de HSA (NP-HSA) como posible vehículo para la encapsulación de un mAb (bevacizumab). Para ello se desarrolló para cada formulación un sistema tipo “kit” que permitiese el radiomarcaje directo de la cubierta con tecnecio-99m y su posterior evaluación *in vivo* tras su administración oftálmica en modelo animal.

3. METODOLOGÍA

3.1 Preparación de las nanopartículas: posible vehículo para liberación del bevacizumab

Las NP-HSA se prepararon en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra utilizando el método de desolvatación en doble disolvente, previamente descrito por Luis de Redin et al. (41). Para ello 100 mg de HSA se disolvieron en 7,5 ml de agua destilada acidificada a pH 4,9 con HCl 1 M. Las NPs se formaron por adición de 16 ml de etanol en agitación continua.

Una vez formadas se incubaron con tres disoluciones de distintos agentes estabilizantes, dando lugar a tres formulaciones diferentes.

3.1.1 Nanopartículas de HSA recubiertas con Gantrez

Se preparó una disolución de Gantrez® ES-425 (Figura IV. 1), para lo cual se disolvieron 50 mg de polímero en 300 μl de etanol, y se incubó durante 5 min en agitación continua con las NP recién formadas. Posteriormente se purificaron mediante centrifugación a 27000 g durante 20 minutos y se resuspendieron hasta su volumen

original con agua. Por último, se liofilizaron utilizando un liofilizador Génesis 18EL y una disolución de sacarosa al 5 % como crioprotector. Esta formulación se identificó como NP-HSA-Gantrez.

Las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopia de correlación fotónica (TP e índice de polidispersión (PDI)) y anemometría laser doppler (potencial zeta) empleando un analizador Zeta Plus. Para ello se resuspendieron (1/10) en una disolución agua tipo I y se midieron a 25 °C con ángulo de 90°; para determinar el potencial Z la disolución de dispersión empleada fue KCl 0,1 mM ajustada a pH=7,4.

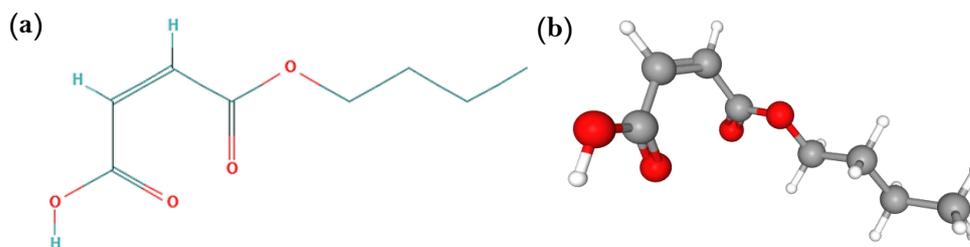


Figura IV. 1 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del monómero de Gantrez ES-425.

3.1.2 Nanopartículas de HSA recubiertas con PEG-350000

Tras el proceso de desolvatación, las NP-HSA recién formadas se pegilaron mediante incubación a temperatura ambiente con una solución de polietilenglicol 35000 (PEG, Figura IV. 2) al 10 % (p/v); los disolventes orgánicos se evaporaron a presión reducida en un rotavapor, se purificaron dos veces mediante centrifugación a 41.000 g durante 20 min a 4 °C y se liofilizaron utilizando una disolución de sacarosa al 5 % como crioprotector. Esta formulación se identificó como NP-HSA-PEG.

Se determinó el TP, el PDI y el potencial Z según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1.

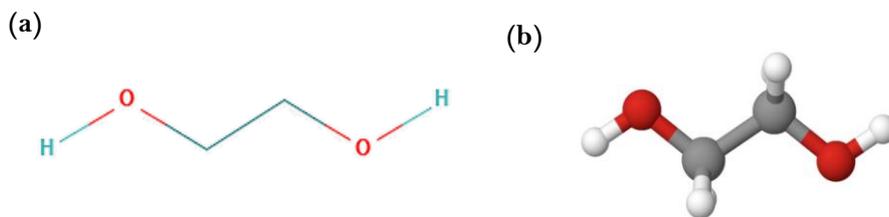


Figura IV. 2. (a) Estructura química y (b) conformación 3D el monómero de polietilenglicol. El tipo de PEG empleado contiene 35000 repeticiones del monómero polietilenglicol.

3.1.3 Nanopartículas de HSA recubiertas con Glutaraldehído

Las nanopartículas recién formadas se estabilizaron con glutaraldehído (GLU, Figura IV. 3) mediante incubación de las NP-HSA recién formadas durante 60 min en agitación continua con una solución de 12,5 μg de GLU disueltos en 300 μL de etanol (42). Finalmente, se purificaron y liofilizaron con el mismo método empleado para las nanopartículas pegiladas. Esta formulación se identificó como NP-HSA-GLU.

Se determinó el TP, el PDI y el potencial Z según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1.

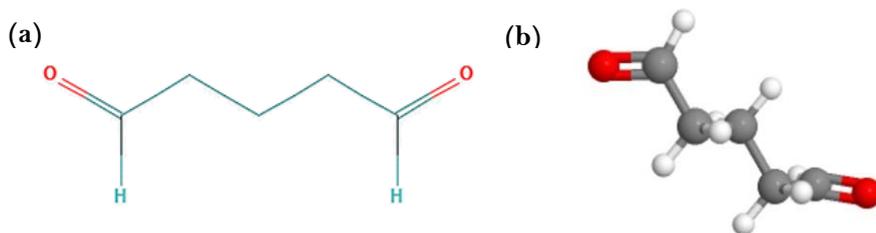


Figura IV. 3 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del glutaraldehído.

3.2 Desarrollo de un sistema tipo “kit” para el radiomarcaje directo de las nanopartículas

El desarrollo de los sistemas tipo “kit” se realizó manteniendo todos los parámetros que afectan al marcaje fijos (pH, actividad, temperatura y tiempo de incubación) a excepción de la cantidad de agente reductor, que es la variable a optimizar de forma empírica para cada tipo de NP. Los parámetros que mantuvieron invariables, se eligieron en base a otros estudios realizados por el grupo de la Unidad de Radiofarmacia de la Clínica Universidad de Navarra (43–47).

3.2.1 Optimización de la concentración de la especie reductora, preparación del equipo reactivo de las nanopartículas y radiomarcaje.

Se realizó un estudio de optimización de la cantidad de SnCl_2 necesaria para la preparación del “kit” frío. Para ello se prepararon dos disoluciones de cloruro de estaño de distintas concentraciones ($[\text{SnCl}_2] = 0,05$ y $0,5$ mg/ml) a partir de una solución de 5 mg/ml. Esta disolución madre se obtuvo disolviendo $4,7$ mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua previamente acidificada con HCl $0,01$ M ($\text{pH}=3$).

Se elaboró un equipo reactivo por cada concentración de especie reductora y con cada tipo de formulación. Cada “kit” se preparó disolviendo $0,5$ mg de formulación final de NP-HSA-Gantrez, NP-HSA-PEG o NP-HSA-GLU, con 40 μl de una de las dos disoluciones de cloruro de estaño preparadas ($0,5$ mg/ml o $0,05$ mg/ml). Finalizado el proceso de preparación se encapsularon todos los viales y se burbujearon con helio hasta sequedad.

Todos los viales se reconstituyeron con una disolución de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ (37 ± 15 MBq) recién eluida, obtenida de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figura IV. 4); todos

los equipos reactivos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

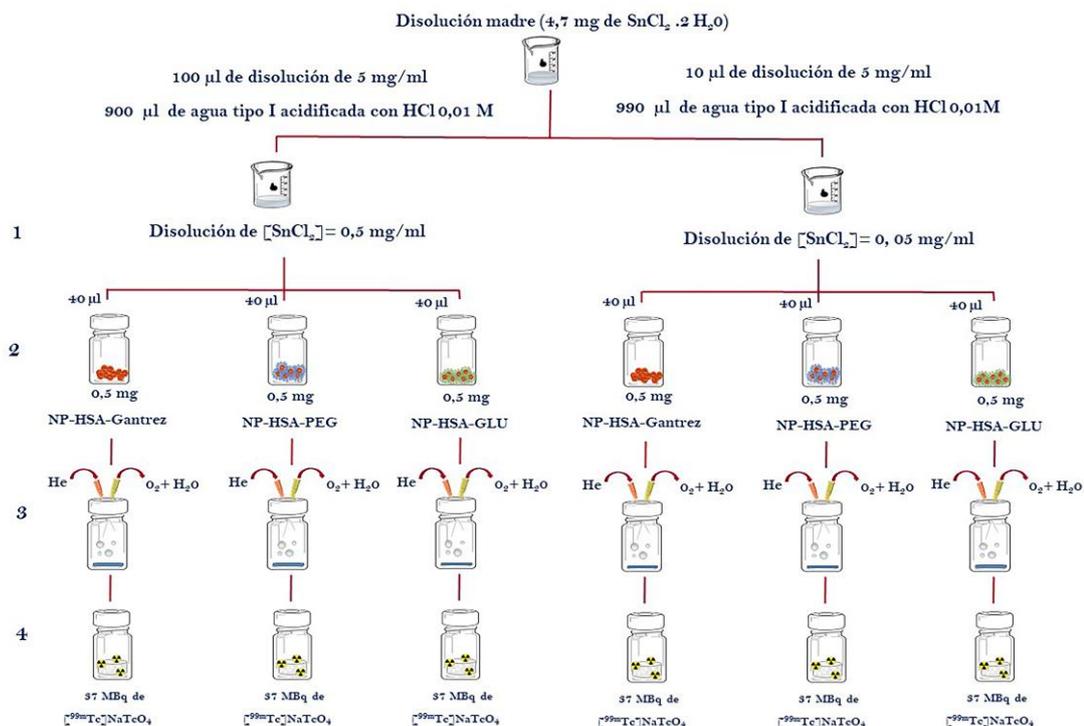


Figura IV. 4 Esquema de la preparación y radiomarcado de los kits fríos de cada formulación con distintas concentraciones de cloruro de estaño.

Sobre el esquema se han numerado las etapas desde la preparación del "kit" hasta su radiomarcado: **1.** Preparación de las soluciones de SnCl₂ a partir de una disolución madre, **2.** Mezcla de la formulación con la disolución de agente reductor, **3.** Purgado con helio **4.** Radiomarcado de los equipos reactivos con [^{99m}Tc]NaTcO₄.

3.2.2 Determinación de la pureza radioquímica de los equipos reactivos radiomarcados

Finalizado el periodo de incubación las distintas suspensiones se analizaron mediante cromatografía ascendente en papel Whatmann 3MM, con tiras de 1 x 10 cm, empleando como fase móvil NaCl 0,9 % (p/v). De cada tira cromatográfica se determinó la pureza radioquímica (PRQ) mediante lectura con un radiocromatógrafo MiniGita equipado con un detector 2x2 de NaI(Tl).

Sobre los cromatogramas obtenidos se calculó el Rf y el % PRQ de cada compuesto, en función de la actividad total medida en la tira, empleando el software Nina. El esquema general del proceso de marcaje y control de calidad queda esquematizado en la Figura IV. 5.

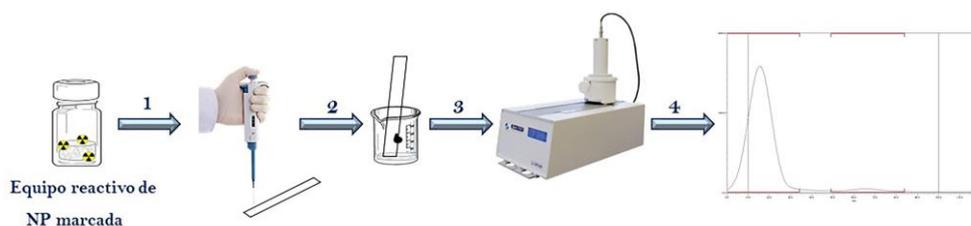


Figura IV. 5. Esquema del control de calidad de los equipos reactivos preparados para cada formulación durante el estudio de optimización de la concentración de SnCl₂.

Los pasos de control de calidad se han marcado sobre la imagen con la siguiente nomenclatura: **1.** 5 µl de suspensión marcada en la fase estacionaria, **2.** Desarrollo de la tira con la fase móvil, **3.** Lectura de la tira en el radio-TLC, **4.** Interpretación del cromatograma, cálculo del Rf y del % PRQ

En base a los resultados obtenidos en la radiocromatografía se determinó que concentración de especie reductora era la más adecuada para cada tipo de formulación, fijando así la [SnCl₂] necesaria para el radiomarcaje de los tres tipos de NPs mediante un sistema tipo “kit”. En la Tabla IV. 1 se resumen los criterios que se emplearon para evaluar los cromatogramas.

Especie	Rf	% PRQ
[^{99m} Tc]Tc-NP	0 ± 0,1	≥95
[^{99m} Tc]Tc-impurezas	0 ± 0,1	≤5
[^{99m} Tc]NaTcO ₄	1 ± 0,1	≤5

Tabla IV. 1. Factor de retardo y pureza radioquímica exigida en el marcaje de las distintas formulaciones de nanopartículas

El % PRQ indica el porcentaje del isótopo que se encuentra en una forma química determinada, de modo que al fijar el límite de marcaje de las nanopartículas en ≥95 % aseguramos que ese porcentaje de tecnecio-99m está unido a la NP. Este procedimiento es crítico, porque durante los estudios *in vivo* los focos de

radioactividad que se observan corresponden a la detección de la emisión gamma del tecnecio-99m como radionucleido y, por tanto, es independiente a la forma química en el que se encuentre el radiometal ($[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-NP, impurezas radiocoloidales o $[^{99m}\text{Tc}]$ NaTcO₄). Las impurezas radiocoloidales principalmente pueden ser $[^{99m}\text{Tc}]$ TcO₂ y $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-SnO. Su obtención está supeditada a las condiciones de marcaje, como se explica más adelante en la Discusión.

3.3 Desarrollo de un sistema tipo “kit” para el radiomarcaje directo del HSA con tecnecio-99m.

Se radiomarcó HSA con tecnecio-99m empleando un sistema tipo “kit” para su posterior utilización como control de biodistribución.

3.3.1 Optimización de las condiciones de marcaje y preparación de un equipo reactivo

Se realizó un estudio de optimización de igual modo al descrito para las formulaciones de NP-HSA en el apartado 3.2.1. Para ello se prepararon dos kits con 0,5 mg de HSA y 40 μ l de cada una de las dos disoluciones de cloruro de estaño (0,5 mg/ml o 0,05 mg/ml). Finalizado el proceso de preparación se encapsularon los dos viales y se burbujearon con helio hasta sequedad.

3.3.2 Radiomarcaje de los equipos reactivos y control de calidad.

Para el marcaje de cada vial se utilizaron 37 ± 13 MBq de una disolución de $[^{99m}\text{Tc}]$ NaTcO₄ recién eluida de un generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. El control de calidad se efectuó después de incubar los equipos reactivos durante 30 minutos a temperatura ambiente, empleando el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2.2

3.4 Estudios de biodistribución *in vivo*

Para realizar los estudios de biodistribución *in vivo* se empleó aquel equipo reactivo, de cada tipo de NP que, durante el estudio de optimización de la especie reductora, presentó mayor PRQ de la especie $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$.

Tras la reconstitución de cada “kit” se completó con su respectiva formulación de NP hasta alcanzar de 1mg de nanopartícula. Se establecieron tres grupos, uno por cada formulación radiomarcada ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-GLU}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-Gantrez}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$). Cada grupo estuvo conformado por tres animales, a los que se les administró una dosis única de 10 μl ($0,73 \pm 0,1$ MBq) de la suspensión radiomarcada correspondiente, en el ojo izquierdo. El modelo animal de administración oftálmica se escoge en el marco de desarrollo del proyecto FIS “Nateraveva” (PI14/01830).

Como controles de biodistribución se emplearon cuatro animales adicionales que recibieron también única dosis de 10 μl en ojo izquierdo; dos recibieron $3,7 \pm 0,4$ MBq de una solución de $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ y los otros dos $5 \pm 0,4$ MBq de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA}$.

Los animales fueron anestesiados con un 2 % de isoflurano durante la administración y durante la hora posterior, para evitar que lo eliminasen de forma accidental antes de su absorción. En la Figura IV. 6 se muestra un esquema de los grupos de animales empleados.

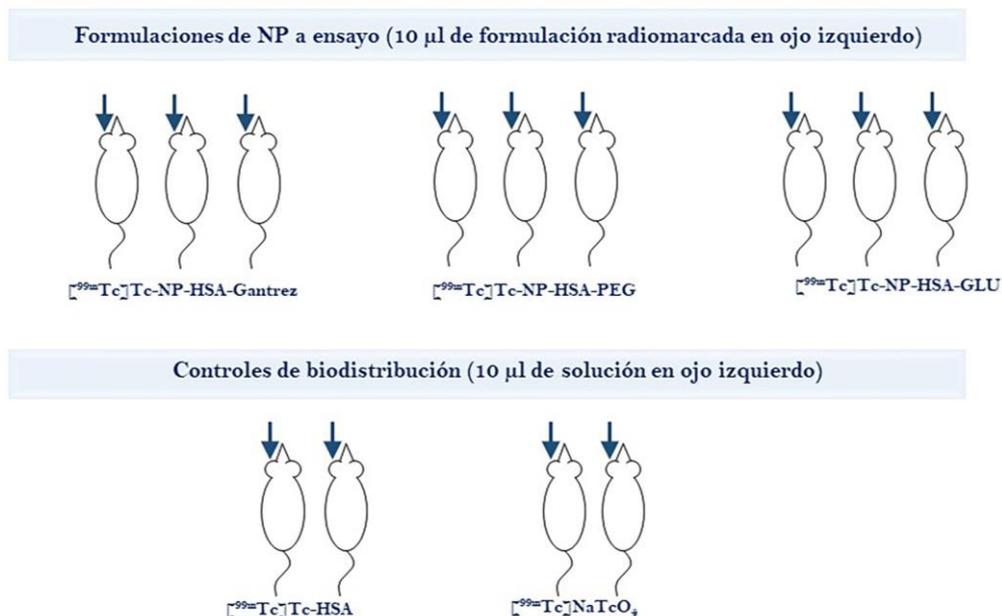


Figura IV. 6. Esquema de los grupos de animales empleados en los estudios de imagen SPECT/CT

Se obtuvieron imágenes de todos los grupos de nanopartícula a 4, 6, 8 y 10 horas post-administración y de los controles a las 4 y 8 horas. Los animales fueron anestesiados antes de cada estudio y colocados en posición prono (Figura IV. 7) en un equipo SPECT/CT de doble cabezal con una matriz de 128 x 128. El CT programó a 110mAs y 130 Kv, 130 imágenes de 3 mm de espesor. Los animales permanecieron anestesiados sólo durante la adquisición de imágenes, tras lo cual se mantuvieron estabulados en condiciones estándar.

Los estudios fueron analizados de forma cualitativa empleando el software Syngo MI Applications TrueD.



Figura IV. 7. Disposición de los animales anestesiados en el equipo SPECT/CT para adquisición de imagen.

4. RESULTADOS

4.1 Preparación de las formulaciones de nanopartículas.

El TP y el PDI de las NP-HSA-GLU fueron menores que las NP-HSA-Gantrez y las NP-HSA-PEG. No obstante, en los tres casos las poblaciones se muestran homogéneas con un valor de PDI < 0,2. En la Tabla IV. 2 se resume las principales características fisicoquímicas de la preparación de los tres tipos de NPs.

Formulación	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial Z
NP-HSA-Gantrez	210 ± 2	0,11 ± 0,01	-38,92 ± 0,45
NP-HSA-GLU	163 ± 1	0,17 ± 0,01	-35,43 ± 0,63
NP-HSA-PEG	207 ± 2	0,10 ± 0,01	-26,00 ± 1,00

Tabla IV. 2. Resultados caracterización fisico-química de las nanopartículas

4.2 Desarrollo del sistema tipo “kit”.

4.2.1 Radiomarcaje y determinación de la pureza radioquímica de los equipos reactivos de nanopartículas

Los resultados obtenidos muestran un porcentaje superior al 95 % (valor mínimo establecido en los criterios de aceptación, recogidos en la Tabla IV. 1) en todos los kits fríos preparados, alcanzando el 100 % en los que se ha empleado la disolución $[\text{SnCl}_2]=0,5 \text{ mg/ml}$ (Tabla IV. 3).

Equipo reactivo	$[\text{SnCl}_2]=0,05 \text{ mg/ml}$				$[\text{SnCl}_2]=0,5 \text{ mg/ml}$			
	$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$		$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$		$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$		$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	
	% PRQ	Rf	% PRQ	Rf	% PRQ	Rf	% PRQ	Rf
NP-HSA-Gantrez	96	0,02	4	0,96	96	0,01	4	1,00
NP-HSA-GLU	96	0,04	4	0,95	100	0,02	0	1,01
NP-HSA-PEG	95	0,01	5	0,97	100	0,00	0	0,96

Tabla IV. 3. Resultados de la pureza radioquímica de los distintos equipos reactivos elaborados en el estudio de optimización de la especie reductora para el desarrollo de un sistema tipo “kit”.

4.2.2 Radiomarcaje y determinación de la pureza radioquímica del equipo reactivo de HSA

Para las concentraciones empleadas de SnCl_2 (0,5 mg/ml y 0,05 mg/ml) la pureza radioquímica fue del 100 % y el 98 %, respectivamente (Figura IV. 8).

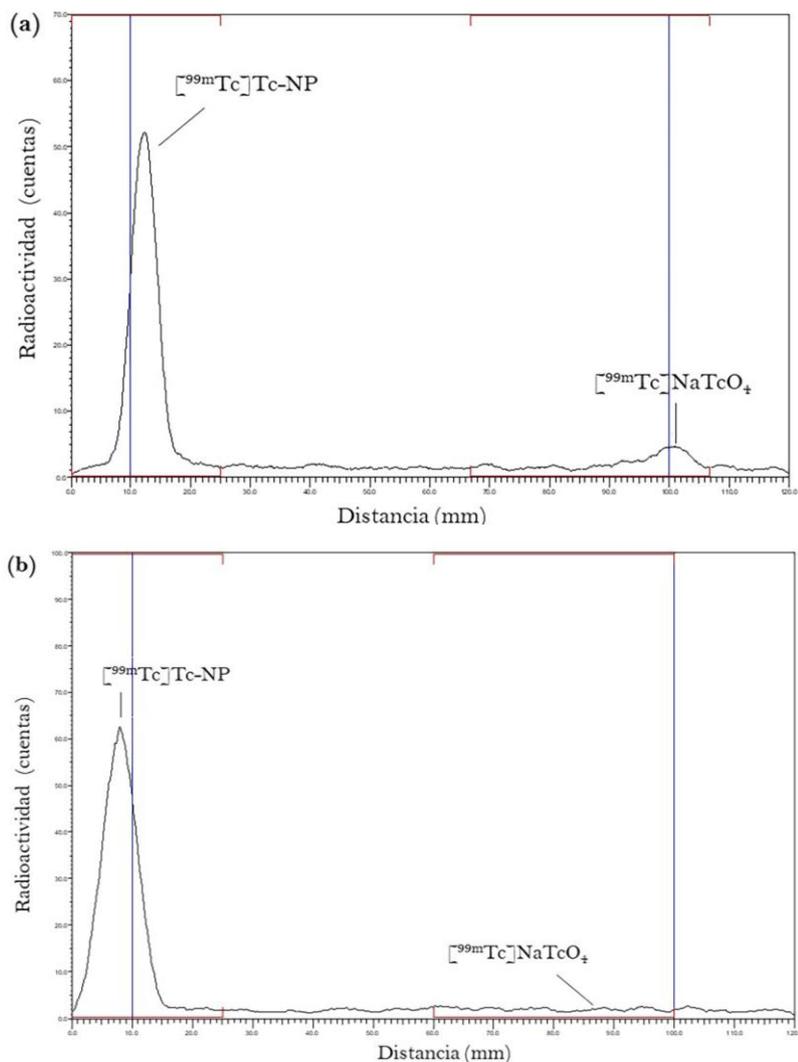


Figura IV. 8. Cromatogramas de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA}$. (a) $[\text{SnCl}_2] = 0,05 \text{ mg/ml}$ (b) $[\text{SnCl}_2] = 0,5 \text{ mg/ml}$

4.3 Estudios de biodistribución *in vivo*

La Figura IV. 9 muestra de forma representativa las imágenes SPECT/CT obtenidas después de la administración oftálmica a 4, 6, 8 y 10 horas post-administración de las suspensiones de nanopartícula y a las 4 y 8 horas de los controles de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$.

Comparando los estudios entre ellos puede observarse que:

- El tiempo de residencia en el ojo de las formulaciones de nanopartículas es mayor respecto a los controles de [^{99m}Tc]Tc-HSA o del [^{99m}Tc]NaTcO₄ en el mismo tiempo post-administración.
- Las imágenes de los controles de [^{99m}Tc]NaTcO₄ muestran actividad en ojo a las 4 horas post-administración y una captación en estómago en los dos puntos temporales analizados (4 y 8 horas).
- El periodo de permanencia de las nanopartículas en el ojo varía según el tipo de recubrimiento empleado para estabilizar la formulación; [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-PEG se mantiene hasta 12 horas en el punto de administración con una intensidad similar a lo largo del tiempo y superior a la de los otros tipos de nanopartícula.
- El perfil de excreción de las formulaciones de nanopartículas radiomarcadas y del control [^{99m}Tc]Tc-HSA parece ser gastrointestinal. De las formulaciones la [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-Gantrez evidencia una eliminación más rápida, ya que tras 4 horas post-administración se localiza en intestino, sin actividad gástrica. Por otro lado, la [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-GLU no parece llegar al intestino en ningún tiempo analizado.

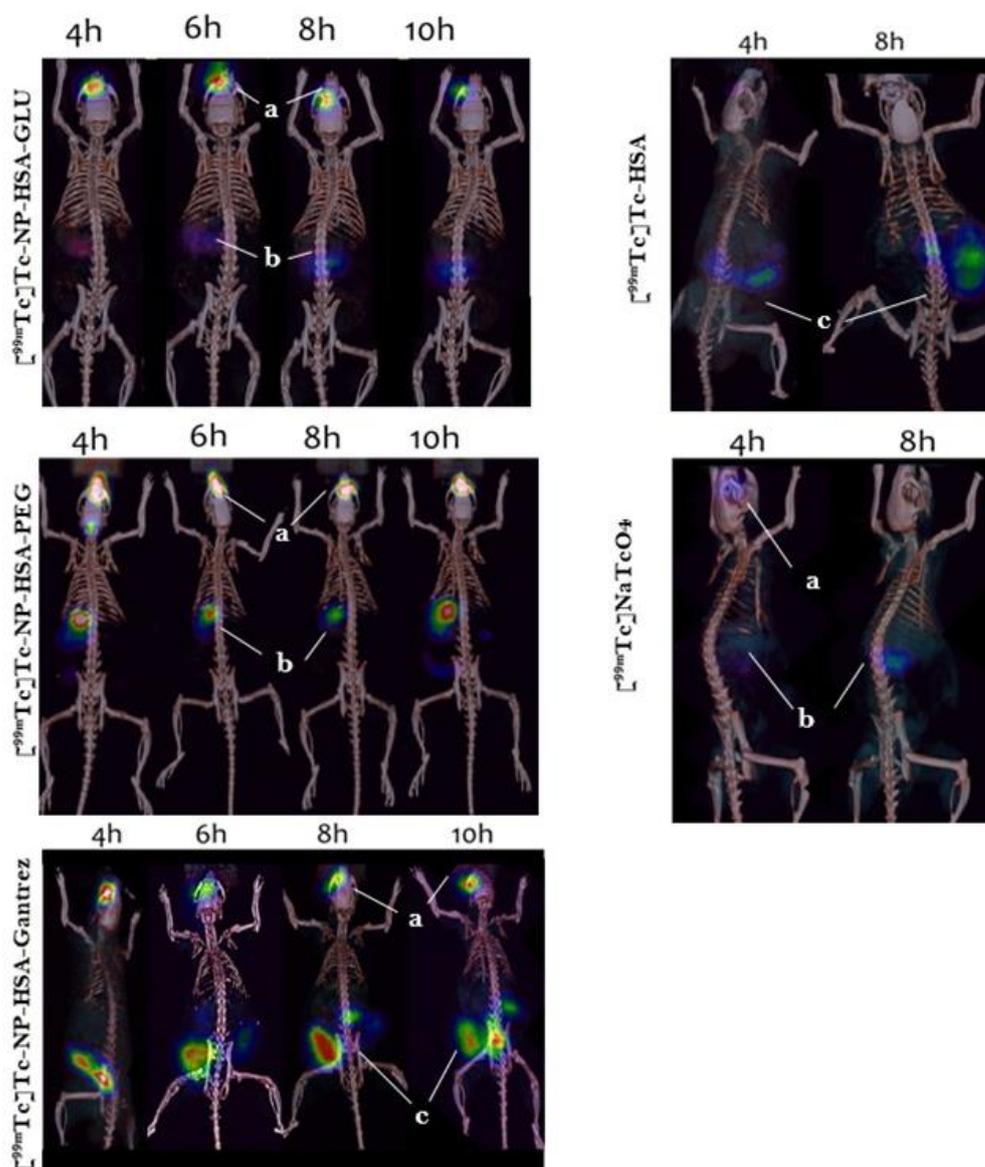


Figura IV. 9. Imágenes estáticas de las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-GLU}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG35000}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-Gantrez}$ comparadas con $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ como controles de biodistribución. Las imágenes de cada fila corresponden al mismo animal a lo largo del estudio. El tiempo post-administración está indicada en la parte superior las imágenes. **a.** Punto de administración: ojo izquierdo; **b.** Estómago; **c.** Intestino

5. DISCUSIÓN

Tras la preparación de las diferentes formulaciones se caracterizaron las NP mediante la determinación del TP, del PDI y del potencial Z. Los resultados obtenidos indicaron un mayor tamaño de partícula de las nanopartículas con recubiertas con PEG y Gantrez respecto a las que emplearon GLU. No obstante, las tres formulaciones mostraron homogeneidad en los tamaños de las poblaciones medidas ($PDI < 0,3$).

El valor de potencial Z medido fue similar para las formulaciones NP-HSA-GLU y NP-HSA-Gantrez y menos negativo medido para las NP-HSA-PEG. No obstante, en los tres casos fue negativo, dato importante porque por un lado, el potencial Z es responsable de la estabilidad de la nanodispersión; dos partículas tienen un elevado potencial Z de igual carga se repelen entre ellas, lo que ayudan a prevenir la agregación de la formulación [48]. Por otro, determina la interacción de las NPs con los componentes de medios biológicos, como las proteínas de membrana. Una carga superficial negativa disminuye la interacción de las NPs con las opsinas o los macrófagos, responsables de su eliminación [49,50]. Asimismo, la carga electrostática determina la interacción con las mucinas del epitelio corneal, determinantes en el tiempo de residencia en el ojo tras su administración. La literatura recoge como tanto las partículas catiónicas [51] como aniónicas [52] sirven para este fin.

Para realizar el marcaje directo con tecnecio-99m se optimizó el proceso de marcaje en función de la cantidad de cloruro de estaño (II). Los resultados obtenidos de los análisis radiocromatográficos indicaron que las dos concentraciones de SnCl_2 testeadas, permiten radiomarcarse las NP-HSA con $PRQ > 95 \%$, establecido como valor mínimo en los parámetros de aceptación. Sin embargo, a la hora de evaluar los resultados de forma adecuada es necesario tener en cuenta que, una vez se ha realizado la reconstitución del “kit”, pueden coexistir cuatro compuestos en la misma disolución [53]:

I. $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$: es el compuesto que se busca radiomarcarse, en nuestro caso la nanopartícula.

II. $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-SnO}$: este compuesto es una impureza coloidal radiomarcada. Su generación está asociada al uso de sales de estaño como agente reductor para el radiomarcaje con tecnecio-99m. Su empleo puede provocar la hidrólisis del Sn(II), formando partículas coloidales de $\text{SnO}\cdot\text{H}_2\text{O}$; estas presentan afinidad por el tecnecio-99m reducido [54,55] y pueden competir con las nanopartículas de interés ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$) en su unión con el isótopo, comprometiendo así el rendimiento de marcaje y generando impurezas radiomarcadas indeseadas.

Un control sobre el pH y la cantidad de Sn(II) en el equipo reactivo puede minimizar su formación. Por un lado, los valores $\text{pH} > 6$ a la hora de preparar la disolución acuosa de SnCl_2 favorecen su hidrólisis. Esta es una de las razones por lo que las disoluciones de SnCl_2 en la preparación de los equipos reactivos fueron acidificadas con HCl, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.

Por otro lado, la utilización de menor cantidad posible de SnCl_2 permite asegurar que se oxide completamente a Sn(IV), minimizando así la posibilidad de que se forme de esta impureza.

Mondal et al. [56] y Gupta et al. [57] realizaron estudios en los que se demuestra la dependencia directa del valor de pH y de la concentración empleada para reducción del tecnecio-99m con la generación de la impureza coloidal de estaño.

III. $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$: este compuesto (también impureza radiocoloidal) se produce cuando el ligando al que se debe unir el isótopo, en este caso la nanopartícula, es el reactivo limitante; en disolución acuosa y en ausencia de un ligando al que unirse, el tecnecio reducido procede a la formación de su respectivo óxido [58,59].

- IV. $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$:** el pertecnetato es la especie precursora que puede considerarse impureza cuando la reducción es incompleta. La cantidad debe mantenerse en valores inferiores al 5 % para evitar que influya en la interpretación de la imagen de SPECT/CT de los estudios *in vivo*.

En este contexto se puede afirmar que es mejor emplear una concentración de SnCl_2 menor a la que permite una reducción completa del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, ya que proporciona unas condiciones de marcaje en las que aún no está favorecida la formación de impurezas radiocoloidales. La forma más obvia para asegurar que la reducción es incompleta es la presencia de un pequeño porcentaje de $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ en los radiocromatogramas de control de calidad, siendo aceptable hasta un 5 % de la radiactividad total. Por ello se considera que, de los parámetros testados, los más adecuados para preparar un equipo reactivo para el radiomarcaje con tecnecio-99m, de cualquiera de las tres formulaciones de NP y del HSA, son: 0,5 mg de formulación final, 40 μl de una disolución 0,05 mg/ml de SnCl_2 (2 $\mu\text{g}/\text{kit}$), atmósfera inerte hasta sequedad y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

La segunda fase del estudio consistió en la evaluación de estos radiomarcajes, tras su administración oftálmica, mediante imagen SPECT/CT a distintos tiempos post-administración, tal y como se describe en el apartado 3.6.

Los resultados muestran que el control de $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ presenta una baja actividad en ojo a las 4 horas post-administración, y una captación en estómago en los dos puntos temporales analizados. Tras la administración oftalmológica del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ cabe pensar que puede existir una absorción sistémica de la solución, bien sea por en el propio ojo o una vez en la cavidad nasal [60]; esto queda justificado por la captación estomacal sin paso a intestino.

Una vez en circulación el ion $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ penetra en el tejido gástrico mediante bombeo iónico [61] utilizando los transportadores de sodio-yodo (NIS)¹.

La ruta de eliminación del $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ no es clara en este estudio. En la práctica clínica la utilización del pertecnetato está asociada principalmente a la administración intravenosa; para estos casos su ficha técnica describe que la ruta principal de excreción es la vía renal [62]. Sin embargo, esto no se observa en los estudios realizados.

Al comparar el perfil de biodistribución de las formulaciones radiomarcadas con este control podemos deducir que mayoritariamente la actividad asociada al punto de administración es esencialmente $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$, ya que las dosis administradas tenían una actividad similar pero el tiempo de permanencia de la nanopartícula radiomarcada es muy superior.

El control de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA}$ permite apreciar de forma clara que el proceso de nanoencapsulación retrasa la eliminación, objetivo principal de un sistema de liberación sostenida. Este mismo resultado obtuvo Gupta et al. [63] quien demostró como la nanoencapsulación de Sparfloxacin (fluoroquinolona de nueva generación para tratar la conjuntivitis) encapsulado en nanopartículas de PGLA permitía aumentar hasta 6 veces el tiempo de residencia del fármaco en el ojo.

Las imágenes SPECT/CT de los tres tipos de nanopartícula evidencian que todas ellas permanecen un largo periodo de tiempo en el lugar de la administración. Sin embargo, el periodo de permanencia en ojo varía según el tipo de tratamiento empleado para estabilizar la formulación. Las $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$ son las que mayor tiempo de permanencia han mostrado.

Todas ellas muestran captación en estómago lo que sugiere que la ruta de excreción es

¹ NIS: proteína transportadora de yodo, siglas derivadas del inglés “Na/I Symporter”.

gastrointestinal. Sin embargo, al comparar la evolución en las tres formulaciones, las $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-GLU}$ no muestran actividad en el intestino a lo largo de todo el estudio, a diferencia de los otros dos tipos de NP. Esto podría indicar la existencia de un proceso alternativo en el que la interacción de las $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$ de liberación de del tecnecio-99m unido a ellas; esta liberación tendría como consecuencia la reoxidación del radiometal a $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, siendo esta especie la causante del foco de captación gástrica y no la nanopartícula marcada. Por otro lado, las recubiertas con PEG y Gantrez muestran actividad en intestino, siendo las últimas las que mayor captación muestran, siendo indicativo de ser la que más rápido se eliminan. En base a ello se considera que las NP recubiertas con Gantrez, de las tres formulaciones comparadas, son las menos adecuadas para la encapsulación del bevacizumab y por tanto en los posteriores estudios no serán consideradas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Dehaini, Di., Fang, R. H., Zhang, Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 30–46. <https://doi.org/10.1002/btm2.10004>.
- [2] A.I. Camacho, J. De Souza, S. Sánchez-Gómez, M. Pardo-Ros, J.M. Irache, C. Gamazo, Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice, *Vaccine.* 29 (2011) 8222–8229. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.121>.
- [3] S. Logothetidis, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-24181-9>.
- [4] Z. Cheng, A. Al Zaki, J.Z. Hui, V.R. Muzykantov, A. Tsourkas, Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, *Science (80-.).* 338 (2012) 903–910 . <https://doi.org/10.1126/science.1226338>.
- [5] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>.
- [6] M.C. Urrejola, L. V Soto, C.C. Zumarán, J.P. Peñaloza, B. Álvarez, I. Fuentevilla, Z.S. Haidar, *Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly)*, *Int. J. Morphol.* 36 (2018) 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>.
- [7] M. Otagiri, V.T. Giam Chuang, Albumin nanoparticles, in: M. Otagiri, V.T.G. Chuang (Eds.), *Albumin Med. Pathol. Clin. Appl.*, Springer Singapore, Singapore, 2016: pp. 91–96. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9>.

- [8] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release.* 157 (2012) 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>.
- [9] R.R. Kudarha, K.K. Sawant, Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches, *Mater. Sci. Eng. C.* 81 (2017) 607–626. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.004>.
- [10] Y. Jiang, M. Stenzel, Drug Delivery Vehicles Based on Albumin–Polymer Conjugates, *Macromol. Biosci.* 16 (2016) 791–802. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500453>.
- [11] A. Cifuentes-Rius, H. de Puig, J.C.Y. Kah, S. Borros, K. Hamad-Schifferli, Optimizing the Properties of the Protein Corona Surrounding Nanoparticles for Tuning Payload Release, *ACS Nano.* 7 (2013) 10066–10074. <https://doi.org/10.1021/nn404166q>.
- [12] L. Salvioni, M.A. Rizzuto, J.A. Bertolini, L. Pandolfi, M. Colombo, D. Prospero, Thirty years of cancer nanomedicine: Success, frustration, and hope, *Cancers (Basel)*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11121855>.
- [13] H. Niknejad, R. Mahmoudzadeh, Comparison of Different Crosslinking Methods for Preparation of Docetaxel-loaded Albumin Nanoparticles., *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.* 14 (2015) 385–94. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2015.1639>.
- [14] J.P. Van Miller, S.J. Hermansky, P.E. Losco, B. Ballantyne, Chronic toxicity and oncogenicity study with glutaraldehyde dosed in the drinking water of Fischer 344 rats, *Toxicology.* 175 (2002) 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00080-X).
- [15] R.P. Das, V. V. Gandhi, B.G. Singh, A. Kunwar, N.N. Kumar, K.I. Priyadarsini, Preparation of albumin nanoparticles: Optimum size for cellular uptake of

- entrapped drug (Curcumin), *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 567 (2019) 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.043>.
- [16] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [17] K. Yoncheva, S. Gómez, M.A. Campanero, C. Gamazo, J.M. Irache, Bioadhesive Properties of Gantrez Nanoparticles, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 205–218. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.205>.
- [18] P. Arbós, M. Wirth, M. Arangoa, F. Gabor, J. Irache, Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand–nanoparticle conjugates, *J. Control. Release.* 83 (2002) 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00015-9).
- [19] C.M. Gomes, A.J. Abrunhosa, P. Ramos, E.K.J. Pauwels, Molecular imaging with SPECT as a tool for drug development, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.015>.
- [20] Y. Seo, Quantification of SPECT and PET for Drug Development, *Curr. Radiopharm.* 1 (2010) 17–21. <https://doi.org/10.2174/1874471010801010017>.
- [21] D.E. Lee, H. Koo, I.C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim, I.C. Kwon, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/c2cs15261d>.
- [22] S. Lim, J. Park, M.K. Shim, W. Um, H.Y. Yoon, J.H. Ryu, D.K. Lim, K. Kim, Recent advances and challenges of repurposing nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy, *Theranostics.* 9 (2019) 7906–7923. <https://doi.org/10.7150/thno.38425>.
- [23] M. Yu, J. Zheng, Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles, *ACS Nano.* 9 (2015) 6655–6674. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01320>.

- [24] J. Kleynhans, A.F. Grobler, T. Ebenhan, M.M. Sathekge, J.-R. Zeevaart, Radiopharmaceutical enhancement by drug delivery systems: A review, *J. Control. Release.* 287 (2018) 177–193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.008>.
- [25] A.R. Fernandes, A. Oliveira, J. Pereira, P.S. Coelho, Nuclear Medicine and Drug Delivery, in: *Adv. Technol. Deliv. Ther., InTech*, 2017: p. 13. <https://doi.org/10.5772/65708>.
- [26] L. Cunha, K. Szigeti, D. Mathé, L.F. Metello, The role of molecular imaging in modern drug development, *Drug Discov. Today.* 19 (2014) 936–948. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.01.003>.
- [27] S.M. Janib, A.S. Moses, J.A. MacKay, Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 1052–1063. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.004>.
- [28] A. Kamkaew, E.B. Ehlerding, W. Cai, Nanoparticles as Radiopharmaceutical Vectors, in: *Radiopharm. Chem., Springer International Publishing, Cham*, 2019: pp. 181–203. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_10.
- [29] P. Martini, M. Pasquali, A. Boschi, L. Uccelli, M. Giganti, A. Duatti, Technetium complexes and radiopharmaceuticals with scorpionate ligands, *Molecules.* 23 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23082039>.
- [30] S.R. Banerjee, K.P. Maresca, L. Francesconi, J. Valliant, J.W. Babich, J. Zubietta, New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc: A reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design, *Nucl. Med. Biol.* 32 (2005) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.nuclmedbio.2004.09.001>.
- [31] M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps, Radionuclide and Radiopharmaceutical Production, in: *Phys. Nucl. Med., 4th ed., Elsevier*, 1987: pp. 43–68. <https://doi.org/10.1186/2197-7364-1-2>.
- [32] G.B. Saha, Radionuclide Generators, in: *Fundam. Nucl. Pharm., Springer*

- International Publishing, Cham, 2018: pp. 77–92.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-57580-3_5.
- [33] N. Chemistry, Handbook of Nuclear Chemistry, 2011.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2>.
- [34] W.C. Eckelman, S.M. Levenson, Radiopharmaceuticals labelled with Technetium, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 28 (1977) 67–82.
[https://doi.org/10.1016/0020-708X\(77\)90161-2](https://doi.org/10.1016/0020-708X(77)90161-2).
- [35] D. Fritzberg, A.R., Lyster, D.M, Dolphin, Evaluation of formamidine sulfinic acid and other reducing agents for use in the preparation of Tc-99m labeled radiopharmaceuticals., *Jounal Nucl. Med.* 18 (1977) 553–557.
- [36] A.G. Jones, C. Orvig, H.S. Trop, A. Davison, M.A. Davis, A survey of reducing agents for the synthesis of tetraphenylarsonium oxotechnetiumbis(ethanedithiolate) from [⁹⁹Tc] pertechnetate in aqueous solution, *J. Nucl. Med.* 21 (1980) 279–281.
- [37] A. Polyák, I. Hajdu, M. Bodnár, G. Trencsényi, Z. Pöstényi, V. Haász, G. Jánoki, G.A. Jánoki, L. Balogh, J. Borbély, ^{99m}Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities, *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.049>.
- [38] M.M. Kleiter, D. Yu, L.A. Mohammadian, N. Niehaus, I. Spasojevic, L. Sanders, B.L. Viglianti, P.S. Yarmolenko, M. Hauck, N.A. Petry, T.Z. Wong, M.W. Dewhirst, D.E. Thrall, A tracer dose of technetium-99m- labeled liposomes can estimate the effect of hyperthermia on intratumoral doxil extravasation, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6800–6807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0839>.
- [39] L. Farzin, S. Sheibani, M.E. Moassesi, M. Shamsipur, An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*.

- 107 (2019) 251–285. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36550>.
- [40] J.D. Eakins, D.G. Humphries, Preparation of technetium metal, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **25** (1963) 737. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(63\)80170-0](https://doi.org/10.1016/0022-1902(63)80170-0).
- [41] I. Luis de Redín, C. Boiero, M.C. Martínez-Ohárriz, M. Agüeros, R. Ramos, I. Peñuelas, D. Allemandi, J.M. Llabot, J.M. Irache, Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab, *Int. J. Pharm.* **541** (2018) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.003>.
- [42] J.M. Llabot, I. Luis de Redin, M. Agüeros, M.J. Dávila Caballero, C. Boiero, J.M. Irache, D. Allemandi, In vitro characterization of new stabilizing albumin nanoparticles as a potential topical drug delivery system in the treatment of corneal neovascularization (CNV), *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **52** (2019) 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.042>.
- [43] Ramos-Membrive, R., Luis de Redín, I., Quincoces Fernández, G., García García, B., Sancho Rodríguez, L., Ecay Ilzarbe, M., Irache, J.M., Richter Echevarría, J.Á., Peñuelas Sánchez I, 18th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **1** (2016) 10. <https://doi.org/10.1186/s41181-016-0012-6>.
- [44] Z. Niu, E. Samaridou, E. Jaumain, J. Coëne, G. Ullio, N. Shrestha, J. Garcia, M. Durán-Lobato, S. Tovar, M.J. Santander-Ortega, M.V. Lozano, M.M. Arroyo-Jimenez, R. Ramos-Membrive, I. Peñuelas, A. Mabondzo, V. Prétat, M. Teixidó, E. Giralt, M.J. Alonso, PEG-PGA enveloped octaarginine-peptide nanocomplexes: An oral peptide delivery strategy, *J. Control. Release.* **276** (2018) 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.004>.
- [45] P. Areses, M.T. Agüeros, G. Quincoces, M. Collantes, J.Á. Richter, L.M. López-Sánchez, M. Sánchez-Martínez, J.M. Irache, I. Penuelas, Molecular imaging techniques to study the biodistribution of orally administered ^{99m}Tc-labelled naive and ligand-tagged nanoparticles, *Mol. Imaging Biol.* **13** (2011) 1215–

1223. <https://doi.org/10.1007/s11307-010-0456-0>.
- [46] M. Sánchez-Martínez, R. da Costa Martins, G. Quincoces, C. Gamazo, C. Caicedo, J.M. Irache, I. Peñuelas, Radiolabeling and biodistribution studies of polymeric nanoparticles as adjuvants for ocular vaccination against brucellosis, *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol.* 32 (2013) 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.remn.2012.11.005>.
- [47] J.M. Da Costa Martins, R., Gamazo, C., Sánchez-Martínez, M., Barberán, M., Peñuelas, I., Irache, Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles, *J. Control. Release.* 162 (2012) 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.030>.
- [48] S. Gorantla, V.K. Rapalli, T. Waghule, P.P. Singh, S.K. Dubey, R.N. Saha, G. Singhvi, Nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and translational opportunity, *RSC Adv.* 10 (2020) 27835–27855. <https://doi.org/10.1039/d0ra04971a>.
- [49] S. Nandhakumar, M.D. Dhanaraju, V.D. Sundar, B. Heera, Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles, *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* 55 (2017) 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.06.003>.
- [50] N. Lomis, S. Westfall, L. Farahdel, M. Malhotra, D. Shum-Tim, S. Prakash, Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: Process optimization and in vitro characterization, *Nanomaterials.* 6 (2016). <https://doi.org/10.3390/nano6060116>.
- [51] R.K. Tekade, M. Tekade, Ocular Bioadhesives and Their Applications in Ophthalmic Drug Delivery, in: *Nano-Biomaterials Ophthalmic Drug Deliv.*, Springer International Publishing Switzerland, 2016: pp. 211–230. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29346-2_10.
- [52] L. Inchaurrega, N. Martín-Arbella, V. Zabaleta, G. Quincoces, I. Peñuelas, J.M.

- Irache, In vivo study of the mucus-permeating properties of PEG-coated nanoparticles following oral administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.021>.
- [53] D.L. Nosco, J.A. Beaty-Nosco, Chemistry of technetium radiopharmaceuticals 1: Chemistry behind the development of technetium-99m compounds to determine kidney function, *Coord. Chem. Rev.* 184 (1999) 91–123. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00058-2).
- [54] C. Maass, R.; Alvarez, J.; Arriaga, On a New Tracer for Liver Scanning, *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 18 (1967) 653–654.
- [55] H. Spies, H.J. Pietzsch, Stannous chloride in the preparation of 99mTc pharmaceuticals, in: *Technetium-99m Pharm. Prep. Qual. Control Nucl. Med.*, 2007: pp. 59–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_3.
- [56] N. Mondal, K.K. Halder, M.M. Kamila, M.C. Debnath, T.K. Pal, S.K. Ghosal, B.R. Sarkar, S. Ganguly, Preparation, characterization, and biodistribution of letrozole loaded PLGA nanoparticles in Ehrlich Ascites tumor bearing mice, *Int. J. Pharm.* 397 (2010) 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.049>.
- [57] H. Gupta, M. Aqil, R.K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, G. Mittal, S. Jain, Development and characterization of 99mTc-timolol maleate for evaluating efficacy of in situ ocular drug delivery system, *AAPS PharmSciTech.* 10 (2009) 540–546. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9238-x>.
- [58] U. Mazzi, R. Schibli, H.-J. Pietzsch, J.-U. Künstler, H. Spies, Technetium in Medicine, in: I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharm.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007: pp. 7–58. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_2.
- [59] G.B. Saha, *Radiopharmaceuticals and General Methods of Radiolabeling*, in: *Fundam. Nucl. Pharm.*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 93–

121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57580-3_6.

- [60] A. Urtili, Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1131–1135. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.027>.
- [61] H.A. Ziessman, J.P. O'Malley, J.H. Thrall, Chapter 1 - Radiopharmaceuticals, in: *Nucl. Med.* (Fourth Ed., 2014: pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00001-8>.
- [62] Mallinckrodt Radiopharmaceuticals Spain, Ficha técnica del Ultra-TechneKnow FM, (2016) 16.
- [63] H. Gupta, M. Aqil, R.K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, G. Mittal, Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.10.004>.

V. ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO: EVALUACIÓN DEL NANOSISTEMA

En este capítulo se describe el proceso de desarrollo y optimización del radiomarcaje con tecnecio-99m, de tres formulaciones de nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab; dos de ellas recubiertas con PEG y GLU, respectivamente. Asimismo, se evalúa la estabilidad del sistema tipo “kit” como método de marcaje y la biodistribución de las tres formulaciones radiomarcadas mediante imagen SPECT/CT.

1. INTRODUCCIÓN

La **inmunoterapia** es uno de los métodos más efectivos para el tratamiento del cáncer por su capacidad de estimular el sistema inmunológico natural del paciente. Esto ayuda al organismo no sólo a hacer frente a la enfermedad, sino que mejora su respuesta al tratamiento farmacológico pautado [1].

Como ya se describió en la introducción general (1.1, I), los tratamientos inmunoterápicos se han clasificado clásicamente como pasivos o activos [2,3]. **Los mAb** representan un grupo de inmunoterápicos pasivos que han cambiado sustancialmente el manejo de las enfermedades oncológicas; su capacidad inmunomoduladora produce una respuesta duradera con una toxicidad reducida, especialmente desde el desarrollo de técnicas de bioingeniería que permitieron su humanización [4].

La angiogénesis es esencial para el crecimiento y la progresión tumoral, razón por la que se ha convertido en una diana muy atractiva para controlar la diseminación tumoral. El **bevacizumab** es un anticuerpo mAb humanizado que se une de forma selectiva a cualquiera de las isoformas del VEGF [5], inhibiendo al creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura ya existente [6]. Su

forma farmacéutica se comercializa como solución para perfusión intravenosa y está indicada en la terapia de diversos tipos de cáncer metastásico en combinación con quimioterapia [7]. No obstante, en la práctica clínica también se emplea fuera de ficha técnica para el tratamiento de enfermedades en las que el VEGF está significativamente aumentado, tales como la telangiectasia hereditaria hemorrágica [8], diversos tipos de retinopatías [9,10], la neovascularización corneal [11] o el glaucoma [12].

La **encapsulación de inmunoterápicos**, permite incrementar su eficacia terapéutica y al mismo tiempo disminuir aún más la potencial toxicidad asociada a su administración [13,14]; en el caso concreto del bevacizumab, niveles elevados en sangre pueden producir proteinuria, tromboembolismo, perforación gastrointestinal, epistaxis o hemorragias [15,16].

En la literatura se describen numerosas plataformas para encapsular inmunoterápicos, incluyendo liposomas [17], micropartículas [18], nanopartículas [19], etc. Las NPs por sus propiedades físicas (tamaño, forma de la partícula, carga superficial, elasticidad, ...) pueden modificarse superficialmente para optimizar sus propiedades farmacocinéticas [20], mejorar el *targeting* del propio fármaco al receptor asociado o reducir la inmunogenicidad del mAb [21].

El uso del **HSA como matriz de nanosistema de liberación sostenida** presenta numerosas ventajas por ser una proteína abundante en el plasma cuya estructura primaria le permite interaccionar con multitud de moléculas [22–24]. Su empleo para la nanoencapsulación del bevacizumab [25] permite combinar los beneficios que ofrece la nanotecnología al campo de inmunoterapia por sus propiedades de sustancia natural, no tóxica, biodegradable y biocompatible [26].

El uso de la **imagen molecular con isótopos radiactivos** dota a la NP-HSA de carácter teragnóstico, permitiendo no sólo la monitorización de la biodistribución a tiempo real sino realizar una evaluación individualizada de cada administración de una forma sencilla [27], ayudando a valorar la eficacia y la distribución homogénea

de los nanosistemas, que puede verse influenciada no sólo por la variabilidad entre individuos, sino por el desarrollo de la patología que se desea tratar.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo ha sido la valoración de tres formulaciones de NP-HSA cargadas con bevacizumab; dos de ellas estabilizadas con glutaraldehído (reticulación química) o con PEG 35000 (mediante recubrimiento). Para ello se desarrolló un sistema tipo “kit” para cada formulación que permitiese el radiomarcaje directo de la cubierta con tecnecio-99m y su posterior evaluación *in vivo* tras su administración oftálmica en modelo animal.

3. METODOLOGÍA

3.1 Nanoencapsulación del bevacizumab

El departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica desarrolló una formulación de nanopartícula de HSA cargada con bevacizumab (NP-HSA-B). Para ello se añadieron 15 mg de Avastin® (preparación farmacéutica comercial de bevacizumab) a 7.5 ml de una disolución acuosa de 13.3 mg/ml de HSA, previamente acidificada (pH 4.9) con HCl 1M. Tras incubar la mezcla durante 10 minutos, se formaron las NP-HSA-B mediante adición de 16 ml de etanol bajo agitación magnética. Se eliminaron los disolventes orgánicos mediante evaporación a baja presión y se liofilizó en un liofilizador Génesis con una solución crioprotectora de sacarosa al 5 %.

Las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopia de correlación fotónica (TP y PD) y anemometría laser doppler (potencial z) empleando un analizador Zeta Plus. Para ello se resuspendieron las NP-HSA-B en agua tipo I con una proporción 1:10 (p/v) y la suspensión se midió a 25 °C con ángulo de 90°. Para determinar el potencial Z se resuspendieron (1/10) en una disolución de KCl 0,1 mM (pH = 7,4) y la disolución se midió a 25 °C con ángulo de 90°.

3.1.1 Estabilización de las nanopartículas de HSA con bevacizumab.

A partir de las NP-HSA-B se prepararon dos formulaciones adicionales, mediante el tratamiento de las NP-HSA-B "desnudas" con un agente reticulante químico (glutaraldehído) o con un excipiente farmacéutico para su recubrimiento (PEG 35000). Para ello una vez formadas las NP-HSA-B se incubaron a temperatura ambiente con una disolución de cada agente siguiendo el mismo protocolo empleado para las nanopartículas vacías (IV, 3.2.2 y 3.2.3). Los parámetros empleados se recogen en la Tabla V. 1 [28,29]. Finalizado este proceso los dos tipos de formulaciones fueron purificadas, liofilizadas y caracterizadas de igual modo que las NP-HSA-B.

Agente estabilizante	Formulación	% disolución acuosa (p/v)	Cantidad (µg)	Tiempo incubación (min)
---	NP-HSA-B	0	0,0	0
GLU	NP-HSA-B-GLU	4	12,5	5
PEG	NP-HSA-B-PEG	10	100,0	30

Tabla V. 1. Parámetros empleados en la estabilización de la formulación NP-HSA-B.

3.2 Desarrollo del sistema tipo “kit” para el radiomarcaje de las nanopartículas

3.2.1 Estudio de optimización de la especie reductora del sistema tipo “kit”.

Para el radiomarcaje directo con tecnecio-99m de la cubierta de los tres tipos de NPs que contienen bevacizumab encapsulado se realizó el mismo protocolo ya empleado para las nanopartículas vacías; para ello se determinó la cantidad de especie reductora de forma empírica, manteniendo el resto de los parámetros fijos (pH, actividad de tecnecio-99m, temperatura y tiempo de incubación), tal y como se

describe en el apartado 3.4 del capítulo IV.

Como especie reductora se empleó SnCl_2 y se testaron dos concentraciones: 0,5 mg/ml y 0,05mg/ml. Todos los viales se purgaron con helio hasta sequedad. Cada vial se marcó con una disolución de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ recién eluida (37 ± 20 MBq) obtenida de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Para la caracterización de las especies radiomarcadas se empleó cromatografía ascendente en papel Whatmann 3MM con tiras de 1 x10 cm, empleando como fase móvil NaCl 0,9 %. Se determinó la PRQ mediante lectura con un radiocromatógrafo MiniGita equipado con un detector 2 x 2 de NaI(Tl). Sobre los cromatogramas obtenidos se calculó el Rf y el % PRQ de cada compuesto, empleando el software Nina. Los criterios de aceptación empleados fueron los mismos que para las formulaciones de NP vacías (IV. 3.4.2).

3.2.2 Efecto de la preparación y radiomarcaje del sistema tipo “kit” sobre la calidad de las formulaciones

De aquellos equipos reactivos que mostraron mayor PRQ se evaluó el efecto del sistema tipo “kit” sobre la calidad de la NPs. Para ello de cada formulación se midió por triplicado el TP y el PDI antes de la preparación del “kit” y tras la incubación con la solución de tecnecio-99m (Figura V. 1). Se determinaron ambas variables por correlación fotónica empleando un analizador Zetamaster; las NP se resuspendieron en agua tipo I con una relación 1:10 y se midieron a 25 °C con ángulo de 90°.

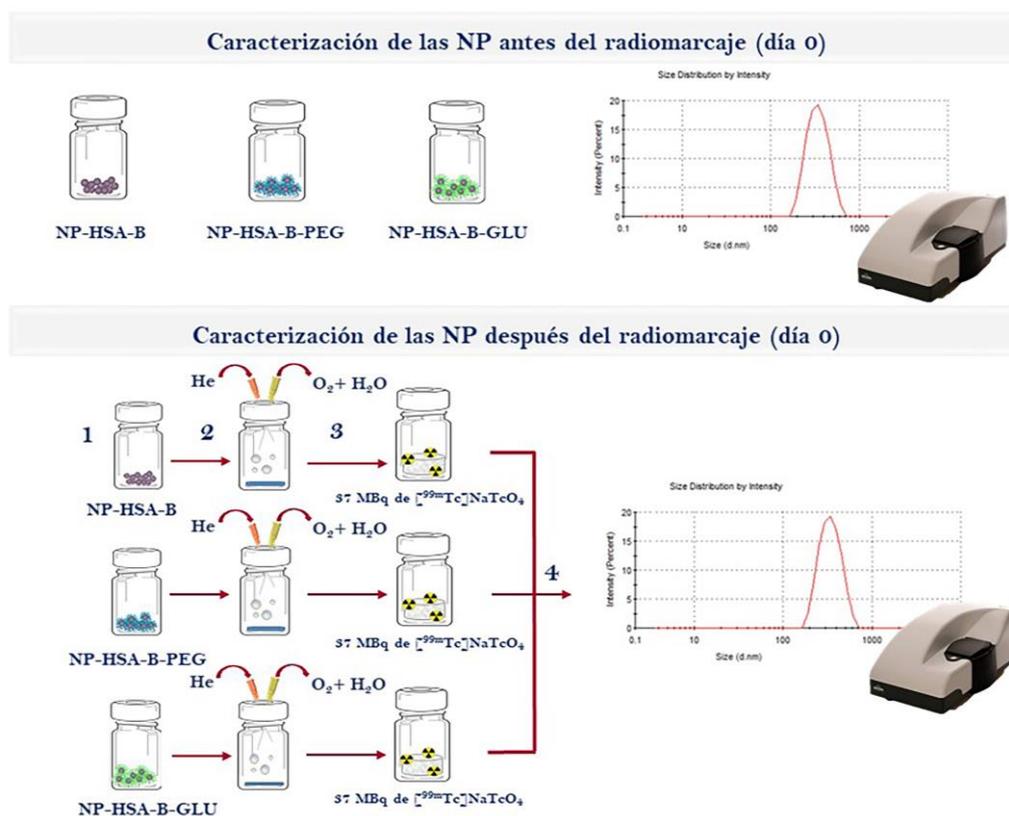


Figura V. 1. Medida del tamaño de partícula antes y después del radiomarcaje del sistema tipo “kit”. Los pasos intermedios hasta el marcate del equipo reactivo se han marcado sobre la imagen con la siguiente nomenclatura: **1.** Preparación del “kit” ($n=3$ por formulación), **2.** Purgado hasta sequedad; **3.** Radiomarcaje de los equipos reactivos con $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$; **4.** Determinación del tamaño de partícula tras 30 minutos de incubación.

Como criterios de aceptación se establecieron un valor de PDI $\leq 0,3$ y una variación del tamaño de partícula (VTP) inferior al 10%.

La variación del tamaño de partícula se calculó según la Ecuación V. 1

$$VTP_0 (\%) = \frac{\overline{TP}_{\text{antes de preparar el kit}} - \overline{TP}_{\text{tras radiomarcaje del kit}}}{\overline{TP}_{\text{antes de preparar el kit}}} \times 100$$

Ecuación V. 1. Variación del tamaño de partícula de las NPs analizadas asociada al proceso de preparación y radiomarcaje de los equipos reactivos.

3.3 Determinación de la estabilidad de los equipos reactivos

Se prepararon 18 kits de cada tipo de nanopartícula con la concentración de SnCl_2 determinada como adecuada en el estudio de optimización (V, 3.2.1). Todos ellos se conservaron 3 meses a una temperatura entre 2-8 °C; tres equipos reactivos de cada formulación se radiomarcaron periódicamente (0, 2, 25, 36, 67 y 98 días después de la preparación de los equipos reactivos) con una solución de $^{99m}\text{Tc}[\text{NaTcO}_4]$ recién eluida (37 ± 20 MBq). Tras incubarlos (30 minutos a temperatura ambiente), de cada uno de ellos se evaluó: la calidad del radiomarcaje (Rf y PRQ) y de la nanopartícula (TP y el PDI). En la Figura V. 2 se muestra un esquema del estudio de estabilidad.

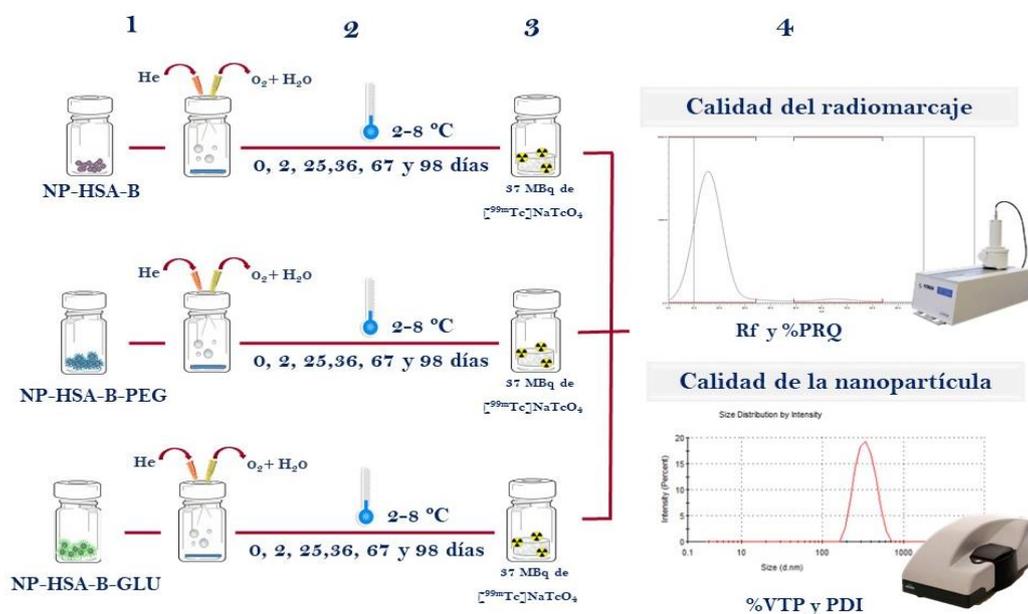


Figura V. 2. Esquema del estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” en un periodo de 3 meses. **1.** Preparación del sistema tipo “kit”; **2.** Almacenamiento en frío; **3.** Radiomarcaje con $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ e incubación durante 30 minutos; **4.** Determinación de la calidad del radiomarcaje y la nanopartícula.

3.3.1 Calidad del radiomarcaje

Se analizaron todos los equipos reactivos utilizando el mismo método analítico empleado para el estudio de optimización de la especie reductora (V, 3.2.1). Se compararon los resultados obtenidos tras cada radiomarcaje con los del día 0.

3.3.2 Calidad de la nanopartícula

Se determinó el TP y el PDI tras cada radiomarcaje siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.2. Los resultados se compararon con el tamaño de partícula medido antes de preparar los equipos reactivos. Se calculó de la variación de tamaño de partícula (VTP_n) se ha realizado según la Ecuación V. 2.

$$VTP(\%)_n = \frac{\overline{TP}_{\text{antes de preparar el kit}} - \overline{TP}_{\text{día n después de radiomarcaje}}}{\overline{TP}_{\text{antes de preparar el kit}}} \times 100$$

Ecuación V. 2. Variación del tamaño de partícula asociada al proceso de almacenamiento de los equipos reactivos. El cálculo se realiza el tamaño de partícula promedio.

3.3.3 Análisis de los datos

Los criterios de aceptación empleados en la evaluación de la estabilidad del sistema tipo “kit” quedan definidos en la Tabla V. 2.

Especie	Parámetro	Criterio de aceptación
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$	Rf	$0,0 \pm 0,1$
	PRQ	$\geq 95 \%$
	TP (nm)	$\Delta < 10 \%$
	PDI	$\leq 0,3$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	Rf	$1,0 \pm 0,1$
	PRQ	$\leq 5 \%$

Tabla V. 2. Parámetros de evaluación fijados para el ensayo de determinación de la estabilidad del sistema tipo “kit”.

3.4 Estudios de biodistribución *in vivo* en animales

Para realizar los estudios de biodistribución *in vivo* se empleó aquel equipo reactivo, de cada tipo de NP que, durante el estudio de optimización de la especie reductora, presentó mayor % PRQ de la especie $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$.

Tras el marcaje, cada “kit” se completó con su respectiva formulación de NP hasta alcanzar de 1mg de nanopartícula. Se establecieron tres grupos, uno por cada formulación radiomarcada ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$), con tres animales por grupo. A cada animal se le administró en el ojo izquierdo una dosis única de 10 μl ($1,36 \pm 0,3$ MBq) de la

suspensión radiomarcada correspondiente. Los animales fueron anestesiados con un 2 % de isoflurano durante la administración y la hora posterior, a fin de evitar que se lo retiraran antes de su absorción.

Se obtuvieron imágenes SPECT/CT de los tres grupos a 1, 2, 4, 6, 8 y 10 horas post-administración. Los animales fueron anestesiados antes de cada estudio y colocados en posición prono en el equipo SPECT-CT. El tiempo de adquisición fue modificado en función del tiempo transcurrido desde la administración para eliminar el efecto del decay del tecnecio-99m en la adquisición de la imagen. El CT se programó a 110 mAs y 130 Kv, 130 imágenes de 3 mm de espesor.

Todas las imágenes fueron analizadas de forma cualitativa con el software Syngo MI Applications TrueD. Para el análisis cuantitativo se dibujaron Volúmenes de Interés (VOIs) en todas las imágenes SPECT/CT, sobre el punto de administración, el abdomen y el cuerpo completo de todos los animales utilizando el software Pmod. Con los datos de actividad obtenidos de los VOIs se determinó:

- **El perfil de biodistribución de las $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$** , mediante el cálculo del porcentaje de radioactividad (% Radioactividad) en el ojo izquierdo y en el abdomen respecto a la actividad total cuantificada en ese mismo animal (Ecuación V. 3).

$$\% \text{ Radioactividad} = \frac{\text{Actividad del \u00f3rgano}_{x(h)\text{tras la administraci\u00f3n}}}{\text{Actividad total animal}_{x(h)\text{tras la administraci\u00f3n}}} \times 100$$

Ecuaci\u00f3n V. 3. C\u00e1lculo del %Radioactividad en ojo o abdomen. Actividad cuantificada en cada VOI dibujado (sobre ojo o abdomen) a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada en ese mismo animal (VOI cuerpo completo) en el mismo punto temporal.

- **El perfil de permanencia de las suspensiones radiomarcadas (% PSR) del punto de administraci\u00f3n** calculando el porcentaje de radioactividad en el ojo a lo largo del tiempo (Ecuaci\u00f3n V. 4).

$$\% \text{ PSR} = \frac{\text{Actividad del ojo } x \text{ (h) tras la administración}}{\text{Actividad del ojo } 1 \text{ hora tras la administración}} \times 100$$

Ecuación V. 4. *Calculo del porcentaje de permanencia de la suspensión radiomarcada. Actividad cuantificada en cada VOI dibujado sobre ojo izquierdo a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada 1 hora después de la administración sobre el ojo izquierdo.*

4. RESULTADOS

4.1 Preparación de las nanopartículas de HSA con bevacizumab

El TP de la formulación NP-HSA-B mostró un tamaño similar la NP-HSA-B-PEG. Sin embargo, el valor de potencial Z fue menor cuando la formulación se recubrió con PEG-35000. Por otro lado, las NP-HSA-B-GLU mostraron el menor tamaño de partícula y de potencial Z. El PDI de las tres formulaciones fue inferior a 0,2.

En la Tabla V. 3 se resumen las principales características fisicoquímicas halladas tras la preparación de los tres tipos de NPs.

Formulación	TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
NP-HSA-B	310 ± 3	0,14 ± 0,02	-14,0 ± 1,0
NP-HSA-B-GLU	180 ± 3	0,11 ± 0,01	-36,0 ± 1,0
NP-HSA-B-PEG	301 ± 3	0,13 ± 0,03	-17,0 ± 1,0

Tabla V. 3. Resultados del tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de las nanopartículas de cada formulación estudiada.

4.2 Desarrollo del sistema tipo “kit” para el radiomarcaje de las nanopartículas.

4.2.1 Estudio de optimización de la cantidad de especie reductora de los equipos reactivos.

La cantidad de cloruro de estaño (II) fue optimizada para el radiomarcaje de todas las formulaciones (NP-HSA-B, NP-HSA-B-PEG y NP-HSA-B-GLU) mediante la caracterización de todas las especies radiomarcadas por radiocromatografía (Tabla V. 4).

Equipo reactivo	[SnCl ₂]=0,05 mg/ml				[SnCl ₂]=0,5 mg/ml			
	[^{99m} Tc]Tc-NP		[^{99m} Tc]NaTcO ₄		[^{99m} Tc]Tc-NP		[^{99m} Tc]NaTcO ₄	
	%PRQ	Rf	%PRQ	Rf	%PRQ	Rf	%PRQ	Rf
NP-HSA-B	97	-0,03	3	0,96	99	0,02	1	1,00
NP-HSA-B-GLU	96	0,00	4	0,99	100	-0,02	0	0,98
NP-HSA-B-PEG	98	-0,01	2	1,00	100	0,00	0	0,99

Tabla V. 4. Resultados de la pureza radioquímica de los distintos equipos reactivos elaborados en el estudio de optimización de la especie reductora para el desarrollo de un sistema tipo “kit”.

Todos los radiomarcajes exhibieron valores de % PRQ superiores a 95. Los valores máximos de pureza corresponden a los radiomarcajes que emplearon la disolución [SnCl₂]= 0,5 mg/ml. Sin embargo, tal y como se discutió en el capítulo IV, utilizar una cantidad de SnCl₂ inferior a la necesaria para que se produzca una reducción completa del [^{99m}Tc]NaTcO₄, favorece que no se formen de impurezas radiocoloidales. Por tanto, para los estudios del sistema tipo “kit” y los estudios de biodistribución *in vivo* se realizaron con los equipos reactivos de cada NP con [SnCl₂]=0,05 mg/ml.

4.2.2 Efecto de la preparación y radiomarcaje del sistema tipo “kit” sobre la calidad de las formulaciones

El TP mostró un incremento tras el proceso de preparación y radiomarcaje de los kits. En todos el %VTP₀, medidos antes y después fue inferior al 10 % y con valores de PDI < 0,3 (Tabla V. 5).

Formulación	Antes de la preparación de los kits		Tras la preparación y el marcaje de los kits		VTP ₀ (%)
	TP (nm)	PDI	TP (nm)	PDI	
NP-HSA-B	244 ± 5	0,17 ± 0,02	263 ± 4	0,26 ± 0,05	8
NP-HSA-B-GLU	193 ± 6	0,16 ± 0,05	205 ± 2	0,18 ± 0,02	6
NP-HSA-B-PEG	229 ± 4	0,28 ± 0,02	247 ± 2	0,29 ± 0,09	8

Tabla V. 5. Tamaños de partícula de las tres formulaciones antes y después de la preparación de los equipos reactivos.

4.3 Determinación de la caducidad de los equipos reactivos

4.3.1 Calidad del radiomarcaje

Los resultados obtenidos el día 0 indicaron la presencia de dos especies: [^{99m}Tc]Tc-NP y [^{99m}Tc]NaTcO₄. El valor promedio de los resultados obtenidos para cada formulación se resume en la Tabla V. 6.

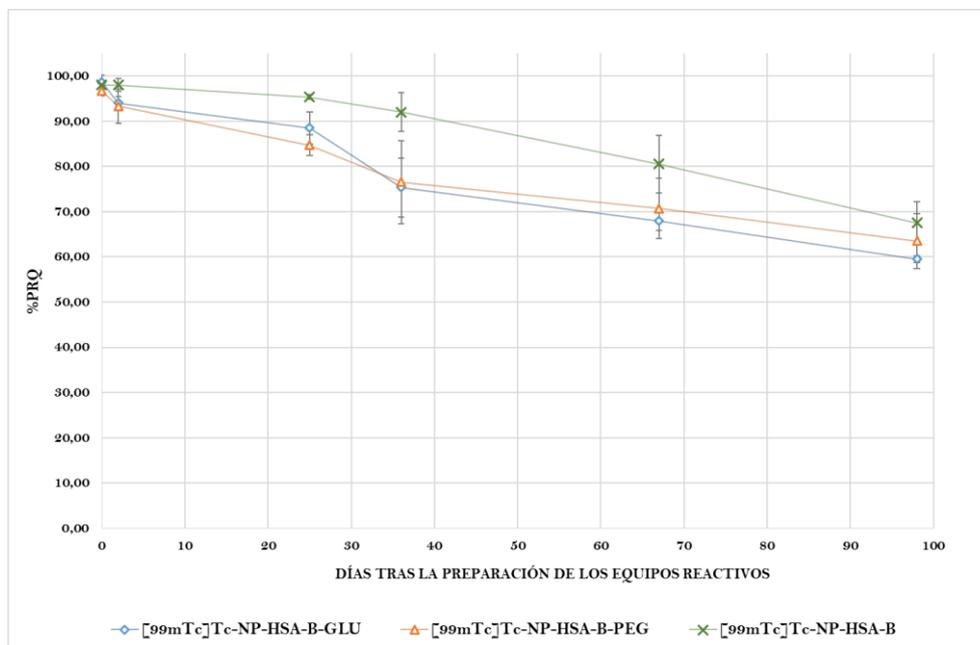
Formulación de NP	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$		$[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	
	%PRQ	Rf	%PRQ	Rf
NP-HSA-B	98,00	0,02	2,00	0,94
NP-HSA-B-GLU	98,67	0,00	1,33	1,00
NP-HSA-B-PEG	96,57	0,01	3,33	0,99

Tabla V. 6. % PRQ y Rf de los equipos reactivos, según el tipo de formulación empleada, el día de la preparación (día 0) de los kits para el estudio de estabilidad.

Durante el estudio de estabilidad sólo se detectaron 2 especies radiomarcadas $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$ ($Rf = 0 \pm 0,02$) y $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ ($Rf = 1 \pm 0,0$).

El valor del % PRQ de la $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$ descendió para todos los tipos de nanopartícula a lo largo del tiempo evaluado. Sin embargo, la disminución fue más rápida en las formulaciones NP-HSA-B-PEG y NP-HSA-B-GLU; ambas obtuvieron un valor de PRQ < 95 % después de almacenarlas 2 días (Gráfica V. 1). Este descenso progresó a lo largo del tiempo del estudio, hasta alcanzar un % PRQ de 59,50 para la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$ y 63,50 para $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ después de 98 días.

Los kits evaluados de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$ mostraron una elevada pureza hasta 25 días después de su preparación (% PRQ > 95); a los 36 días existe una pérdida discreta del rendimiento de marcaje (92,33 %), que descendió de forma gradual hasta alcanzar un % PRQ = 31 después de 98 días de almacenamiento.

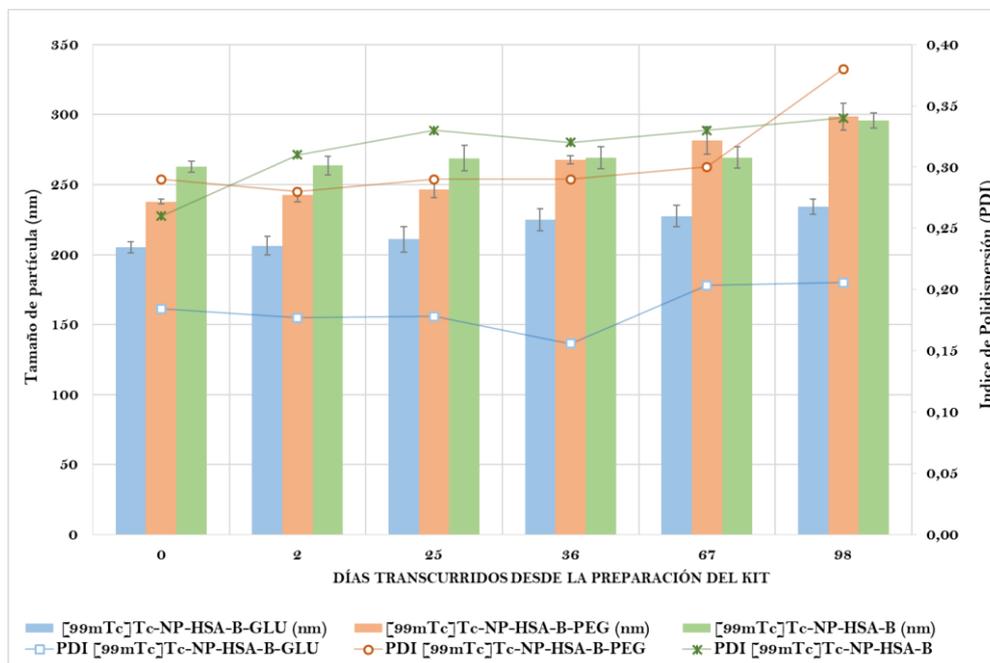


Gráfica V. 1. Resultados de la del estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” (n=3).

4.3.2 Calidad de la nanopartícula

El TP aumentó en todas las NPs a lo largo del estudio, aunque de forma diferente en función del tipo de la formulación (Gráfica V. 2). La NP-HSA-B tuvo un % VTP_n del 6 - 9 % hasta los 67 días de almacenamiento. Sin embargo, a partir del día 2 mostró valores de PDI > 0,3 hasta el final del estudio.

Las formulaciones NP-HSA-B-PEG y NP-HSA-B-GLU tuvieron un % VTP_n < 10 después de 25 días y tras 36 de almacenamiento alcanzó el 17%. A partir de entonces NP-HSA-B-PEG tuvo un incremento mayor y más rápido hasta el final del estudio (Tabla V. 7). El valor promedio de PDI para ambas fue inferior a 0,3 en todos los puntos temporales, a excepción del último punto temporal analizado para la de NP-HSA-B-PEG (PDI =0.38)



Gráfica V. 2. Evolución del tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” según el tipo de nanopartícula.

Días	VTP _n (%)		
	[^{99m} Tc]Tc-NP-HSA-B-GLU	[^{99m} Tc]Tc-NP-HSA-B-PEG	[^{99m} Tc]Tc-NP-HSA-B
0	6	4	8
2	7	6	8
25	9	8	10
36	17	17	10
67	18	23	10
98	21	30	21

Tabla V. 7. Variación del tamaño de partícula a lo largo del estudio de caducidad del sistema tipo “kit”.

4.4 Estudios de biodistribución in vivo en animales

La Figura V. 3 muestra de forma representativa las imágenes de SPECT/CT de un animal de cada grupo (n = 3/ por formulación analizada). Asimismo, junto a ellas se presentan los resultados promedio del % Radioactividad en el ojo izquierdo y en el abdomen a lo largo del estudio.

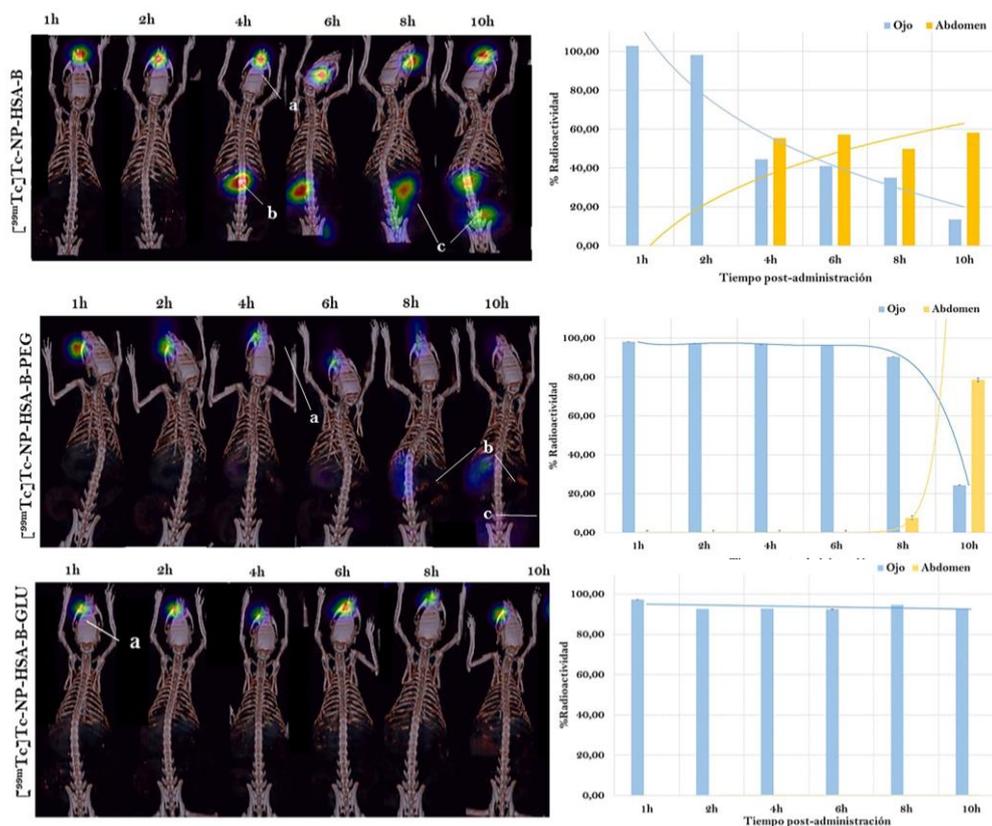


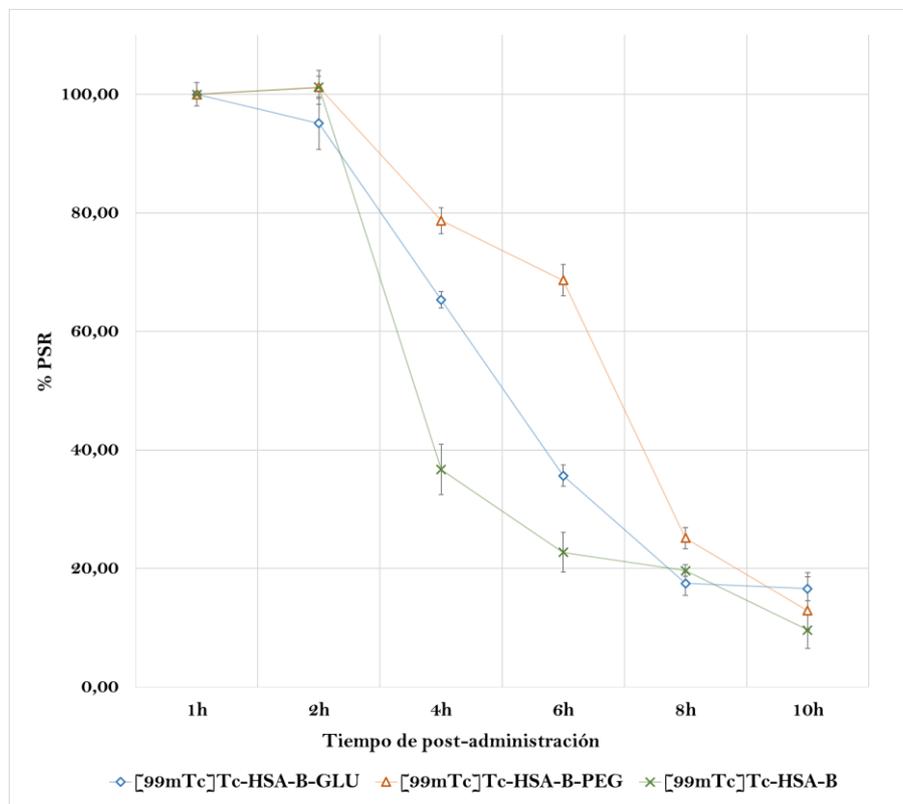
Figura V. 3. Imágenes estáticas SPECT/CT y % Radioactividad de las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$. Las imágenes de cada fila corresponden al mismo animal a lo largo del estudio. El tiempo post-administración está indicado en la parte superior las imágenes. Las localizaciones anatómicas de los focos de captación se han marcado con la siguiente nomenclatura: **a.** Punto de administración: ojo izquierdo; **b.** Estómago; **c.** Intestino. Las gráficas dispuestas a la derecha de las imágenes SPECT/CT representan el promedio de la actividad (cuentas) obtenidas en los VOIs dibujados sobre los animales estudiados para cada tipo de NP ($n=3$). Los resultados están expresados en % Radioactividad; este parámetro se ha calculado dividiendo la actividad cuantificada en el ojo (azul) entre la actividad total cuantificada en ese animal en ese mismo punto temporal. Se ha operado de igual forma para el cálculo del porcentaje en el abdomen (amarillo).

La biodistribución de las tres formulaciones analizadas en este capítulo es igual durante las primeras 2 horas, con un foco de actividad principal localizado en el punto de administración, pero a partir de las 4 horas los tiempos de permanencia difieren en función del recubrimiento de la NP.

El análisis cuantitativo realizado en el ojo y abdomen respecto a la actividad total de animal indicó que:

- El perfil de excreción de las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ es gastrointestinal, mientras en función de las imágenes adquiridas, el perfil de la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$ es desconocido.
- Tras 4 horas el porcentaje de actividad en ojo de la suspensión $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$ disminuyó hasta $44,56 \pm 0,16$ %. A partir de entonces el descenso fue progresivo hasta la finalización del estudio ($44,56 \pm 0,16$ % a las 6 horas, $35,01 \pm 0,41$ % a las 8 horas y $13,58 \pm 0,12$ % a las 10h). Por otro lado, la actividad en el abdomen mantuvo valores similares en el mismo periodo de tiempo ($55,39 \pm 0,17$ % a las 4 horas, $57,22 \pm 0,36$ % a las 6 horas, $49,90 \pm 0,40$ % a las 8 horas y $58,20 \pm 0,44$ % a las 10 horas).
- La formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ no mostró actividad abdominal hasta las 8 horas post-administración ($7,63 \pm 0,03$ %) y posteriormente aumentó hasta alcanzar un porcentaje de actividad del $78,54 \pm 0,07$ % tras 10 horas.
- La formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$ se mantuvo en el ojo izquierdo durante las 10 horas de estudio con un porcentaje de actividad mínimamente inferior al cuantificado 1 hora después su administración ($92,75$ % vs $97,22$ %).

El % PSR permitió cuantificar como se eliminaba cada suspensión radiomarcada del punto de administración (Gráfica V. 3); este parámetro compara la actividad en el ojo izquierdo a lo largo del tiempo respecto a la actividad cuantificada a 1 hora post-administración (Ecuación V. 4).



Gráfica V. 3. Permanencia de la suspensión radiomarcada (% PSR); se representa el promedio de la actividad cuantificada en ojo izquierdo a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada en el mismo animal 1 hora tras la administración de la suspensión de nanopartícula radiomarcada correspondiente.

Comparando la evolución del % a lo largo del tiempo en función del tipo de NP puede observarse:

- Que existe una disminución progresiva de la actividad administrada para los tres tipos de NP, ya que la $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA-B-GLU}$ se elimina del ojo, a pesar de que no se observe tránsito gastrointestinal en las imágenes SPECT/CT.
- La pendiente de eliminación de la suspensión radiomarcada es mayor para la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HSA-B}$ que para las NPs recubiertas.

- La interacción con el ojo de la NP recubierta varía en función del agente estabilizante empleado, obteniendo a un mismo tiempo un menor % ESR para la formulación pegilada.

5. DISCUSIÓN

Existen diversos métodos para la preparación de nanopartículas de albúmina; pueden ser físicos (gelación térmica, nanosecado por aspersión, técnica NAB (NP unida a la albúmina) o químicos (desolvatación, emulsificación, autoensamblaje) [30]. De ellos la desolvatación es una técnica muy utilizada por ser rápida, reproducible y sencilla, aunque requiere una estabilización posterior a la formación de la NP, como ya se expuso en capítulo IV. Sin embargo, la construcción de una matriz de HSA con bevacizumab mediante desolvatación (NP-HSA-B), permite obtener nanopartículas estables sin necesidad de procesos adicionales. En su estudio de desarrollo y caracterización de esta formulación Luis de Redin et al., [29] propuso que las interacciones proteína-proteína entre el bevacizumab y el HSA pueden ser las responsables de dicha estabilidad. En este contexto no es necesario el empleo de agentes estabilizantes para obtener un nanosistema estable, aunque este tipo de modificación superficial sigue siendo una forma de mejorar las propiedades de las NP [31,32]. En este capítulo se ha evaluado cómo influye el recubrimiento con PEG-35000 y GLU sobre la formulación HSA-B en el desarrollo un sistema tipo “kit” para su marcaje con tecnecio-99m y en su biodistribución tras administración oftálmica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de las NP tras su formación, evidenciaron un mayor TP y un incremento del potencial Z de la formulación NP-HSA-B (310 nm vs 180 nm; -14mV vs -36 mv) respecto a la recubierta con GLU; al compararla con la formulación pegilada la diferencia no fue tan relevante (310 nm vs 301 nm; -14 mV vs -17 mV). No obstante, las tres

formulaciones mostraron homogeneidad en los tamaños de las poblaciones medidas (PDI < 0,15).

Para realizar el marcaje directo de las formulaciones con tecnecio-99m se empleó un sistema tipo “kit”, para el cual se optimizó la cantidad de agente reductor. Los resultados de los análisis radiocromatográficos indican que las dos concentraciones testadas permitieron obtener purezas radioquímicas elevadas. Sin embargo, a la hora de seleccionar el equipo reactivo más adecuado se optó por los preparados con la menor concentración de SnCl₂ (0,05 mg/ml) para todas las formulaciones, tal y como ya se describió en el apartado 3.2.1 del presente capítulo.

Los resultados de evaluación de las NPs tras el proceso de preparación y radiomarcaje de este “kit” indicaron que tras su reconstitución hay un aumento del TP del 6-8 %; dicho aumento puede estar relacionado con el proceso de purgado con helio hasta sequedad realizado durante la elaboración del “kit”. La generación de una atmósfera inerte no es indispensable para radiomarcarse NP con tecnecio-99m con elevados rendimientos [33-35], pero permite obtener excelentes resultados con una cantidad de SnCl₂ menor. Los equipos reactivos evaluados en este capítulo contienen 2 µg de sales de estaño por “kit”, respecto a los 20 µg/kit empleados por K.K. Halder et al. [36] para radiomarcarse nanopartículas de PGLA cargadas con cloranfenicol. Este hecho es importante, pues una menor cantidad de SnCl₂ permite minimizar la posibilidad de que se generen impurezas radiocoloidales indeseadas. Además, evita que se forme el [^{99m}Tc]TcO₂, como ya se explicó detalladamente en el apartado 5 del capítulo IV.

El purgado con helio se realizó hasta llegar a sequedad. Este procedimiento tuvo la finalidad de mantener estable la matriz de las nanopartículas tras su dispersión en la disolución acuosa de SnCl₂, de una forma similar a un proceso de liofilización. La liofilización es una técnica de deshidratación que permite aumentar el tiempo de vigencia de las formulaciones de NPs después de su preparación [37,38]. Esta técnica es muy utilizada para la preparación de numerosas fórmulas farmacéuticas,

como por ejemplo los equipos reactivos que se emplean en la Unidades de Radiofarmacia para preparar RF convencionales [39]. El purgado con helio no es un proceso tan agresivo como la liofilización, pero también genera un estrés sobre las NP, acrecentando la posibilidad de agregación, especialmente en aquellas con mayor potencial Z [40]. Esto se puede advertir en los resultados obtenidos en este estudio, en los que el menor aumento de tamaño se produjo en la formulación con menor valor de potencial Z (NP-HSA-B-GLU). No obstante, todos cumplieron los criterios de aceptación establecidos para dar por válidos los equipos reactivos ($VTP_0 < 10\%$ y $PDI < 0,3$).

La segunda fase del estudio determinó el periodo de estabilidad del sistema tipo “kit”. A la hora de evaluar la estabilidad del sistema se debe tener en cuenta dos aspectos:

I. La calidad del radiomarcaje, que debe asegurar que, tras su reconstitución, independientemente del tiempo de almacenamiento, permita obtener para la especie $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP}$ con un $\% \text{PRQ} > 95$. En este contexto, los equipos reactivos de NP-HSA-B mostraron un elevado porcentaje nanopartícula marcada ($\% \text{PRQ} > 95$) hasta 25 días después de su preparación, mientras las nanopartículas recubiertas no alcanzaron el valor mínimo de PRQ establecido en los criterios de evaluación tras su reconstitución tras 2 días de almacenamiento.

La disminución de PRQ de los equipos reactivos puede estar relacionada con una pérdida progresiva de la atmosfera inerte generada dentro de los viales [41,42]. Esto implica que haya una oxidación parcial del agente reductor y coexista el estaño en sus dos estados de oxidación (Sn^{+2} y Sn^{+4}), perdiendo parte así de su capacidad reductora [43].

II. La calidad de las nanopartículas, que debe quedar preservada pues determina el comportamiento *in vivo* del nanosistema y su perfil de biodistribución. Para evaluarlos se valoraron el PDI y el TP.

El PDI indica cuan heterogénea es la distribución de la población de NP; se calcula dividiendo la desviación estándar de los tamaños medidos entre el tamaño de partícula promedio [44]. La presencia de una pequeña cantidad de agregados puede resultar en valores superiores a los considerados como “óptimos”, que en el campo de los nanosistemas de liberación sostenida se establece en $PDI \leq 0,3$ [45].

La formulación NP-HSA-B obtuvo valores de $PDI > 0,3$ desde el 2º día de almacenamiento del “kit”. A partir de entonces, y hasta la finalización del estudio, el PDI y el TP mantuvieron valores similares, lo que sugiere la presencia de pequeñas proporciones de agregados en los kits.

Por otro lado, las formulaciones recubiertas mantuvieron poblaciones homogéneas con valores de $PDI < 0,3$ y casi constante durante todo el estudio. Sin embargo, tuvieron un % VTP_n que aumentó de forma progresiva durante los 98 días de almacenamiento.

Estos datos están en línea con los obtenidos por M.G. Anhorn et al. [46], quien evidencia como el proceso de liofilización puede producir un aumento del tamaño de partícula y del PDI en NPs con matriz de HSA en ausencia de excipientes; de las tres matrices de HSA que este autor compara (sin modificar, pegilada y cargada con doxorubicina) la que mayor tamaño de partícula presenta tras la reconstitución es la pegilada.

En este contexto se puede afirmar que los equipos reactivos en ausencia de excipientes y empleando el purgado con helio hasta sequedad presentan periodos de validez muy limitados. Por tanto, para formulaciones de NP-HSA es preferible que la preparación del “kit” y el radiomarcaje se hagan el mismo día.

Por último se evaluaron los radiomarcajes en un modelo *in vivo*, tras su administración oftálmica, mediante imagen SPECT/CT a distintos tiempos post-administración, tal y como se describe en el apartado 3.3.3.

Del análisis de las imágenes se observa que el perfil de excreción de las tres

formulaciones de NPs parece ser gastrointestinal, al igual que en los estudios *in vivo* del capítulo anterior (IV, 4.3). Sin embargo, se aprecia una ralentización de la excreción de formulaciones cargadas con bevacizumab y recubiertas (NP-HSA-B-PEG y NP-HSA-B-GLU) respecto a sus homólogas vacía (NP-HSA-PEG y NP-HSA-GLU) que ya mostraban focos de captación en estómago a las 6 horas post-administración.

Los resultados de los estudios de este capítulo indican que todas las formulaciones tienen permanencia en ojo durante 8 horas; esto prueba la eficacia del nanosistema NP-HSA para permanecer en punto de administración, punto clave en los tratamientos oftalmológicos tópicos, ya que es allí donde se debe dar la liberación controlada del fármaco [47]. La permanencia de los nanosistemas en el ojo puede deberse a interacciones de Van der Waals entre la NP y las proteínas de la mucosa ocular [48,49].

Las diferencias entre de los perfiles de biodistribución de los modelos *in vivo* pueden relacionarse con el potencial Z, el tamaño de partícula y el tipo tratamiento de estabilización aplicado a la NP. Estos tres parámetros son determinantes en la interacción entre la nanopartícula y la mucosa del ojo [50–52], condicionando entre otros procesos la producción de lágrima, lo que puede acelerar de forma indeseada la eliminación de la suspensión. De las tres formulaciones estudiadas la NP-HSA-B es la que más rápido se excreta, con un paso a estómago en las primeras 4 horas tras su administración y un menor % PSR si se compara con las formulaciones recubiertas.

La NP-HSA-B-GLU fue la única formulación de la que no se visualiza el paso a través del sistema gastrointestinal en el periodo estudiado, aunque el % PSR en ojo indicó que hubo eliminación de la superficie ocular, como resultado de los diferentes procesos fisiológicos del ojo para eliminar cuerpos extraños. Sin embargo, durante el desarrollo de estos experimentos Luis de Redín et al. [53] demostró que tras la reticulación con este agente el bevacizumab se inactiva, comprometiendo la eficacia

del tratamiento. Por tanto, esta formulación no puede considerarse para ser vehículo de liberación sostenida de dicho mAb.

Por otra parte, el análisis cuantativo de los estudios de biodistribución mostraron que la pegilación de la formulación NP-HSA-B permite aumentar hasta 2 veces el % PRS en ojo durante las 6 primeras horas del estudio. En base a ello se considera que, de las formulaciones de NP estudiadas, la NP-HSA-B-PEG es la más adecuada para la encapsulación del bevacizumab.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Abbott, Y. Ustoyev, Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy, *Semin. Oncol. Nurs.* 35 (2019) 150923. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.002>.
- [2] R. Zhang, M.M. Billingsley, M.J. Mitchell, Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy, *J. Control. Release.* 292 (2018) 256–276. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.008>.
- [3] M.M. Durán de Rueda, Anticuerpos monoclonales, *Univ. Med.* 26 (1984) 111–118.
- [4] K. Wudhikarn, B. Wills, A.M. Lesokhin, Monoclonal antibodies in multiple myeloma: Current and emerging targets and mechanisms of action, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 33 (2020) 101143. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2020.101143>.
- [5] G.J. Weiner, Building better monoclonal antibody-based therapeutics, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc3930>.
- [6] N.J. Montes-Vera, M., Garrido-Acosta, O., Anguiano-Robledo, L., Sánchez-Navarrete, J., Pérez-Cruz, E., Rodríguez-Wong, U., Cruz-Rico, J., Ruiz-Pérez, Aspectos farmacocinéticos de bevacizumab, *Rev Hosp Jua Mex.* 80 (2013) 73–78.
- [7] EMA, Ficha técnica avastin, in: Gen. Sess. Abstr., ema, 2012: pp. S5-3-S5-3. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/avastin-epar-product-information_es.pdf.
- [8] B.T. Brinkerhoff, N.W. Choong, J.S. Treisman, D.M. Poetker, Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Am. J. Otolaryngol.* 33 (2012) 349–351. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2011.07.012>.

- [9] A.M. Dascalu, A. Popa-Cherecheanu, M. Popa-Cherecheanu, A. Nica, D. Serban, “Off-label” use of intravitreal bevacizumab in non-ischemic macular edema secondary to retinal vein obstructions, *Rom. J. Ophthalmol.* 60 (2016) 90–95.
- [10] L.M. Jampol, A.R. Glassman, J. Sun, Evaluation and Care of Patients with Diabetic Retinopathy, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 1629–1637. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1909637>.
- [11] W. Stevenson, S.-F. Cheng, M.H. Dastjerdi, G. Ferrari, R. Dana, Corneal Neovascularization and the Utility of Topical VEGF Inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs Bevacizumab (Avastin), *Ocul. Surf.* 10 (2012) 67–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2012.01.005>.
- [12] A. Khanna, Bevacizumab in Glaucoma: Where do We Stand?, *J. Curr. Glaucoma Pract.* 6 (2012) 75–78. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10008-1110>.
- [13] Tran, Tran, Nanoconjugation and Encapsulation Strategies for Improving Drug Delivery and Therapeutic Efficacy of Poorly Water-Soluble Drugs, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 325. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070325>.
- [14] D.H. Truong, V.K.H. Le, T.T. Pham, A.H. Dao, T.P.D. Pham, T.H. Tran, Delivery of erlotinib for enhanced cancer treatment: An update review on particulate systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101348>.
- [15] S. Taugourdeau-Raymond, F. Rouby, A. Default, M.-J. Jean-Pastor, Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68 (2012) 1103–1107. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1232-7>.
- [16] A.T. Falk, J. Barrière, E. François, P. Follana, Bevacizumab: A dose review,

- Crit. Rev. Oncol. Hematol. 94 (2015) 311–322.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.012>.
- [17] S. Ebrahim, G.A. Peyman, P.J. Lee, Applications of liposomes in ophthalmology, *Surv. Ophthalmol.* 50 (2005) 167–182.
<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.12.006>.
- [18] J.S. Bee, D. Chiu, S. Sawicki, J.L. Stevenson, K. Chatterjee, E. Freund, J.F. Carpenter, T.W. Randolph, Monoclonal Antibody Interactions with Micro- and Nanoparticles: Adsorption, Aggregation and Accelerated Stress Studies, (n.d.). <https://doi.org/10.1002/jps.21768>.
- [19] D.H. Fermentation, Polyester-Based Nanoparticles for the Encapsulation of Monoclonal Antibodies, in: V. Picanço-Castro, K. Swiech (Eds.), *Recomb. Glycoprotein Prod.*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 109–116. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5>.
- [20] J. Conde, F. Tian, J.M. de la Fuente, P. V. Baptista, Editorial: Cancer Nanotheranostics: What Have We Learned So Far?, *Front. Chem.* 3 (2016). <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00071>.
- [21] W. Park, Y.-J. Heo, D.K. Han, New opportunities for nanoparticles in cancer immunotherapy, *Biomater. Res.* 22 (2018) 24.
<https://doi.org/10.1186/s40824-018-0133-y>.
- [22] K. Yamasaki, V.T.G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Albumin-drug interaction and its clinical implication, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 5435–5443. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>.
- [23] B. Wilson, Y. Lavanya, S.R.B. Priyadarshini, M. Ramasamy, J.L. Jenita, Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.056>.

- [24] N. Qu, Y. Sun, Y. Li, F. Hao, P. Qiu, L. Teng, J. Xie, Y. Gao, Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: synthesis, characterization, and evaluation, *Biomed. Eng. Online*. 18 (2019) 11. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0624-7>.
- [25] I. Luis de Redín, F. Expósito, M. Agüeros, M. Collantes, I. Peñuelas, D. Allemandi, J.M. Llabot, A. Calvo, J.M. Irache, In vivo efficacy of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of colorectal cancer, *Drug Deliv. Transl. Res.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00722-7>.
- [26] N. Lomis, S. Westfall, L. Farahdel, M. Malhotra, D. Shum-Tim, S. Prakash, Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: Process optimization and in vitro characterization, *Nanomaterials*. 6 (2016). <https://doi.org/10.3390/nano6060116>.
- [27] H. Hong, Y. Zhang, J. Sun, W. Cai, Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles, *Nano Today*. 4 (2009) 399–413. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.07.001>.
- [28] J.M. Llabot, I. Luis de Redin, M. Agüeros, M.J. Dávila Caballero, C. Boiero, J.M. Irache, D. Allemandi, In vitro characterization of new stabilizing albumin nanoparticles as a potential topical drug delivery system in the treatment of corneal neovascularization (CNV), *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 52 (2019) 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.042>.
- [29] I. Luis de Redín, C. Boiero, M.C. Martínez-Ohárriz, M. Agüeros, R. Ramos, I. Peñuelas, D. Allemandi, J.M. Llabot, J.M. Irache, Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab, *Int. J. Pharm.* 541 (2018) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.003>.
- [30] F.F. An, X.H. Zhang, Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery, *Theranostics*. 7 (2017)

3667–3689. <https://doi.org/10.7150/thno.19365>.

- [31] M. Merodio, A. Arnedo, M.J. Renedo, J.M. Irache, Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and in vitro release properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2001) 251–259. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00169-X).
- [32] S. Zhang, G. Wang, X. Lin, M. Chatzinikolaidou, H.P. Jennissen, M. Laub, H. Uludag, Polyethylenimine-coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery, *Biotechnol. Prog.* 24 (2008) 945–956. <https://doi.org/10.1002/btpr.12>.
- [33] V. Pandey, T. Haider, A.R. Chandak, A. Chakraborty, S. Banerjee, V. Soni, Technetium labeled doxorubicin loaded silk fibroin nanoparticles: Optimization, characterization and in vitro evaluation, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 56 (2020) 101539. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101539>.
- [34] A. Polyák, I. Hajdu, M. Bodnár, G. Trencsényi, Z. Pöstényi, V. Haász, G. Jánoki, G.A. Jánoki, L. Balogh, J. Borbély, ^{99m}Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities, *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.049>.
- [35] S. Subramanian, P. Dandekar, R. Jain, U. Pandey, G. Samuel, P.A. Hassan, V. Patravale, M. Venkatesh, Technetium-99m-Labeled Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles as an Alternative for Sentinel Lymph Node Imaging, *Cancer Biother. Radiopharm.* 25 (2010) 637–644. <https://doi.org/10.1089/cbr.2010.0817>.
- [36] K.K. Halder, B. Mandal, M.C. Debnath, H. Bera, L.K. Ghosh, B.K. Gupta, Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: Formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies, *J. Drug Target.* 16 (2008) 311–320. <https://doi.org/10.1080/10611860801899300>.

- [37] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>.
- [38] T. Musumeci, L. Vicari, C.A. Ventura, M. Gulisano, R. Pignatello, G. Puglisi, Lyoprotected nanosphere formulations for paclitaxel controlled delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 3118–3125. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.452>.
- [39] E. Chiotellis, Lyophilization technique for preparing radiopharmaceutical kits, *Technetium-99m Pharm. Prep. Qual. Control Nucl. Med.* (2007) 99–102. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_7.
- [40] T. Musumeci, C. Bucolo, C. Carbone, R. Pignatello, F. Drago, G. Puglisi, Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits, *Int. J. Pharm.* 440 (2013) 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.014>.
- [41] R.J. Kowalsky, H.M. Chilton, Stability of stannous ion in stannous pyrophosphate kits., *J. Nucl. Med.* 24 (1983) 1080–1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6631529>.
- [42] J.C. Hung, J.A. Ponto, R.J. Hammes, Radiopharmaceutical-related pitfalls and artifacts, *Semin. Nucl. Med.* 26 (1996) 208–255. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(96\)80002-X](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(96)80002-X).
- [43] H. Spies, H.J. Pietzsch, Stannous chloride in the preparation of ^{99m}Tc pharmaceuticals, in: I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharm. Prep. Qual. Control Nucl. Med.*, 1st ed., 2007: pp. 59–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_3.
- [44] K.N. Clayton, J.W. Salameh, S.T. Wereley, T.L. Kinzer-Ursem, Physical

- characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry, *Biomicrofluidics*. 10 (2016) 54107. <https://doi.org/10.1063/1.4962992>.
- [45] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018) 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [46] M.G. Anhorn, H.C. Mahler, K. Langer, Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients, *Int. J. Pharm.* 363 (2008) 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.004>.
- [47] A.M. De Campos, A. Sánchez, R. Gref, P. Calvo, M.J. Alonso, The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00178-7).
- [48] B. Luppi, F. Bigucci, T. Cerchiara, R. Mandrioli, A.M. Di Pietra, V. Zecchi, New environmental sensitive system for colon-specific delivery of peptidic drugs, *Int. J. Pharm.* 358 (2008) 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.02.009>.
- [49] B. Luppi, F. Bigucci, G. Corace, A. Delucca, T. Cerchiara, M. Sorrenti, L. Catenacci, A.M. Di Pietra, V. Zecchi, Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.002>.
- [50] J.G. Souza, K. Dias, T.A. Pereira, D.S. Bernardi, R.F. V. Lopez, Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 507–530. <https://doi.org/10.1111/jphp.12132>.

- [51] P. Patel, A. Grover, A. Hirani, Y.W. Lee, Y. Pathak, P. Patel, A. Grover, A. Hirani, Y.W. Lee, Y. Pathak, Ophthalmic Nanosuspensions: Toxicity and Formulation, (2016). https://doi.org/10.1007/978-3-319-29346-2_20.
- [52] H.-M. Ding, Y.-Q. Ma, Design strategy of surface decoration for efficient delivery of nanoparticles by computer simulation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 26783. <https://doi.org/10.1038/srep26783>.
- [53] I. Luis de Redín, C. Boiero, S. Recalde, M. Agüeros, D. Allemandi, J.M. Llabot, A. García-Layana, J.M. Irache, In vivo effect of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of corneal neovascularization, *Exp. Eye Res.* 185 (2019) 107697. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107697>.

VI. RADIOMARCAJE DEL BEVACIZUMAB CON TECNECIO-99M

En este capítulo se describe el desarrollo de diversas estrategias para el radiomarcaje del bevacizumab con tecnecio-99m y la evaluación de cada uno de ellos mediante evaluación del rendimiento, la estabilidad y la actividad biológica del anticuerpo tras el radiomarcaje.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de **anticuerpos radiomarcados** es un procedimiento ampliamente extendido en la práctica clínica. En función del radionucleido empleado en el radiomarcaje, se pueden emplear como radiofármacos con fines diagnósticos [1] o como agentes radioinmunoterapéuticos [2].

La **radioinmunodetección**, como técnica de imagen molecular, utiliza Ac radiomarcados para el diagnóstico de diversas patologías [3,4]. Desde que en la década de los 70 se propusiera el primer estudio de estadificación con un anticuerpo policlonal marcado con Iodo-131 [5], han surgido multitud de líneas de investigación con el fin de desarrollar **radioinmunofármacos (RIF)** que puedan tener una aplicación clínica en el campo de la Medicina Nuclear [6]. A diferencia de otros radiofármacos empleados para oncología, los RIF están más dirigidos a la caracterización de las lesiones que a la detección de las mismas [7]. Favorecen la evaluación del nivel de expresión de la diana terapéutica, ya que monitorizan de forma específica aquellas células que expresan el An, permitiendo correlacionar la captación del anticuerpo radiomarcado con el beneficio terapéutico que el paciente puede recibir [8].

Para el marcaje de mAb hay numerosos isótopos reportados en la literatura, entre los que destacan el Indio-111 [9] y el zirconio-89 [10]. Sus $t_{1/2}$ duran varios días lo que se adapta a la farmacocinética de la mayoría de los mAb. No obstante, por su disponibilidad a nivel mundial, el **tecnecio-99m** sigue siendo el principal objetivo en el desarrollo de nuevos RF [11], de hecho en la práctica clínica existen RIF marcados con este isótopo como por ejemplo el LeukoScan® [12], el TromboView® [13] o el Scintimun® [14].

Existen dos tipos de **radiomarcaje de mAb con tecnecio-99m**: la unión directa del radiometal a grupo funcional intrínseco del propio anticuerpo o el uso de un ligando que permita unir el isótopo de forma indirecta.

El **marcaje directo** puede realizarse según:

- I. **Reacción directa** entre el mAb y el tecnecio-99m. Esta reacción se basa en la incubación del radiometal reducido con el mAb previamente activado. La activación consiste en reducir de forma parcial los puentes de disulfuro (-S-S-) existentes entre los residuos de cisteínas de las cadenas polipeptídicas. Este proceso genera grupos sulfhidrilo (-SH), que presentan una elevada reactividad frente al tecnecio-99m reducido [15,16].

En 1985, Paik et al. [17] determinaron que el uso de un exceso de DTPA, durante la incubación, evitaba las uniones inespecíficas entre el radiometal y el mAb. En base a ello se realizaron diversos estudios con quelantes más débiles, que a diferencia del DTPA, permitían transferir el tecnecio-99m al anticuerpo activado; este método conocido como **marcaje mediado por ligandos de transferencia** ($L_{\text{transferencia}}$), fue propuesto por primer vez por Schwarz y Steinstrasser [18] y posteriormente modificado por Mather y Ellison [19]; dicha modificación incluía el uso del principio activo de equipos reactivos comerciales, empleados en la preparación de RF convencionales, como fuente del quelante débil.

II. Reacción directa empleando carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$. Para ello se utiliza el precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ desarrollado por Alberto et. al [20]. El mecanismo de este marcaje se fundamenta en la sustitución de las moléculas de agua por ligandos mono-, bi- o tridentados; la estabilidad del complejo resultante es proporcional a la denticidad del ligando [21].

El precursor presenta una elevada afinidad por aminas, tioéteres y tioles [22]; algunos residuos de aminoácidos contiene estos grupos funcionales reactivos frente a este precursor, como por ejemplo la histidina [23], la metionina [24] o la cisteína [25]. En base a esto, cualquier biomolécula peptídica podría ser marcada con $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, siempre que dichos grupos funcionales no estén estéricamente impedidos. No obstante, cuando el grupo imidazol de una histidina esté disponible, la sustitución estará favorecida en él por razones cinéticas [26].

El bevacizumab es una Inmunoglobulina tipo G que contiene 214 residuos de aminoácidos en sus cadenas ligeras y 453 en sus cadenas pesadas [27]; 28 de estos residuos son histidinas. Los más accesibles se localizan al final de la cadena pesada, lo que puede facilitar su reacción con el sintón $[\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ y no afectar a la inmunoreactividad del anticuerpo [28].

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo ha sido el desarrollo de un método eficaz y estable para radiomarcarse bevacizumab con tecnecio-99m, con el objetivo de poder encapsularlo posteriormente en una matriz NP-HSA. Para ello se han diseñado dos métodos de marcaje directos con tecnecio-99m, de los que se ha valorado el rendimiento de la reacción, la estabilidad de unión radiometal-bevacizumab y la actividad biológica del anticuerpo después del marcaje.

3. METODOLOGÍA

3.1 Purificación de excipientes del bevacizumab y cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS.

Las soluciones farmacéuticas comerciales de bevacizumab contienen excipientes para evitar su degradación. Para evitar que alguno de estos excipientes pueda competir durante el marcaje del anticuerpo con el tecnecio-99m [29,30], la muestra debe purificarse. Como técnica purificación se eligió la cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para ello 125 µl de Avastin® (≈ 3,2 mg de bevacizumab) se completaron hasta un volumen final de 0,5 ml con NaCl 0,9 % y se introdujeron en una columna MidiTrap G-25. De la columna se eluyeron 6 alícuotas de 1ml empleando PBS como fase móvil (Figura VI. 1).

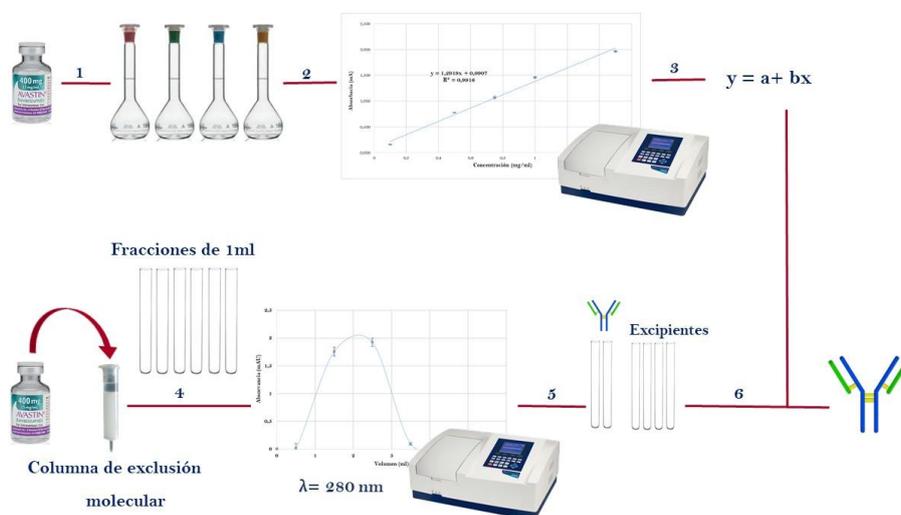


Figura VI. 1. Esquema de la purificación de excipientes del bevacizumab. **1.** Preparación de los patrones. **2.** Determinación la recta de calibrado a $\lambda = 280 \text{ nm}$ y cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer; **3.** Determinación de la ecuación de la recta **4.** Purificación de los excipientes por SEC; **5.** Determinación de las fracciones con anticuerpo a $\lambda = 280 \text{ nm}$. **6.** Aplicación de la ecuación de la recta para determinar [Bevacizumab purificado].

Se determinó la concentración **bevacizumab purificado de excipientes (bevacizumab-PE)** en cada alícuota mediante espectrofotometría UV-VIS ($\lambda = 280$ nm) empleando una curva patrón de Avastin® (rango de concentración comprendida entre de 1,5 - 0,1mg/ml) y un espectrofotómetro de haz simple UV-3100 PC.

3.2 Activación del bevacizumab

3.2.1 Concentración y reducción parcial del bevacizumab

El bevacizumab-PE se concentró mediante ultrafiltración por centrifugado a 2800 g durante 20 minutos, utilizando concentradores Amicon® Ultra-30K. A continuación, se redujo parcialmente mediante incubación con 2-Mercaptoetanol (ratio molar 1:2000), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación constante. El **bevacizumab parcialmente reducido (bevacizumab-R)** se purificó utilizando nuevamente una columna MidiTrap G-25 y PBS como eluyente (Figura VI. 2).

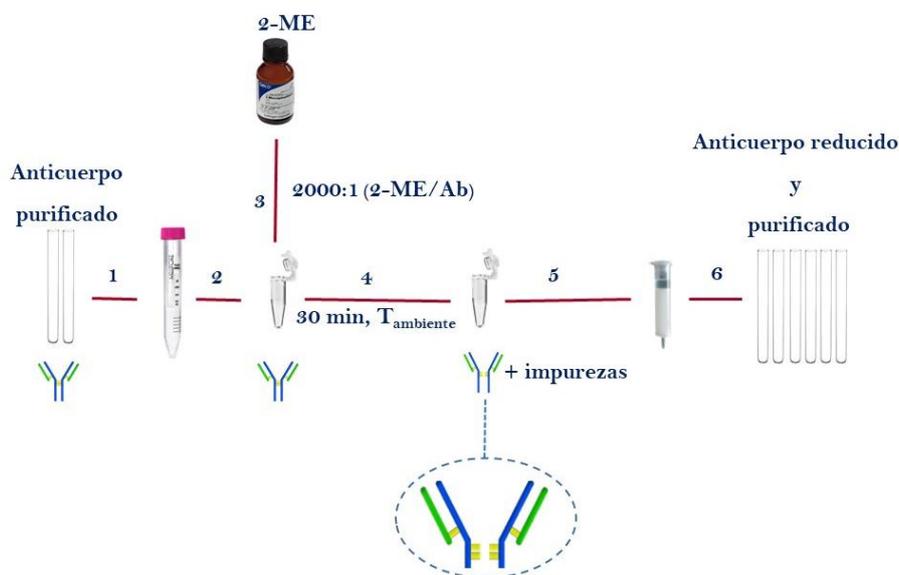


Figura VI. 2. Esquema de la reducción parcial del bevacizumab. **1.** Concentración por ultrafiltración por centrifugado; **2.** Transvase a Eppendorf y determinación de [bevacizumab]; **3.** Adición del 2-Mercaptoetanol; **4.** Reacción de reducción de los puentes disulfuro del anticuerpo; **5.** Cromatografía de exclusión molecular; **6.** Elución del anticuerpo reducido separándolo de las posibles impurezas generadas y el exceso de 2-Mercaptoetanol.

3.3 Determinación de la pureza química del bevacizumab-PE y el bevacizumab-R

La pureza química (PQ) del bevacizumab-PE y el bevacizumab-R se analizó mediante SEC-HPLC utilizando un sistema cromatográfico Agilent 1200A acoplado a un detector de diodos en línea (DAD) fijado a una $\lambda = 280$ nm. Para ello se empleó una columna analítica Yarra x 150 que se eluyó con una solución de 0,15 M de NaCl en 0,1 M PBS a un flujo constante (0.3 ml/min). Las muestras se analizaron por triplicado.

Como muestras control se analizó, en iguales condiciones analíticas, una alícuota de Avastin®.

3.4 Marcaje del bevacizumab reducido mediado por ligando

Para el marcaje mediado por $L_{\text{transferencia}}$ se empleó bevacizumab-R. Los $L_{\text{transferencia}}$ comúnmente descritos en la literatura son el medronato (MDP, Figura VI. 3) y el pirofosfato (PYP, Figura VI. 4). Ambos quelantes son el principio activo de un equipo reactivo para la preparación de RF convencionales tras su reconstitución con $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$. Sin embargo, desde hace años el equipo reactivo del MDP, ha sido sustituido en la rutina clínica por el oxidronato de sodio (HDP, Figura VI. 5) y el etidronato de sodio (DPD, Figura VI. 6). Ambos comparten farmacóforo con el MDP (P-C-P), diferenciándose entre ellos por la presencia o la naturaleza de los sustituyentes en el átomo de carbono.

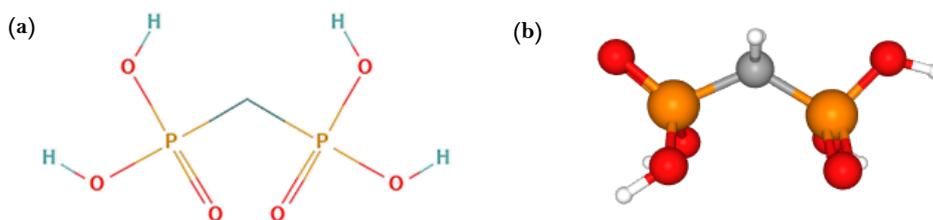


Figura VI. 3. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del medronato de sodio (MDP).

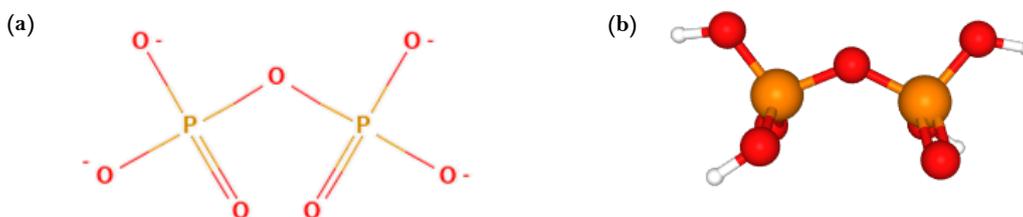


Figura VI. 4 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del ácido pirofosfato de sodio (PYP).

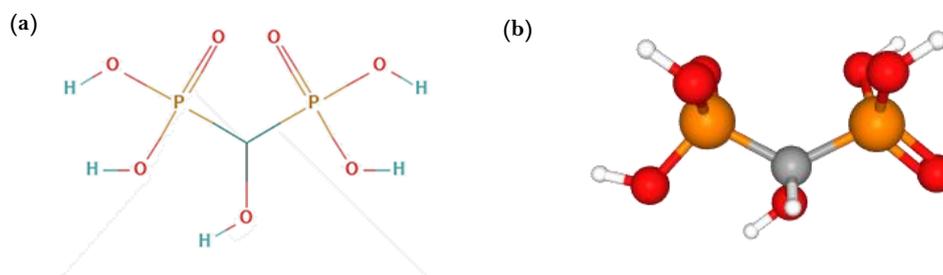


Figura VI. 5. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del oxidrónico (HDP).

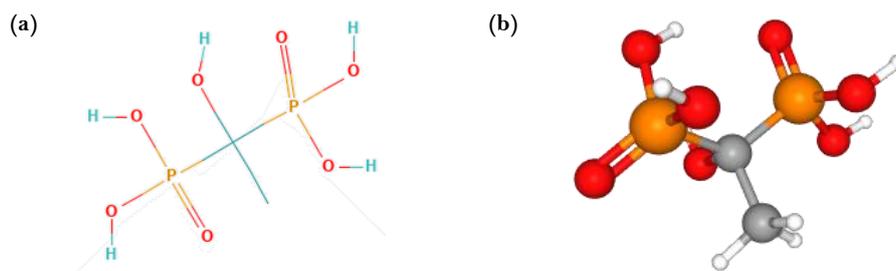


Figura VI. 6. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del ácido etindrónico (DPD).

En este estudio como posibles $L_{\text{transferencia}}$ se testaron el HDP, DPD y el PYP. Para su empleo como $L_{\text{transferencia}}$ se reconstituyó un equipo reactivo de cada uno (HDP Technescan®, Teceos® y PYP Technescan®) con 1 ml de NaCl 0,9%. Entre los componentes de estos equipos reactivos se encuentra el cloruro de estaño (II), lo que permitió que sirviesen con una doble finalidad: como solución de $L_{\text{transferencia}}$ y como disolución de SnCl_2 para reducir el estado de oxidación del tecnecio-99m.

En base a los resultados obtenidos por Zhang et al. [31] de cada reconstituido se utilizó un volumen correspondiente a $2 \mu\text{g Sn}^{+2}$ para el marcaje; esta cantidad se mezcló con una fracción de 0,5 mg de bevacizumab-R y 100 μl de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$

(48 ± 9 MBq) recién eluido. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

En la Tabla VI. 1 se resumen los parámetros del marcaje para cada uno de los $L_{\text{transferencia}}$, aunque de forma genérica estas formulaciones se identificaron como $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Bevacizumab-L}$.

Ligando de transferencia	Nomenclatura*	Volumen de reconstituido (μl)	Cantidad de ligando (μg)
HDP	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Bevacizumab-HDP}$	6	18
DPD	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Bevacizumab-DPD}$	9	117
PYP	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Bevacizumab-PYP}$	6	71,4

Tabla VI. 1. Parámetros empleados para el marcaje indirecto de bevacizumab empleando equipos reactivos comerciales como ligandos de transferencia.

Como muestra control se marcó una alícuota de cada ligando ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-}L_{\text{transferencia}}$) en iguales condiciones, pero en ausencia de bevacizumab.

3.5 Radiomarcaje del anticuerpo empleando carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$.

En primer lugar se generó el precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$ mediante reconstitución de un vial de Isolink™ con una solución de $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ (1 ml, 740 ± 74 MBq) obtenida de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. La mezcla se incubó a 100°C durante 30 minutos en un bloque térmico Tembloc. Tras dejarlo enfriar hasta temperatura ambiente, se neutralizó con una disolución de PBS 0,1M/HCl 1M (40:60) hasta $\text{pH} = 7,0$. El precursor tecneciado se incubó con bevacizumab-PE, en una ratio 1:700, a 37°C durante 30 minutos (Figura VI. 7).

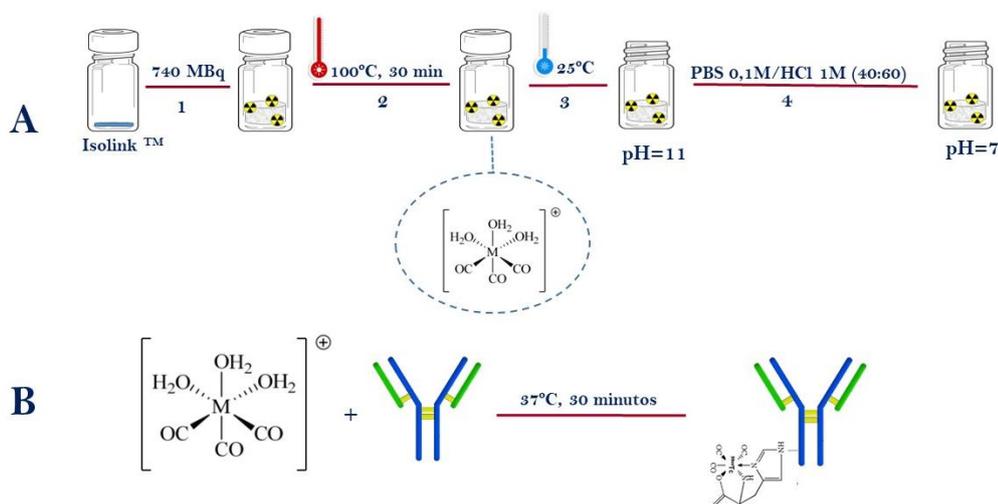


Figura VI. 7. Esquema del radiomarcaje del anticuerpo con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$. **A.** Preparación del precursor: **1.** Radiomarcaje del “kit”; **2.** Formación del núcleo de tricarbonylo ($M=^{99m}\text{Tc}$); **3.** Enfriamiento a T_{ambiente} ; **4.** Ajuste del valor de pH. **B.** Incubación del bevacizumab-PE y el precursor.

Finalizada la incubación, la mezcla se purificó mediante ultrafiltración por centrifugado (2800 g, 20 minutos) empleando concentradores Amicon® Ultra-30K.

3.6 Determinación de la pureza química y radioquímica de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab

La evaluación de la PQ y la PRQ de las muestras de bevacizumab radiomarcado, con ambas estrategias de marcajes, se realizó mediante radio-SEC-HPLC, empleando el mismo método analítico descrito en el apartado 3.3. Al equipo de HPLC se acopló un detector de radioactividad Raytest ($E_{\text{pico}}=140$ keV) en línea con el detector DAD.

Se analizaron en las mismas condiciones las siguientes muestras control: $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -HDP, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -DPD y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -PYP.

Como criterio de aceptación se establecieron % PQ y % PRQ ≥ 95 anticuerpo radiomarcado y un Rt similar al obtenido para las muestras de Avastin analizadas en el apartado 3.3.

3.7 Estudio de estabilidad del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab

Se evaluó la estabilidad de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab mediante la determinación del % PRQ a 0, 1, 4, 10 y 24 horas por cromatografía planar ascendente; el método analítico se adaptó a cada estrategia de marcaje, tal y como se detalla más adelante en los apartado 3.7.1.

Las condiciones evaluadas fueron:

- La temperatura de la conservación de las soluciones de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab tras el radiomarcaje (temperatura ambiente y 4 °C).
- La estabilidad de las muestras de anticuerpo radiomarcado en un medio competitivo de concentración molar 10 veces superior mediante incubación a 37 °C. Para el marcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ se empleó una disolución 10 mM de histidina y para los marcajes mediados por $L_{\text{transferencia}}$ una solución 10 mM de DTPA.
- La estabilidad del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab en plasma, mediante incubación de las muestras en volumen 4 veces superior a 37 °C.

3.7.1 Métodos cromatográficos

3.7.1.1. Evaluación del radiomarcaje mediado por ligandos

Evaluación del radiomarcaje mediado por ligandos

Para evaluar la estabilidad de las muestras de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L se utilizó uno de los controles de calidad descritos en la ficha técnica del $L_{\text{transferencia}}$ [32–34], concretamente el de fase inorgánica; esta cromatografía permite cuantificar adecuadamente el % PQR del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L ($R_f = 0$) porque las impurezas $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -L migran hacia el frente ($R_f = 1$).

En la Tabla 1 se resume el método utilizado para determinar la PRQ de cada marcaje.

Marcaje	Fase estacionaria	Fase móvil
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Bevacizumab-HDP	ITLC-SG (10 x 1 cm)	Acetato de sodio 13,6%
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Bevacizumab-DPD	Papel Whatmann 31 (2,5 x 5 cm)	NaCl 1M
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Bevacizumab-PYP	ITLC-SG (10 x 1 cm)	Acetato de sodio 13,6%

Tabla 1. Resumen del método analítico de determinación de la % PRQ del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L empleado en el estudio de estabilidad.

Tras el desarrollo, cada tira se dividió en 5 secciones de 2 cm y de cada una de ellas se determinó la radioactividad presente empleando un contador gamma Compugamma CS.

3.7.1.2. Evaluación del radiomarcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$.

Para determinar la estabilidad del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab se empleó un método de cromatografía en capa fina, utilizando una placa de vidrio (1 x 10 cm) de nanosílice modificada por octadecilo RP-18 (ALUGRAM® RP-18) como fase

estacionaria y una disolución $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (0,1 M, pH=6) / MeOH (50:50) como fase móvil. El % PRQ del $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

3.7.2 Análisis de los datos

La actividad medida en cada sección de la fase estacionaria se corrigió por decay a la hora de inicio del estudio. Con estos datos se determinó el % PRQ (Ecuación VI. 1) del anticuerpo radiomarcado con cada estrategia en todas las condiciones analizadas. Como criterios de aceptación se estableció un % PRQ > 95.

$$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc} - \text{bevacizumab} = \frac{\text{Actividad medida en la sección } 0 - 2\text{cm}}{\sum \text{Actividad medida en cada sección}} \times 100$$

Ecuación VI. 1. Calculo del % de PRQ del bevacizumab radiomarcado en el estudio de estabilidad.

3.8 Caracterización del anticuerpo tras el radiomarcaje

3.8.1 Evaluación del peso molecular del bevacizumab tras su radiomarcaje con tecnecio-99m.

Se determinó el peso molecular de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-L}$ y de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras se prepararon con un tampón Tris-HCl/glicerol/azul de bromofenol/SDS (62,5 mM Tris-HCl, 40 % glicerol, 0.01 % bromofenol blue, 1 % SDS, pH = 6,8), se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos y se cargaron (9,3-13 μg bevacizumab/pocillo) en un gel de poliacrilamida con un gradiente del 4,5 -15 %.

El gel se desarrolló utilizando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Figura VI. 8), con una corriente eléctrica constante (120 V)

hasta que el frente alcanzó la parte inferior del mismo. Como buffer de carrera se empleó una disolución de Tris/Gly/SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % SDS, pH=8,3).

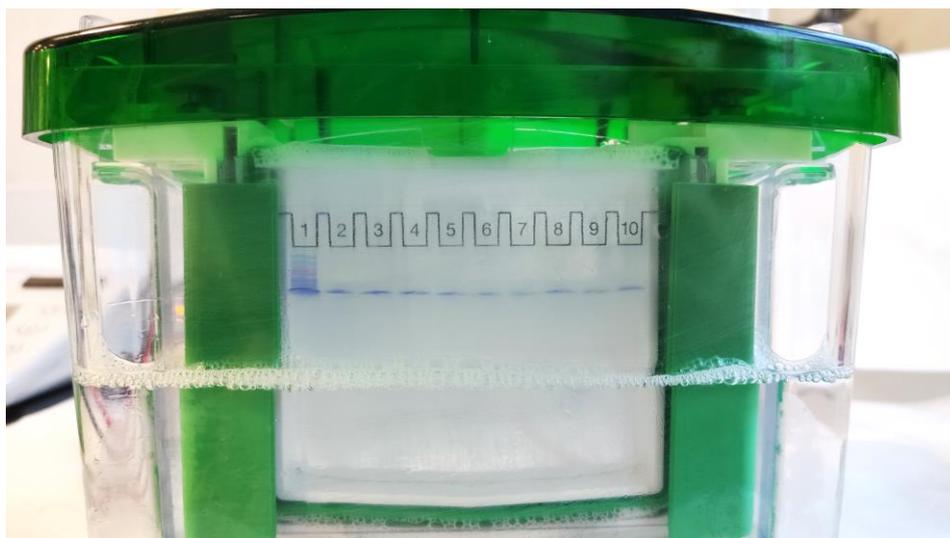


Figura VI. 8. Desarrollo del gel de poliacrilamida. En el pocillo 1 se cargó el marcador de tamaño; el resto de pocillo se cargaron con muestras para su análisis.

Finalizado el proceso de electroforesis se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (2,5 A, 3 minutos) utilizando el sistema Trans-Blot Turbo. A continuación, la membrana se tiñó con una disolución al 0,5 % (p/v) de azul de Coomassie brillante R-250. El análisis del tamaño molecular de las bandas reveladas, se realizó cualitativamente mediante comparación visual con las bandas del marcador de tamaño (250 kDa-5 kDa).

En las mismas condiciones se trataron y analizaron muestras de Avastin®, bevacizumab-PE y bevacizumab-R.

Adicionalmente, se midió la radioactividad presente de aquellos canales de la membrana que contenían muestras de bevacizumab radiomarcado. Para ello se

empleó un radiocromatógrafo Scan-RAM equipado con un detector 2 x 2 de NaI(Tl) y el software Laura.

3.8.2 Determinación de la actividad biológica

La cantidad de anticuerpo activo se determinó mediante ELISA utilizando el “kit” comercial Shikari® Q-beva, específico para el bevacizumab.

Las muestras de c fueron diluidas 1:50 con buffer de ensayo; se transvasaron 25 µl de la disolución resultante a un pocillo recubierto de VEGF; seguidamente se realizó el procedimiento de ELISA según las instrucciones del fabricante [35].

Se determinó la concentración de bevacizumab activo en cada muestra mediante espectrofotometría UV-VIS ($\lambda = 450$ nm y $\lambda = 620$ nm) empleando una curva patrón de disolución de bevacizumab (rango de concentración comprendida entre de 0,4-0,012 µg/ml) y un espectrofotómetro de haz simple UV-3100 PC.

El porcentaje de bevacizumab activo (% BA) se determinó según la Ecuación VI. 2

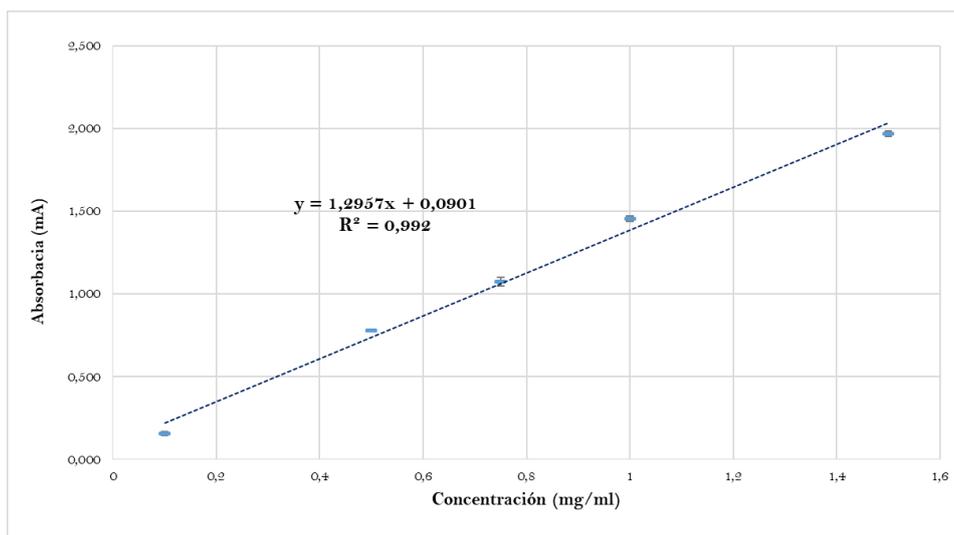
$$\% BA = \frac{\text{bevacizumab}_{\text{cuantificado por ELISA}} (\mu\text{g/ml})}{\text{bevacizumab}_{\text{empleado para el radiomarcaje}} (\mu\text{g/ml})} \times 100$$

Ecuación VI. 2. Determinación de bevacizumab activo tras su radiomarcaje con tecnecio-99m.

4. RESULTADOS

4.1 Purificación de excipientes del bevacizumab y cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS.

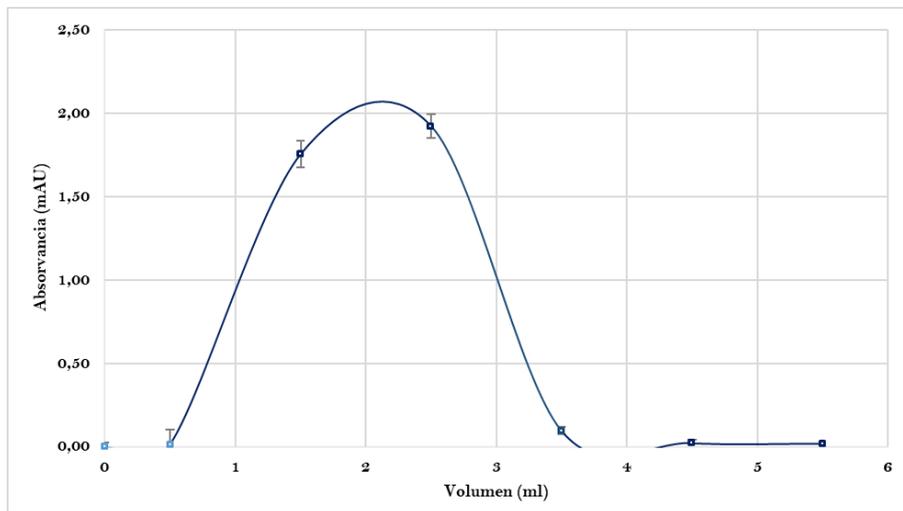
Los resultados obtenidos mostraron un ajuste lineal de la recta patrón de Avastin® con un coeficiente de correlación de Pearson $r^2 > 0,99$. La pendiente de la recta (Gráfica VI. 1) corresponde al producto del coeficiente de extinción y el camino óptico; siendo el camino óptico de 1 cm, el $\xi_{\text{bevacizumab}, 280 \text{ nm}} = 1,2957 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Gráfica VI. 1. Recta patrón de Avastin en PBS para determinar el coeficiente de absortividad molar.

La Gráfica VI. 2 muestra el perfil de absorbancia de las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular, tras la purificación de excipientes.

Los resultados de cuantificación de bevacizumab-PE indican una recuperación de 2,92 mg de anticuerpo eluido en las dos primeras fracciones (Tabla VI. 2).



Gráfica VI. 2. Perfil de elución del bevacizumab al purificar su solución comercial Avastin® de excipientes. Los primeros 0,5 ml correspondieron al volumen eluido tras la aplicación de la muestra.

Fracción	Concentración (mg/ml)
1	1,36 ± 0,07
2	1,49 ± 0,06
3	0,07 ± 0,06

Tabla VI. 2. Cantidad de bevacizumab cuantificada aplicando la ley de Lamber-Beer sobre las fracciones con mayor absorbancia y porcentaje de recuperación de la columna de exclusión molecular.

4.2 Determinación de la pureza química del bevacizumab-PE y el bevacizumab-R

El análisis de los cromatogramas evidenció R_t semejantes para la muestra de bevacizumab-R y de bevacizumab-PE (Tabla VI. 3). Sin embargo, en comparación con la muestra de Avastin® se aprecia una disminución del tiempo de retención (R_t) de 0.2 minutos.

Muestra	Tiempo de retención (min)	PQ del mAb (%)
Avastin	5,041 ± 0,007	93,00 ± 6,93
Bevacizumab purificado	4,852 ± 0,006	88,50 ± 0,71
Bevacizumab reducido	4,865 ± 0,006	92,74 ± 0,13

Tabla VI. 3. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis del bevacizumab mediante SEC-HPLC.

La Figura VI. 9 muestra de forma representativa un cromatograma de cada una de las muestras; en ellos se puede observar un pico de mayor absorbancia correspondiente al bevacizumab y una impureza, que por el tiempo de retención debe tener un tamaño molecular superior al anticuerpo y cuya área aumenta en ausencia de excipientes.

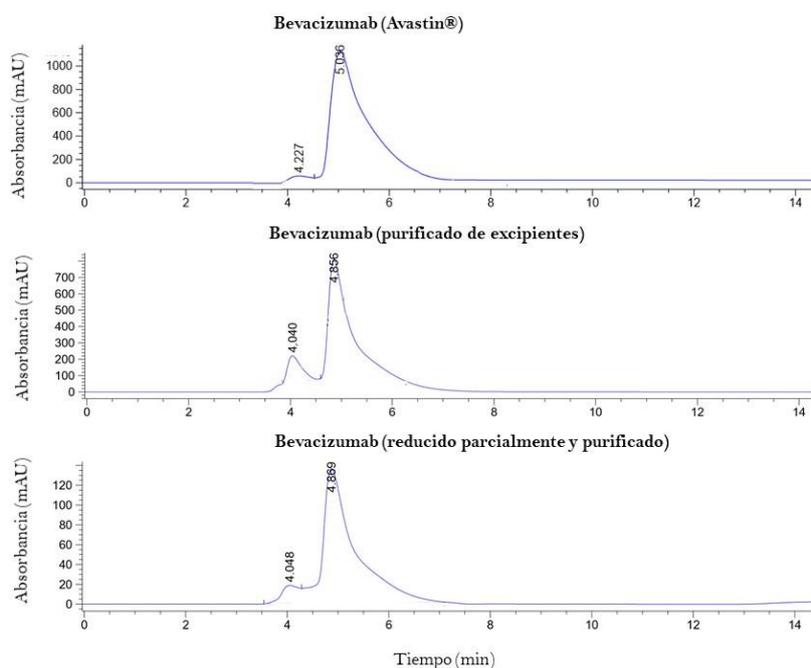


Figura VI. 9. Cromatogramas de muestras de bevacizumab mediante SEC-HPLC con detector UV ($\lambda = 280$ nm). (a) Muestra de Avastin; (b) Bevacizumab purificado de excipientes; (c) Bevacizumab parcialmente reducido y purificado.

4.3 Determinación de la pureza química y radioquímica del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab

4.3.1 Marcaje mediado por ligandos

En la Figura VI. 10 se muestra de forma representativa un cromatograma de cada uno de los marcajes mediados por ligandos. Los R_t , los % PQ y los % PRQ promedio de la muestras de anticuerpo radiomarcado y las muestras control se recogen en la Tabla VI. 4.

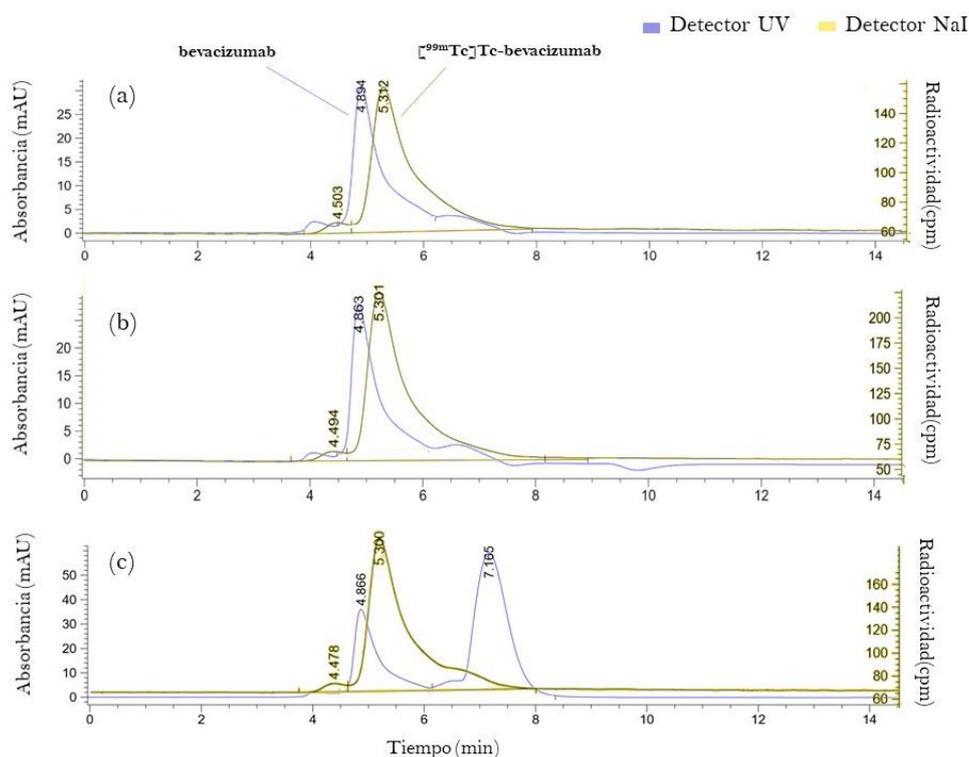


Figura VI. 10. Evaluación del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab mediado por (a) PYP, (b) HDP y (c) DPD. El $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab: $R_t = 4,8$ minutos (curva de color azul, detector DAD, 280 nm) y 5,3 minutos (curva amarilla, detector de NaI). Impureza de DPD (curva azul) con $R_t = 7,1$ min en el cromatograma.

Muestra	Rt (min)	% PQ	Rt (min)	% PRQ
[^{99m} Tc]Tc-bevacizumab (HDP)	4,867 ± 0,005	96,89 ± 2,40	5,279 ± 0,043	95,96 ± 0,26
[^{99m} Tc]Tc-bevacizumab (DPD)	4,913 ± 0,061	30,70 ± 1,28	5,310 ± 0,009	95,85 ± 1,52
[^{99m} Tc]Tc-bevacizumab (PYP)	4,897 ± 0,012	97,00 ± 0,00	5,318 ± 0,008	95,82 ± 0,29
[^{99m} Tc]Tc-HDP	6,746 ± 0,045	99,89 ± 2,70	6,870 ± 0,095	100,00 ± 0,00
[^{99m} Tc]Tc-DPD	7,174 ± 0,002	100,00 ± 0,00	7,269 ± 0,262	100,00 ± 0,00
[^{99m} Tc]Tc-PYP	6,741 ± 0,056	99,95 ± 0,50	6,949 ± 1,704	13,50 ± 0,70
[^{99m} Tc]NaTcO ₄	---	---	9,766 ± 0,145	100,00 ± 0,00

Tabla VI. 4. Resultados de pureza química y radioquímica de las distintas muestras analizadas por SEC-HPLC.

Del análisis de los resultados puede evidenciarse que:

- El Rt del [^{99m}Tc]Tc-bevacizumab es similar en todos, independientemente del ligando empleado.
- La impureza eluida antes que el anticuerpo, ya observada en la Figura VI. 10 se mantiene en los tres marcaje y puede observarse en ambos detectores (Rt = 4, 5 minutos, detector de NaI), lo que es indicativo de que la especie se marca radioactivamente.
- El marcaje del bevacizumab mediado por los tres ligandos permitió obtener valores de PQ del anti y PRQ > 95%.
- El cromatograma del marcaje mediado con DPD presenta una impureza química detectada en detector de UV-VIS, que puede identificarse como DPD ya que dicha impureza presenta un Rt similar al obtenido para la alícuota control de [^{99m}Tc]Tc-DPD (7,165 vs 7,174 min).
- Los cromatogramas de los marcajes mediados por HDP y PYP monitorizados a 280 nm muestran hombros cuyos tiempos de elución son similares a los obtenidos en el análisis de las muestras control de los respectivos L_{transferencia}.
- En ninguno de los marcajes se han observado impurezas de [^{99m}Tc]NaTcO₄

- Las alícuotas control de HDP y DPD obtuvieron un elevada % PQ y % PRQ, tras su radiomarcaje, mientras que el marcaje del PYP con tecnecio-99m obtuvo un rendimiento bajo de marcaje bajo (13,5 %).

4.3.2 Marcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$.

El precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ se preparó adecuadamente (% PQ y % PRQ > 95), tal y como muestra su análisis mediante radio-SEC-HPLC (Figura VI. 11).

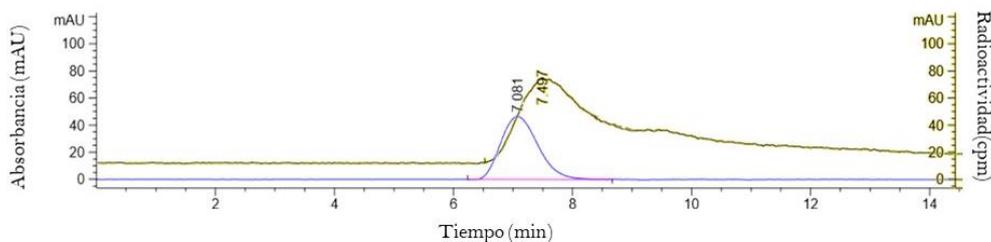


Figura VI. 11. Evaluación del $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ $R_t = 7,081$ minutos (curva de color azul, detector DAD, 280 nm) y 7,497 minutos (curva amarilla, detector de NaI).

De igual modo el $[\text{fac-}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ se obtuvo un elevado de % PQ y con un R_t semejante al observado para la muestra de Avastin ($5,091 \pm 0,013$ min vs $5,0341 \pm 0,007$ min), lo que es indicativo que el anticuerpo no se ve afectado por el proceso de radiomarcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$.

Por otra parte, el % PRQ = 71 tras la incubación, aunque tras la purificación se elevó hasta alcanzar un 97 % (Figura VI. 12), probando ser la centrifugación con Amicon una técnica adecuada para eliminar las impurezas de $[\text{fac-}^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$.

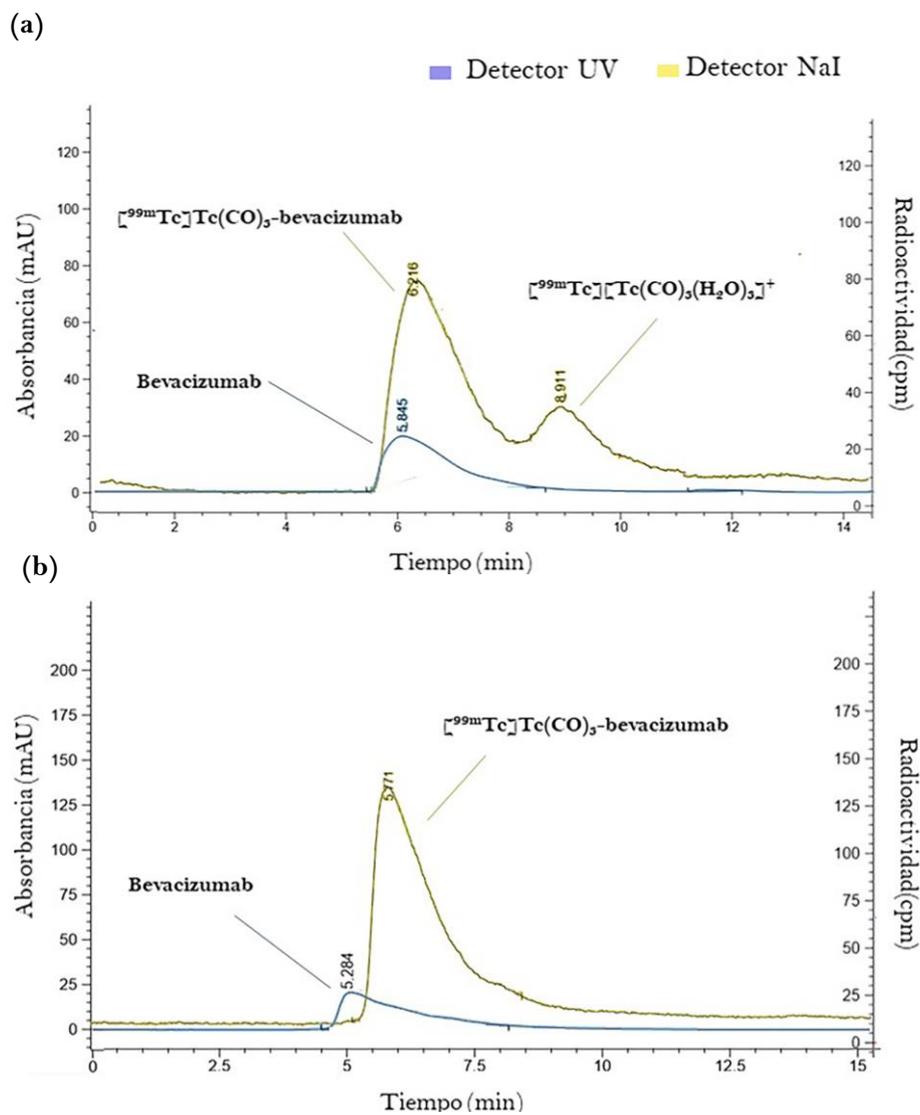


Figura VI. 12. Cromatograma del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ (a) antes y (b) después antes de la purificación.

4.4 Estudio de estabilidad [^{99m}Tc]Tc-bevacizumab-L y [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-bevacizumab

4.4.1 Determinación de la temperatura de conservación del anticuerpo marcado

El valor del % PRQ del anticuerpo radiomarcado descendió a lo largo del tiempo evaluado, independientemente del método de marcaje empleado. No obstante, tras 24 horas de incubación la disminución fue menor cuando se utilizaron carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$ como estrategia de marcaje (Tabla VI. 5). Los resultados de los marcajes mediados por L_{transferencia} obtuvieron un % PRQ ≥ 95 una hora después de su preparación y cuando la muestra que se mantuvo a refrigerada. A partir de entonces el valor del % PRQ descendió de forma progresiva y con dependencia del ligando empleado en el radiomarcaje.

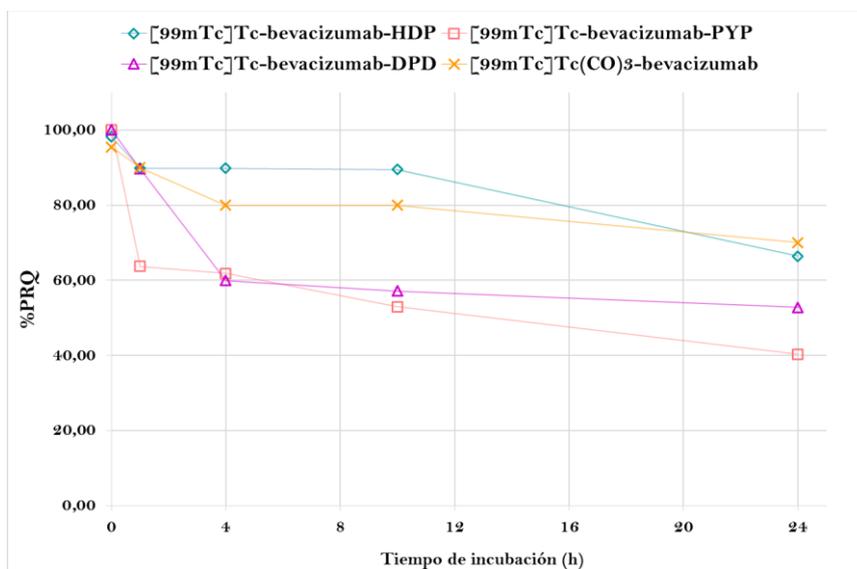
	Marcaje mediado por ligando						Marcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$	
	HDP		PYP		DPD		T _{ambiente}	4°C
	T _{ambiente}	4°C	T _{ambiente}	4°C	T _{ambiente}	4°C		
0h	96,87	96,87	100,00	100,00	100,00	100,00	97,89	97,89
1h	92,00	95,84	75,98	96,14	93,88	98,26	98,00	97,00
4h	69,37	73,30	70,76	87,34	89,99	90,66	95,00	96,00
10h	67,19	73,53	68,59	84,13	85,56	89,08	95,00	95,40
24h	60,76	69,54	61,13	73,58	81,77	82,49	94,90	95,00

Tabla VI. 5. Resultados obtenidos después de incubar muestras de los radiomarcaje a temperatura ambiente y refrigerado.

4.4.2 Incubación del anticuerpo radiomarcado en medio competitivo

Los resultados obtenidos indicaron que tras la incubación del anticuerpo radiomarcado en un medio competitivo hubo transquelación del tecnecio-99m a partir de la primera hora de incubación en todas las muestras (Gráfica VI. 3). La mayor disminución de PRQ la obtuvo el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-PYP, con un valor del 63,76 % después de 1 hora de incubación y que a partir de entonces tuvo una pérdida progresiva a lo largo del estudio hasta alcanzar un valor de PRQ = 40,30 % a las 24 horas. El descenso de % PRQ del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-DPD fue menor con valores de 61,86 % y 52,79 % tras 4 y 24 horas de incubación, respectivamente.

Las especies $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-HDP y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab demostraron ser los radiomarcajes las especies con menor transquelación con una PRQ del 66,42 % y del 70 % respectivamente.



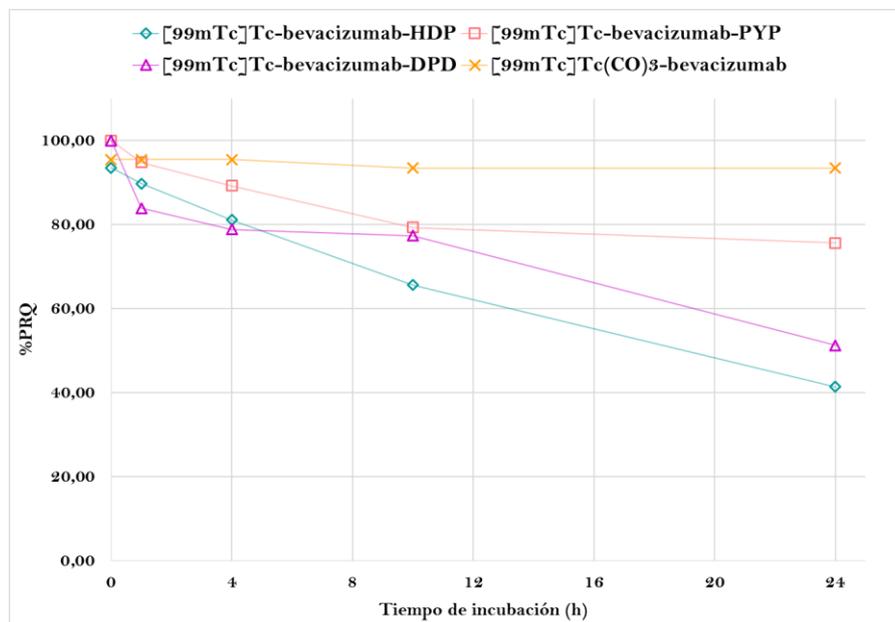
Gráfica VI. 3. Ensayo de estabilidad del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab tras incubarlo en un medio competitivo. a 37 °C.

4.4.3 Incubación del anticuerpo radiomarcado en plasma

El análisis de los datos (Gráfica VI. 4) evidenció que el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ fue el radiomarcaje más estable durante las 24 horas analizadas (% PRQ = 97,2).

Los marcajes mediados por DPD y PYP mostraron un descenso de la PRQ similar a las 4 horas (81,17 % y 89,31%) y a las 10 horas de incubación (77,37 % y 79,32 %). Sin embargo, las muestras analizadas a las 24 horas indicaron una mayor estabilidad radioquímica del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-PYP}$ respecto a $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-DPD}$.

El $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-HDP}$ un descenso superior y más rápido de la PRQ en comparación con los marcajes mediados con los otros ligando (PRQ de 81,17 % pasadas las 4 horas, 65,67 % pasadas 10 horas y 41,44 % a las 24 horas)



Gráfica VI. 4. Estabilidad de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab}$ tras incubación en plasma.

4.5 Caracterización del anticuerpo tras el radiomarcaje

4.5.1 Peso molecular del anticuerpo radiomarcado

La Figura VI. 13 muestra de forma representativa el análisis del peso molecular del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L. Tras teñir la membrana de nitrocelulosa con azul de Coomassie, se reveló que las muestras de bevacizumab reducido y las de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-L presentaron bandas triples de varios pesos moleculares (150 kDa y 25-20 kDa). No obstante, la determinación de la radioactividad presente en cada pocillo de la membrana indicó, con independencia del ligando empleado, que la radioactividad presente sólo estaba asociada al fragmento de 150 kDa, tal y como se muestra en la Figura VI. 14.

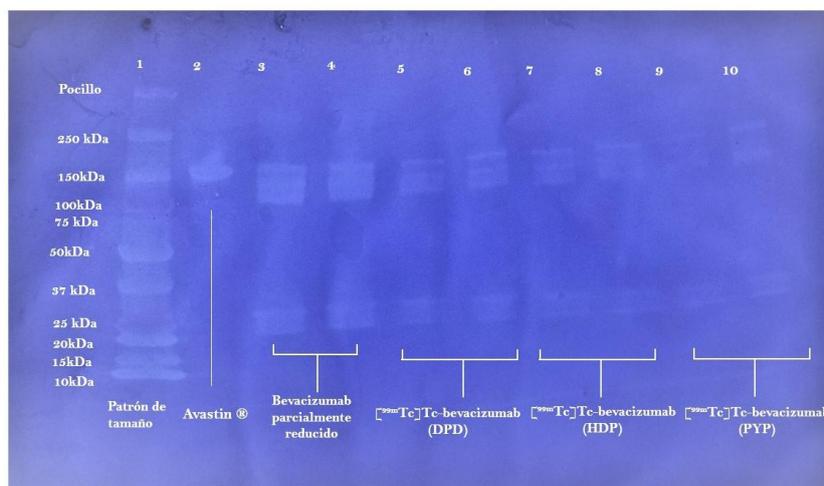


Figura VI. 13 Análisis de la integridad del anticuerpo marcado con ligandos. En la membrana de nitrocelulosa, teñida con azul de Coomassie, pueden observarse las siguientes muestras en los pocillos: (1) el marcador de tamaño, (2) muestra control de Avastin, (3,4) muestra control de bevacizumab parcialmente reducido y purificado, (5, 6) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-DPD, (7, 8) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-HDP y (9, 10) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-PYP.

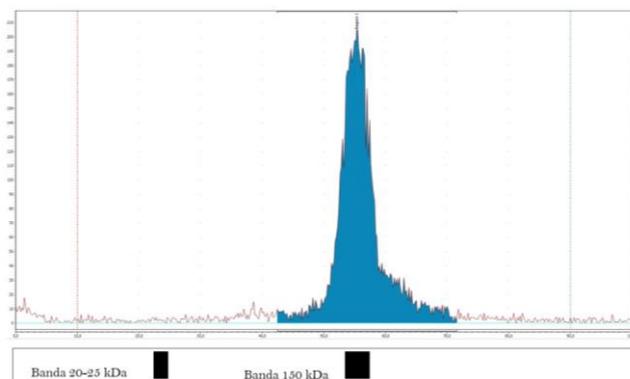


Figura VI. 14. Determinación de la actividad presente en la membrana. Cromatograma correspondiente al pocillo 7 (muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-HDP representadas en la Figura VI. 13) pero representativo de lo obtenido para cada uno de los marcajes analizados.

Por otro lado, los resultados del análisis de la integridad de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab indicaron una preservación de la integridad de anticuerpo, con una sola banda, correspondiente a 150 kDa (Figura VI. 15), y un perfil idéntico al observado en las muestras control de Avastin® y bevacizumab purificado de excipientes. La determinación de radioactividad indicó la presencia de un solo pico coincidente a la banda de 150 kDa.

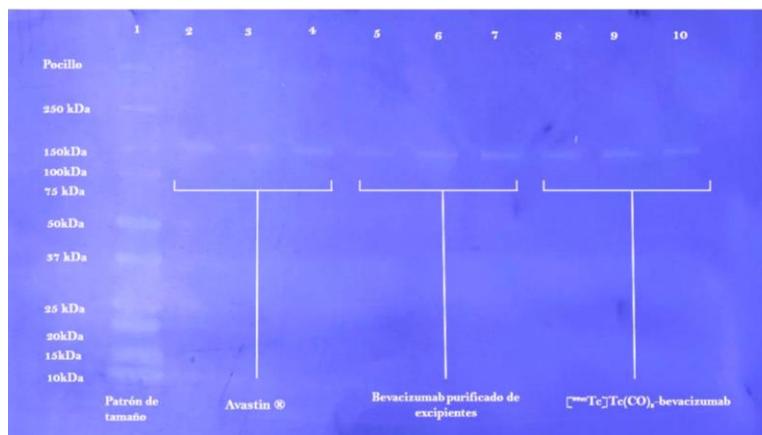
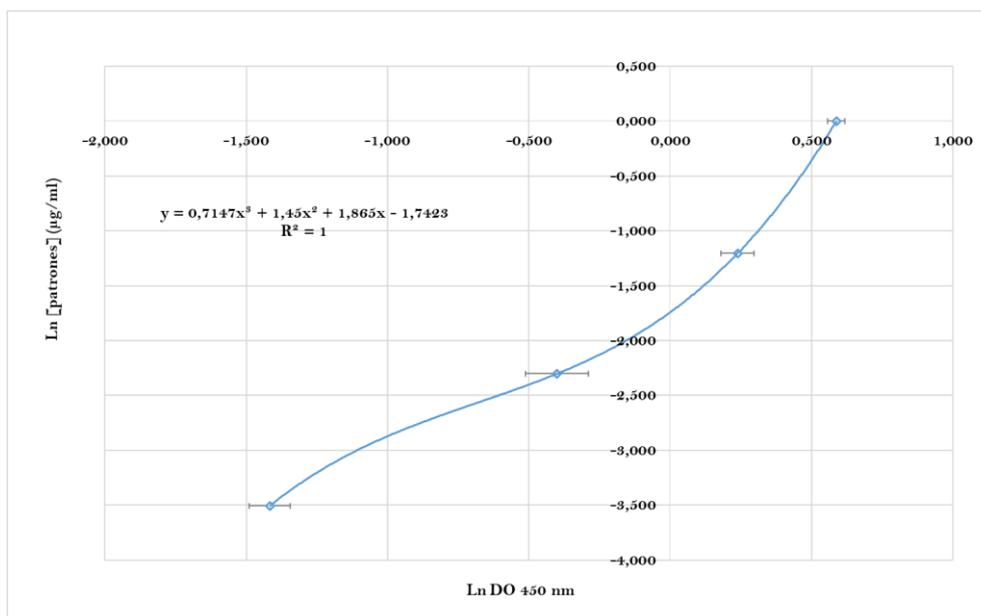


Figura VI. 15. Análisis de la integridad del anticuerpo marcado carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$. En la membrana de nitrocelulosa, teñida con azul de Coomassie, pueden observarse las siguientes muestras en los pocillos: (1) el marcador de tamaño, (2,3,4) muestra control de Avastin, (5, 6, 7) muestra control de bevacizumab purificado, (8, 9 y 10) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab.

4.5.2 Actividad biológica del anticuerpo radiomarcado

Los resultados obtenidos de la curva patrón (Gráfica VI. 5) muestran un ajuste polinómico de 3° grado y un coeficiente de correlación de Pearson $r^2 = 1$.



Gráfica VI. 5. Curva patrón del ensayo ELISA para cuantificación del anticuerpo activo tras el radiomarcaje.

Empleando la ecuación resultante de la curva de calibración, se determinó la cantidad de bevacizumab activo tras el radiomarcaje (Tabla VI. 6).

Tipo de marcaje	Ligando intermedio	%BA
Mediado por ligando	HDP	27,69 ± 1,24
	PYP	1,71 ± 3,53
	DPD	12,09 ± 1,46
Directo con carbonilocomplejos de ^{99m} Tc(I).	---	84,36 ± 0,03

Tabla VI. 6. Porcentaje de bevacizumab activo (% BA) tras someterlo al proceso de radiomarcaje. Expresado como el promedio ± SD (n=3).

5. DISCUSIÓN

El radiomarcaje de moléculas con tecnecio-99m sigue siendo una de las líneas de investigación más explotada en el campo de la radiofarmacia [36] por las numerosas ventajas que ofrece [37]. Por su naturaleza de metal de transición, el radiomarcaje con tecnecio-99m implica el desarrollo de una química de coordinación [38] que bien puede seguir un mecanismo de unión directa con el radiometal o indirecta si se emplea un ligando que una la molécula con el radionucleido.

Para marcar el bevacizumab se emplearon dos métodos de marcaje directo con tecnecio-99m. A fin de evitar reacciones de competición en el radiomarcaje con los excipientes [29,30] en primer lugar se purificó la solución de comercial de Avastin®. El análisis de una muestra del fármaco y del bevacizumab-PE evidenció una disminución del R_t y del % PQ. Esto puede relacionarse con el proceso de purificación de excipientes de la formulación farmacéutica de bevacizumab, entre los que se encuentra el tween-20 [39]. El tween-20 es un tensoactivo no iónico que se utiliza como excipiente en la industria farmacéutica; se añade a las soluciones comerciales de anticuerpos monoclonales con la finalidad de alargar la vida útil del fármaco, ya que ayuda a prevenir la degradación de la cadena polipeptídica y evita fenómenos de agregación [40,41]. La impureza observada en los dos cromatogramas tenía un R_t inferior al del mAb, pudiendo ser compatible con dicho fenómeno de agregación y cuya concentración aumentó en ausencia de excipientes.

El radiomarcaje con tecnecio-99m mediado por un $L_{transferencia}$ fue de las primeras estrategias propuestas para marcar mAb [42]. Este procedimiento requiere la activación previa del mAb mediante una reducción parcial de sus puentes disulfuro, lo que puede resultar agresivo para biomoléculas que ya tienen de por sí tendencia a la degradación físico-química en ausencia de excipientes [43]. Sin embargo, tras reducir parcialmente el bevacizumab el análisis por SEC-HPLC

mostró un R_t y un % PQ semejantes de la muestra de bevacizumab-PE. Tras el radiomarcaje el análisis realizado por radio-SEC-HPLC mostró una elevada PQ del bevacizumab con independencia del $L_{\text{transferencia}}$ utilizado. No obstante, el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab-DPD}$ mostró una elevada cantidad de DPD en comparación con los otros dos marcajes; como ya se describió en el apartado 3.4, el volumen de la solución de cada $L_{\text{transferencia}}$, añadida sobre el bevacizumab-R, se ajustó en función de la cantidad deseada de SnCl_2 ($2 \mu\text{g}$), por lo que la cantidad de $L_{\text{transferencia}}$ presente en el radiomarcaje mediado por DPD, fue superior al mediado por ejemplo por HDP (117 mg vs 18 mg). Sin embargo, esta impureza no compite con el radionúclido, como se comprueba porque no se visualiza en el detector de radioactividad, y por tanto no supone impureza que pueda afectar en la interpretación de las imágenes SPECT/CT.

En segundo lugar se probó la estrategia de radiomarcaje con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ propuesta por Alberto et al. [20]. Este método presenta la ventaja de preparar el precursor radiomarcado por separado, permitiendo radiomarcarse el mAb en condiciones menos agresivas y sin modificarlo previamente [22,44]. Los resultados obtenidos indicaron que el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ se obtuvo con un % PQ > 95 y un % PRQ ≈ 70 %, aunque tras la purificación la PRQ aumentó hasta superar el 95 %.

Los resultados obtenidos de los estudios de estabilidad de la unión entre el radiometal y el bevacizumab para cada uno de los radiomarcajes realizados indicaron que, el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ fue estable a las dos temperaturas de conservación testadas y tras su incubación en plasma, mostrando sólo señales de degradación cuando se incubó con un exceso molar de un ligando competitivo, fenómeno también reportado por otros grupos [28,45].

Por otro lado, el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-L}$ sólo fue estable tras 1 hora de conservación, a cualquiera de las temperaturas testadas y con independencia del ligando empleado en el radiomarcaje. A partir de entonces el % PRQ obtuvo valores

inferiores al valor mínimo definido en los criterios de aceptación.

Al incubar el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-L}$ en un medio competitivo y en un medio biológico también mostró signos de inestabilidad radioquímica, con un descenso de la PRQ del 30-60 % a las 24 horas. Estos resultados, a diferencia de los obtenidos por autores como Liu et al [46], son indicativo de que la unión radiometal-anticuerpo no es estable.

El análisis de la membrana de nitrocelulosa, teñida con azul de Coomassie, indicó una preservación de la integridad de la estructura cuando el radiomarcaje se realizó con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$, que además mostró ser la radioactiva al analizarlo con un radiocromatógrafo. En cambio, las muestras de bevacizumab-R y las de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-L}$ evidenciaron varias bandas con diferentes tamaños moleculares, si bien sólo la correspondiente a 150 kDa mostró radioactividad. Este hecho puede ser considerado una consecuencia del propio proceso de activación del anticuerpo, aunque en tal caso debería haberse datado en los ensayos de radio-SEC-HPLC; los fragmentos de anticuerpo tienen un peso molecular superior a alícuota control $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$, cuyo $R_t = 9,766$ min, es decir, de haber estado presentes en cualquiera de las muestras debería haberse registrado un pico antes de dicho tiempo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la matriz de las alícuotas inyectadas en la columna y las analizadas mediante electroforesis son distintas, pues la analizadas por radio-SEC-HPLC no contienen SDS, pudiendo ser la razón por la que no se correlacionan los resultados [47]. De igual modo los datos obtenidos del ensayo de ELISA evidenciaron que sólo el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ mantuvo un porcentaje elevado de inmureactividad, ya que las muestras de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-bevacizumab-L}$ obtuvieron porcentajes muy bajos.

En este contexto, se puede afirmar que, de las estrategias de marcaje probadas, sólo el radiomarcaje de bevacizumab realizado con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$

reúne las condiciones adecuadas, y por tanto será la que se emplee en el siguiente capítulo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Salouti, H. Rajabi, M.H. Babaei, M.J. Rasaee, R. Najafi, M. Paknejad, M. Hasan, T. Altarihi, J.M. Nejad, A new monoclonal antibody radiopharmaceutical for radioimmunoscintigraphy of breast cancer: Direct labeling of antibody and its quality control, *Daru*. 14 (2006) 51–56. <https://www.researchgate.net/publication/259009915> (accessed March 27, 2019).
- [2] P. Bello, M.I. Almoguera, M. Pajares, C. Olivas, L. Lapeña, J.M. Freire, Radioinmunoterapia con cloruro de itrio-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), *Rev. Española Med. Nucl.* 29 (2010) 50–52. <https://doi.org/10.1016/j.rem.2009.11.003>.
- [3] S. Potamianos, A.D. Varvarigou, S.C. Archimandritis, Radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: Principles and application, *Anticancer Res.* 20 (2000) 925–948.
- [4] B.M. Zeglis, J.S. Lewis, The Bioconjugation and Radiosynthesis of ⁸⁹Zr-DFO-labeled Antibodies, *J. Vis. Exp.* (2015). <https://doi.org/10.3791/52521>.
- [5] F. James Primus, H.J. Hansen, Photoscan Localization of GW-39 Tumors in Hamsters Using Radiolabeled Anticarcinoembryonic Antigen Immunoglobulin G, *Cancer Res.* 34 (1974) 1–9.
- [6] D.J. Vugts, G.A.M.S. van Dongen, Immunoglobulins as Radiopharmaceutical Vectors, in: B.M. Lewis, Jason S.;Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), *Radiopharm. Chem.*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 163–179. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_9.
- [7] J. Garousi, A. Orlova, F.Y. Frejd, V. Tolmachev, Imaging using

- radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 5 (2020) 16. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00094-w>.
- [8] T. Stigbrand, D. Eriksson, K. Riklund, L. Johansson, Targeting tumours with radiolabeled antibodies, in: *Target. Radionucl. Tumor Ther. Biol. Asp.*, 2008: pp. 59–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8696-0_4.
- [9] J.C. Knight, M.J. Mosley, V. Kersemans, G.M. Dias, P.D. Allen, S. Smart, B. Cornelissen, Dual-isotope imaging allows in vivo immunohistochemistry using radiolabelled antibodies in tumours, *Nucl. Med. Biol.* 70 (2019) 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.01.010>.
- [10] M.J.W.D. Vosjan, L.R. Perk, G.W.M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G.E. Kiefer, G.A.M.S. van Dongen, Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 739–743. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.13>.
- [11] D.J. Hnatowich, G. Mardirossian, M. Rusckowski, M. Fogarasi, F. Virzi, P. Winnard Jr, Directly and Indirectly Technetium-99m-Labeled Antibodies A Comparison of In Vitro and Animal In Vivo Properties, *J. Nucl. Med.* . 34 (1993) 109–119. <http://jnm.snmjournals.org/content/34/1/109.full.pdf>.
- [12] A. Jiménez Heffernan, P.I. Contreras Puertas, Á.C. Rebollo Aguirre, Gammagrafía con fragmentos Fab' antigranulocitos-99mTc (sulesomab, leukoscan) y ósea en tres fases en el estudio de las prótesis de cadera y rodilla dolorosas, *Rev. Española Med. Nucl.* 21 (2002) 286–293. [https://doi.org/10.1016/S0212-6982\(02\)72090-9](https://doi.org/10.1016/S0212-6982(02)72090-9).
- [13] J.D. Douketis, J.S. Ginsberg, S. Haley, J. Julian, M. Dwyer, M. Levine, P.R. Eisenberg, R. Smart, W. Tsui, R.H. White, T.A. Morris, S. Kaatz, P.C. Comp, M.A. Crowther, C. Kearon, J. Kassis, S.M. Bates, S. Schulman, L.

- Desjardins, R. Taillefer, S.M. Begelman, M. Gerometta, Accuracy and safety of ^{99m}Tc-labeled anti-D-dimer (DI-80B3) Fab' fragments (ThromboView®) in the diagnosis of deep vein thrombosis: A phase II study, *Thromb. Res.* 130 (2012) 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.05.011>.
- [14] W.S. Richter, V. Ivancevic, J. Meller, O. Lang, D. Le Guludec, I. Szilvazi, H. Amthauer, F. Chossat, A. Dahmane, C. Schwenke, A. Signore, ^{99m}Tc-besilesomab (Scintimun®) in peripheral osteomyelitis: comparison with ^{99m}Tc-labelled white blood cells, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 38 (2011) 899–910. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1731-2>.
- [15] M.M. Alauddin, L.A. Khawli, A.L. Epstein, An improved method of direct labeling monoclonal antibodies with ^{99m}Tc., *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* 19 (1992) 445–54. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(92\)90159-v](https://doi.org/10.1016/0883-2897(92)90159-v).
- [16] B.A. Rhodes, P.O. Zamora, K.D. Newell, E.F. Valdez, *Technetium-99m Labeling of Murine Monoclonal Antibody Fragments*, 1986. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.880.2149&rep=rep1&type=pdf> (accessed June 6, 2019).
- [17] C.H. Paik, L.N.B. Phan, J.J. Hong, M.S. Sahami, S.C. Heald, R.C. Reba, J. Steigman, W.C. Eckelman, The labeling of high affinity sites of antibodies with ^{99m}Tc, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 12 (1985) 3–8. [https://doi.org/10.1016/0047-0740\(85\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0047-0740(85)90004-X).
- [18] S.A. Schwarz A, A novel approach to Tc-99m- labelled monoclonal antibodies, *J. Nucl. Med.* 28 (1987) 721.
- [19] S.J. Mather, D. Ellison, Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies., *J. Nucl. Med.* 31 (1990) 692–697. <http://jnm.snmjournals.org/content/31/5/692.full.pdf> (accessed April 24, 2017).

- [20] T.A. Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, A.P., Abram, U., Kaden, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand [8], *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 7987–7988. <https://doi.org/10.1021/ja980745t>.
- [21] R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, U. Abram, P.A. Schubiger, Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl complexes: A hint for the future functionalization of biomolecules, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 345–351. <https://doi.org/10.1021/bc990127h>.
- [22] R. Alberto, U. Abram, ^{99m}Tc : Labeling Chemistry and Labeled Compounds, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), *Handb. Nucl. Chem.*, Springer US, Boston, MA, 2011: pp. 2073–2120. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2_43.
- [23] R. Waibel, R. Alberto, J. Willuda, R. Finnern, R. Schibli, A. Stichelberger, A. Egli, U. Abram, J.P. Mach, A. Plückthun, P. a Schubiger, Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel $\text{Tc}(\text{I})$ -carbonyl complex., *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 897–901. <https://doi.org/10.1038/12890>.
- [24] A.P. Alberto, R., Schibli, R., Waibel, R., Abram, U., Schubiger, Basic aqueous chemistry of $[M(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ($M = \text{Re}, \text{Tc}$) directed towards radiopharmaceutical application, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 901–919. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00128-9).
- [25] D.R. Van Staveren, P.D. Benny, R. Waibel, P. Kurz, J.K. Pak, R. Alberto, S-functionalized cysteine: Powerful ligands for the labelling of bioactive molecules with triaquatricarbonyltechnetium-99m(1^+) ($[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$), *Helv. Chim. Acta.* 88 (2005) 447–460.

<https://doi.org/10.1002/hlca.200590029>.

- [26] A. Egli, R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwé, L. Jeannin, K. Iterbeke, P.A. Schubiger, Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity., *J. Nucl. Med.* 40 (1999) 1913–1917.
- [27] I. Luis de Redín, C. Boiero, M.C. Martínez-Ohárriz, M. Agüeros, R. Ramos, I. Peñuelas, D. Allemandi, J.M. Llabot, J.M. Irache, Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab, *Int. J. Pharm.* 541 (2018) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.003>.
- [28] X. Camacho, M.F. García, V. Calzada, M. Fernández, J.A. Chabalgoity, M. Moreno, R. Barbosa De Aguiar, O. Alonso, J.P. Gambini, R. Chammas, P. Cabral, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]-radiolabeled bevacizumab: In vitro and in vivo evaluation in a melanoma model, *Oncol.* 84 (2013) 200–209. <https://doi.org/10.1159/000338961>.
- [29] A. Khorami-Moghadam, K. Yavari, B. Bolouri, M. Ghannadi-Maragheh, A.R. Jalilian, A. Bahrami-Samani, Production and quality control of [^{166}Ho]-DOTA-bevacizumab for therapeutic applications, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 291 (2012) 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s10967-012-1640-2>.
- [30] C. Fontan, C. Bezombes, A.S. Salabert, J. Costes, R. Lopez, J.J. Fournie, H. Avet-Loiseau, Y. Coulais, P. Payoux, M. Tafani, Radiolabelling rituximab with ^{99m}Tc in three steps procedure, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 58 (2015) 274–280. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3283>.
- [31] Z.M. Zhang, J.R. Ballinger, K. Sheldon, I. Boxen, Evaluation of reduction-mediated labelling of antibodies with technetium-99m, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation.* 19 (1992) 607–609. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(92\)90094-F](https://doi.org/10.1016/0883-2897(92)90094-F).

- [32] FDA, Technescan™ HDP Kit for the Preparation of Technetium Tc 99m Oxidronate, (2017).
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/018321s022lbl.pdf (accessed June 11, 2019).
- [33] Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios, Ficha técnica del Teceos, (2012) 1–11.
- [34] Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios, Ficha técnica PYP Technescan, Madrid, España, 2013.
- [35] M. Biotek, SHIKARI Q-BEVA Manual, (n.d.) 1–12.
- [36] B.A. Rhodes, P.O. Zamora, K.D. Newell, E.F. Valdez, Technetium-99m Labeling of Murine Monoclonal Antibody Fragments, 1986.
https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-540-33990-8_2
(accessed April 2, 2019).
- [37] U. Mazzi, R. Schibli, H.-J. Pietzsch, J.-U. Küntler, H. Spies, Technetium in Medicine, in: I. Zolle (Ed.), Technetium-99m Pharm., 1st ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007: pp. 7–58.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_2.
- [38] S.R. Banerjee, K.P. Maresca, L. Francesconi, J. Valliant, J.W. Babich, J. Zubietta, New directions in the coordination chemistry of 99mTc: A reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design, Nucl. Med. Biol. 32 (2005) 1–20.
<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001>.
- [39] S.A. Giannos, E.R. Kraft, Z.-Y. Zhao, K.H. Merkle, J. Cai, Formulation Stabilization and Disaggregation of Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept in Dilute Solutions, Pharm. Res. 35 (2018) 78.
<https://doi.org/10.1007/s11095-018-2368-7>.

- [40] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, V. Sautou, Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review, *J. Pharm. Sci.* 109 (2020) 169–190. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>.
- [41] N.B. Bam, Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1554–1559. <https://doi.org/10.1021/js980175v>.
- [42] B.A. Rhodes, Direct labeling of proteins with Tc-99m, *Nucl. Med. Biol.* 18 (1991) 667–676. https://ac.els-cdn.com/0883289791900045/1-s2.0-0883289791900045-main.pdf?_tid=df60eb2a-02c4-421e-8858-29c3b207fa43&acdnat=1521719289_e2aeb3fd6713f58487d1d2d41f258f46 (accessed March 22, 2018).
- [43] P. Arosio, B. Jaquet, H. Wu, M. Morbidelli, On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution, *Biophys. Chem.* 168–169 (2012) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2012.05.004>.
- [44] R. Alberto, The particular role of radiopharmacy within bioorganometallic chemistry, *J. Organomet. Chem.* 692 (2007) 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.11.019>.
- [45] M.F. García, X. Camacho, V. Calzada, M. Fernandez, W. Porcal, O. Alonso, J. Pablo Gambini, P. Cabral, Synthesis of ^{99m}Tc-Nimotuzumab with Tricarbonyl Ion: in vitro and in vivo Studies, *Curr. Radiopharm.* 5 (2012) 59–64. <https://doi.org/10.2174/1874471011205010059>.
- [46] B. Xu, Y. Yu, H. Chen, S. Mo, N. Liu, J. Jin, Q. Chen, Direct ^{99m}Tc labeling of monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents and HPLC analysis, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 41 (2002) 37–45. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1344\(199801\)41:1<37::aid-jlcr51>3.3.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1344(199801)41:1<37::aid-jlcr51>3.3.co;2-7).

- [47] E. John, S. Wilder, M.L. Thakur, Structural perturbations of monoclonal antibodies following radiolabelling, *Nucl. Med. Commun.* 15 (1994) 24–28.
<https://doi.org/10.1097/00006231-199401000-00005>.

VII. ENCAPSULACIÓN DEL ANTICUERPO RADIOMARCADO: CARACTERIZACIÓN DEL NANOSISTEMA Y EVALUACIÓN *IN VIVO*.

En este capítulo se describe el desarrollo y la caracterización de un nanosistema de albúmina sérica humana cargado con [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-bevacizumab y la evaluación de su biodistribución mediante imagen SPECT/CT.

1. INTRODUCCIÓN

La **nanomedicina**, considerada como uno de los campos de la nanotecnología con aplicaciones directas en medicina, ofrece numerosas ventajas como plataforma de liberación de agentes terapéuticos [1]. A pesar de los prometedores resultados preclínicos que ofrece, pocos nanomedicamentos consiguen ser trasladados a la práctica clínica. Uno de los obstáculos es la falta de ensayos estandarizados para determinar la seguridad y la eficacia de los mismos [2].

Uno de los principales beneficios derivados del uso de nanosistemas, es la capacidad de transportar, concentrar y liberar el fármaco en la diana terapéutica [3]. La liberación de la carga se produce tras la degradación, parcial o total, de las NPs, razón por lo que es crítico una evaluación precisa de la estabilidad de la matriz [4]. Generalmente este análisis se realiza mediante técnicas *in vitro*, que posteriormente se trasladan a un modelo *in vivo*. Sin embargo, este método presenta numerosas limitaciones por la complejidad bioquímica y metabólica de un organismo vivo [5].

En este contexto la **nanoteragnósis** posibilita la evaluación de los nanotransportadores a tiempo real y de forma no invasiva; la elevada ratio superficie/volumen de las NPs ha permitido el diseño y desarrollo de plataformas multifuncionales, capaces de combinar un agente de imagen con el agente terapéutico encapsulado [6], lo que permite investigar, de forma no invasiva, el destino de la NP, su estabilidad biológica, su farmacocinética o su captación específica por diferentes órganos [7]; esta información permite predecir posibles efectos toxicológicos o la eficacia terapéutica una vez liberada la carga.

Es importante destacar la importancia de que la evaluación del nanotransportador se haga con el agente terapéutico cargado, pues la presencia de un compuesto farmacológicamente activo afecta a las propiedades de los nanotransportadores, pudiendo condicionar la ruta y la cinética de excreción [8].

El **radiomarcaje de NPs** con distintos tipos de radionúclidos [9] es uno de los procedimientos más utilizados para dotar al nanosistema de carácter teragnóstico [10,11]. En la literatura se describen diversas estrategias para realizar radiomarcajes de NPs (unión del radioisótopo directamente con la cubierta [12], la encapsulación de un RF clínico diluido durante la formación del nanotransportador [13], etc.). No obstante, casi todas ellas se centran en el radiomarcaje del vehículo, asumiendo que la liberación de la carga se produce allí donde se visualiza el foco de captación y obviando el destino final real del agente terapéutico una vez liberado [14,15].

La consideración de un nanosistema con aspiraciones clínicas debe realizarse de forma integral, especialmente cuando se va a emplear como plataforma de liberación sostenida de un agente terapéutico. Un método más exacto de evaluación de nanomedicamentos, empleando la imagen molecular con isótopos radioactivos, sería el radiomarcaje de la carga, ya que permite su visualización

durante la encapsulación y tras su liberación. Esto aportaría una imagen más realista de lo que sucede cuando el nanosistema se administra. No obstante, lo ideal es radiomarcarse tanto el vehículo como la carga y analizarlos de forma conjunta e incluso simultánea, tal como hizo Llop et al. [16].

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo ha sido valorar, mediante imagen SPECT/CT y conteo de órganos, el destino final de las diferentes partes del nanosistema NP-HSA-B-PEG (cubierta y agente terapéutico) tras su administración intravenosa (i.v.). Para ello:

- Se ha radiomarcado de forma directa la cubierta de la formulación con tecnecio-99m, empleando el sistema tipo “kit” optimizado en el capítulo V.
- Se ha utilizado el (^{99m}Tc)Tc(CO)₃-bevacizumab (desarrollado en el capítulo VI) para la preparación del nanosistema.

3. METODOLOGÍA

3.1 Preparación de las formulaciones de nanopartículas

3.1.1 Nanopartículas de HSA recubiertas con PEG

Esta formulación se preparó tal y como se describió en el apartado 3.1.2 del capítulo IV. Para ello 100 mg de HSA se disolvieron en 7,5 ml de agua destilada acidificada a pH 4,9 con HCl 1 M. Las NPs se formaron por adición de 16 ml de etanol en agitación continua y se pegilaron mediante incubación a temperatura ambiente de las NP con una solución de PEG-35000, al 10 % (p/v); los disolventes orgánicos fueron evaporados a presión reducida en un rotavapor Büchi R-144. Se purificaron dos veces mediante centrifugación a 41.000 g

durante 20 min a 4°C. Por último, se liofilizaron utilizando una disolución de sacarosa al 5 % como crioprotector. Esta formulación se identificó como NP-HSA-PEG.

3.1.2 Nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab y recubiertas con PEG

La formulación cargada con bevacizumab se preparó según lo descrito en el apartado 3.1 del capítulo V. Para ello se añadieron 15 mg de Avastin® a 7.5 ml de una disolución acuosa de 13.3 mg/ml de HSA, previamente acidificada (pH 4.9) con HCl 1M. Tras incubar la mezcla durante 10 minutos, se formaron las NP-HSA-B mediante adición de 16 ml de etanol bajo agitación magnética. Tras el proceso de desolvatación, las NP-B-HSA recién formadas se pegilaron mediante incubación a temperatura ambiente con una solución de polietilenglicol 35000 al 10 % (p/v). Se eliminaron los disolventes orgánicos mediante evaporación a baja presión y se liofilizó con una solución crioprotectora de sacarosa al 5 %. Esta formulación se identificó como NP-HSA-B-PEG.

3.2 Radiomarcaje directo con tecnecio-99m de las formulaciones NP-HSA-PEG y NP-HSA-B-PEG

La cubierta de las dos formulaciones se radiomarcaron de forma directa con tecnecio-99m empleando un sistema tipo “kit”; la preparación del equipo reactivo se realizó en base a los resultados obtenidos en los capítulos anteriores (IV, 4.2.1 y V, 4.3.1). Para ello 0,5 mg de cada una de las formulaciones se mezclaron con 40 µl de una disolución de $[\text{SnCl}_2] = 0.05 \text{ mg/ml}$; los viales se purgaron durante 5 minutos con helio a fin de minimizar el % VTP_n observado en el capítulo V, y a continuación se radiomarcaron con una disolución de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ recién

eluida (1 ml, 55.5 ± 12 MBq). Ambas mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Estas formulaciones radiomarcadas se identificaron como [^{99m}Tc]-NP-HSA-PEG y [^{99m}Tc]-NP-HSA-B-PEG.

Como control de calidad del radiomarcaje se evaluaron:

- I. **El TP y el PDI de las formulaciones**, antes de la preparación del “kit” y después de la incubación con el radiometal, mediante correlación fotónica, empleando un analizador Zetamaster; para ello se resuspendieron en agua tipo I con una relación 1:10 y se midieron ambos parámetros a 25°C con ángulo de 90°.
- II. **El Rf y el % PRQ** mediante cromatografía ascendente en papel Whatmann 3MM con tiras de 1 x10 cm, empleando NaCl 0,9 % como fase móvil y un radiocromatógrafo MiniGita equipado con un detector 2 x 2 de NaI(Tl).

Los criterios de aceptación empleados fueron los ya descritos en el capítulo 5 (PDI $\leq 0,3$, una VTP₀ < 10 %, Rf=0 y % PRQ > 95).

3.3 Radiomarcaje y encapsulación del bevacizumab

3.3.1 Purificación de excipientes del bevacizumab, cuantificación mediante espectrofotometría UV-VIS y análisis de la pureza química.

La solución de Avastin® se purificó de excipientes mediante SEC siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1 del capítulo VI; 125 µl de la solución de Avastin® se completaron con NaCl 0,9 % hasta un volumen final de 0,5 ml, se introdujeron en una columna MidiTrap G-25 y se eluyeron empleando

PBS como fase móvil (1 ml, 2 alícuotas) en base al perfil de elución del mAb obtenido en el capítulo anterior por UV-VIS ($\lambda=280$ nm).

Se determinó la absorbancia a $\lambda=280$ nm del bevacizumab-PE y se determinó su concentración según la Ley de Lambert-Beer (Ecuación VII. 1), utilizando el coeficiente de absortividad molar determinado de forma empírica en el apartado 4.1 del capítulo anterior ($\xi_{\text{bevacizumab}, 280 \text{ nm}} = 1.2957 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$[\text{bevacizumab}_{PE}] = \frac{\xi_{\lambda=280\text{nm}} \times \text{longitud del camino óptico}}{\text{Absorbancia}_{\lambda=280\text{nm}}}$$

Ecuación VII. 1. *Calculo de la concentración de bevacizumab purificado de excipientes. Concentración calculada se expresa en mg/ml.*

Una muestra de Avastin® y de bevacizumab-PE se analizaron mediante SEC-HPLC. Para ello se empleó una columna analítica Yarra x150 que se eluyó con una solución de 0,15 M de NaCl en 0,1 M PBS a un flujo constante (0.3 ml/min). Se determinó el R_t y el % PQ de las muestras utilizando un sistema de HPLC Agilent 1200A acoplado un detector DAD ($\lambda=200-280$ nm).

3.3.2 Preparación del precursor y control de calidad.

Se preparó el precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, según lo descrito en el apartado 3.4 del capítulo VI. Para ello se reconstituyó un vial Isolink™ con una solución de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ (1 ml, 740 ± 74 MBq). La mezcla se incubó a 100 °C durante 30 minutos en bloque seco Tembloc y tras enfriarse hasta temperatura ambiente, se neutralizó con una disolución de PBS 0,1 M/HCl 1 M (40:60) hasta pH = 7,0.

El precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ se caracterizó mediante:

- I. Radiocromatografía planar** empleando tiras ALUGRAM® RP-18 (1 x 10 cm) como fase estacionaria y Na₃C₆H₅O₇ (0,1 M, pH=6) / MeOH (50:50) como fase móvil. Tras el desarrollo de las tiras se determinó el Rf y el % PRQ empleando un radiocromatógrafo MiniGita. Los criterios de aceptación aplicados se resumen en la Tabla VII. 1.

Especie	Rf	% PRQ
$[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$	0,0 ± 0,1	≤ 5
$fac-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	0,7 ± 0,1	≥ 95
$[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	1,0 ± 0,1	≤ 5

Tabla VII. 1. Rf y PRQ exigida en el marcaje de las distintas especies analizadas

- II. Radio-SEC-HPLC** empleando el mismo método analítico descrito en el apartado 3.3.1; al equipo de HPLC se añadió un detector de radioactividad Raytest (E_{pico}=140 keV) acoplado en línea con el detector DAD.

Se determinó el Rt, el % PQ y el % PRQ de las especies utilizando un sistema de HPLC Agilent 1200A acoplado a un detector de radioactividad Raytest (E_{pico}= 140keV) y un detector DAD (λ=200-280 nm). Los criterios de aceptación aplicados se resumen en la Tabla VII. 2,

Especie	Rt	% PRQ	% PQ
$fac-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	8,5 ± 0,6	≥ 95	≥ 95
$[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	16,0 ± 0,6	≤ 5	≤ 5

Tabla VII. 2. Criterios para evaluar la pureza de $fac-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$.

3.3.3 Radiomarcaje del bevacizumab y control de calidad.

Tras su neutralización, el precursor $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ se incubó durante 30 minutos, a 37°C y con agitación constante con una fracción de bevacizumab-PE, en una ratio molar 1:700 ($^{99m}\text{Tc}/\text{mAb}$). A continuación, se purificó mediante ultrafiltración por centrifugación (2800 g, 20 minutos). Este compuesto se identificó como $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}]$.

El anticuerpo radiomarcado, antes y después de la purificación, se caracterizó mediante radiocromatografía planar y radio-SEC-HPLC utilizando los mismos protocolos descrito para el control de calidad del precursor.

Como control de la PQ del bevacizumab después del marcaje, se analizaron en iguales condiciones una muestra de Avastin® y una muestra de bevacizumab-PE.

Los criterios de aceptación aplicados se resumen en la Tabla VII. 3.

Técnica analítica	Especie	Rf/Rt*	% PRQ	% PQ
Radiocromatografía planar	$[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}]$	$0,0 \pm 0,1$	≥ 95	---
	$fac\text{-}[\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	$0,7 \pm 0,1$	≤ 5	----
	$[\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	$1,0 \pm 0,1$	≤ 5	----
Radio-SEC-HPLC	$[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}]$	$5,8 \pm 0,6$	≥ 95	≥ 95
	$fac\text{-}[\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	$7,5 \pm 0,4$	≤ 5	≤ 5
	$[\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$	$9,8 \pm 0,7$	≤ 5	≤ 5

Tabla VII. 3. Criterios para evaluar la pureza de $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}]$.

* Rf para cromatografía planar y Rt para radio-SEC-HPLC.

3.3.4 Encapsulación del anticuerpo y control de calidad de la formulación

Tras su purificación, el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ se encapsuló en una matriz de HSA. Para ello 4 mg de bevacizumab (2 mg de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ + 2 mg de bevacizumab no marcado y no purificado de excipientes) se añadieron a una disolución acuosa de HSA (13.3 mg/ml) previamente acidificada con HCl 1M (pH = 4,9). Tras incubar la mezcla durante 10 minutos, se obtuvieron las NPs por adición de 4,3 ml de etanol bajo agitación magnética. Tras el proceso de desolvatación, las NPs recién formadas se estabilizaron con una solución acuosa de PEG al 10 % (p/v); los disolventes orgánicos se eliminaron mediante evaporación a 40°C en atmosfera abierta. Esta formulación se identificó como NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$.

El TP, el PDI, el Rf y el % PRQ de la formulación NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$ se evaluaron usando el mismo protocolo empleado para caracterizar la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ (VII, 3.2)

3.4 Estudios de biodistribución

Se realizaron estudios de biodistribución de tres formulaciones radiomarcadas ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$) para lo cual se establecieron tres grupos de 5 animales cada uno; cada animal recibió una sola dosis, mediante inyección intravenosa en la cola, de 0,5 mg de suspensión radiomarcada completada hasta ~30 mg con su respectiva formulación sin marcar. Las actividades promedio administradas fueron: 4.81 ± 0.30 MBq $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$, 10 ± 0.20 MBq para la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y 140 ± 0.55 MBq para NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$.

Como control de captación fisiológica se emplearon 6 animales adicionales; 3 de ellos recibieron $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Bevacizumab}$ y los otros tres $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$. La dosis promedio administrada por i.v. fue de 55 ± 13 MBq. En la Figura VII. 1 se representa un esquema de los estudios de biodistribución.

De todos los grupos se obtuvieron imágenes SPECT/CT a 1, 4, 10 y 24 horas post-administración. Los animales fueron anestesiados con un 2 % de isoflurano antes de cada estudio y colocados en posición prono en el equipo SPECT-CT de doble cabezal con una matriz de 128 x 128. El tiempo de adquisición fue modificado en función del tiempo transcurrido desde la administración, para eliminar el efecto del decaimiento del tecnecio-99m durante la adquisición de la imagen. El CT se programó a 110 mAs y 130 Kv, 130 imágenes de 3 mm de espesor.

Todas las imágenes fueron analizadas de forma cualitativa con el software Syngo MI Applications TrueD. Para el análisis cuantitativo se dibujaron VOIs en todas las imágenes sobre distintos órganos (cerebro, pulmón, hígado, riñón, intestino y vejiga) y sobre el cuerpo completo de todos los animales utilizando el software Pmod. Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de radioactividad en cada órgano ($\% R_{\text{órgano}}$) según la Ecuación VII. 2.

$$\% R_{\text{órgano}} = \frac{\text{Actividad del órgano}_x \text{ (h) tras la administración (cuentas)}}{\text{Actividad total animal 1h tras la administración (cuentas)}} \times 100$$

Ecuación VII. 2. *Calculo del %Radioactividad en cada órgano mencionado. Actividad cuantificada mediante dibujo de VOIs sobre cada órgano de interés respecto a la actividad cuantificada en ese mismo animal (VOI cuerpo completo) a 1 hora post-administración.*

El bazo, el estómago y el tiroides sólo analizaron cualitativamente; no se realizó cuantificación para evitar una sobreestimación derivada del efecto de spillover², procedente de otros focos de captación.

Tras el último estudio de SPECT/CT, los animales fueron sacrificados mediante inyección de T-61. Se extrajeron, pesaron y midieron en un contador gamma. Los órganos seleccionados (hígado, pulmones, riñones, estómago, tiroides, bazo, intestinos y cerebro). Los datos obtenidos de la cuantificación se corrigieron por decaimiento a la hora de administración; con ellos se calculó el porcentaje de dosis acumulada en cada órgano (% Dosis) según la Ecuación VII.3.

$$\% \text{ Dosis} = \frac{\text{Actividad en el \u00f3rgano } (\mu\text{Ci})}{\text{Actividad inyectada } (\mu\text{Ci})} \times 100$$

Ecuación VII.3. Determinación del porcentaje de dosis acumulada en un \u00f3rgano. Actividad del \u00f3rgano cuantificada en el contador gamma y corregida por decaimiento a la hora de administraci\u00f3n de la dosis.

² Efecto Spillover: falta de discriminaci\u00f3n tridimensional, que tiene como resultado una contribuci\u00f3n indirecta, procedente de una estructura cercana, sobre la radioactividad asociada a la estructura de inter\u00e9s (en este caso un \u00f3rgano); se produce por la falta de resoluci\u00f3n espacial de la gammac\u00e1mara [48].

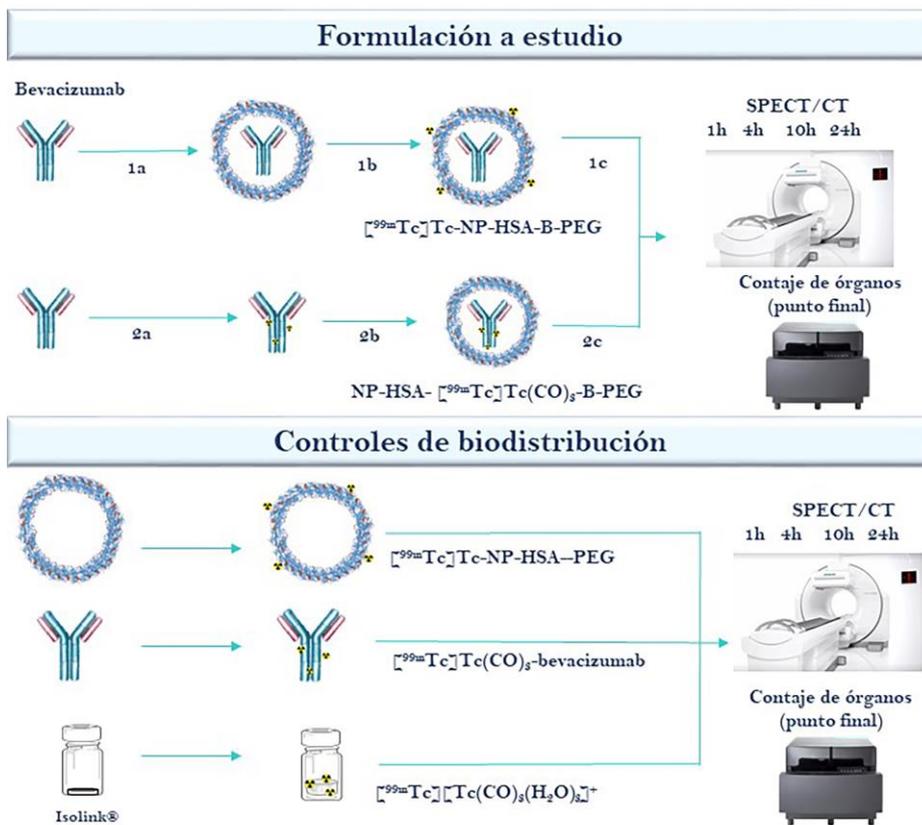


Figura VII. 1. Resumen de la experimentación realizada en este capítulo. **1a.** Radiomarcaje directo con tecnecio-99m de la formulación NP-HSA-PEG **1b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* (n=5). **2a** preparación de la formulación NP-HSA-B-PEG; **2b.** Radiomarcaje directo con tecnecio-99m de la formulación NP-HSA-B-PEG **2c.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* (n=5); **3a.** Radiomarcaje del anticuerpo con el precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ **3b.** Encapsulación de anticuerpo radiomarcado (NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$); **3c.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* (n=5); **4a.** Preparación del precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$; **4b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* (n=3); **5a.** Radiomarcaje anticuerpo con el precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$; **5b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* (n=3). Todos los estudios *in vivo* se han realizado mediante imagen SPECT/CT a 1, 4, 10 y 24 horas post-administración; después de la última imagen se sacrificaron los animales; tras la escisión de los órganos seleccionados, se determinó la radiactividad con un contador gamma.

3.4.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los estudios *ex vivo* se compararon estadísticamente mediante la aplicación de un test Kruskal-Wallis con asociación Turkey-Hammer. Para ello se utilizó el software STATA.

4. RESULTADOS

4.1 Preparación y radiomarcaje de las formulaciones NP-HSA-PEG y NP-HSA-B-PEG.

Las formulaciones NP-HSA-PEG y NP-HSA-B-PEG mostraron un aumento de TP y del PDI tras el radiomarcaje (Tabla VII. 4). Los resultados obtenidos cumplieron los criterios de aceptación propuestos (VII, 3.2), si bien se observó un incremento del % VTP₀ cercano al límite establecido.

Formulación	Antes de preparar el "kit"		Después de preparar el "kit"		VTP ₀ (%)
	TP (nm)	PDI	TP (nm)	PDI	
NP-HSA-PEG	228 ± 4	0,18 ± 0,02	252 ± 6	0,17 ± 0,06	10
NP-HSA-B-PEG	229 ± 4	0,17 ± 0,02	247 ± 2	0,310 ± 0,0	7,86

Tabla VII. 4. Resultados de caracterización de las NPs antes y después del marcaje externo con tecnecio-99m.

El % PRQ obtenido para [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-PEG y [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-B-PEG fue de 97 % y 98 %, respectivamente (Figura VII. 2).

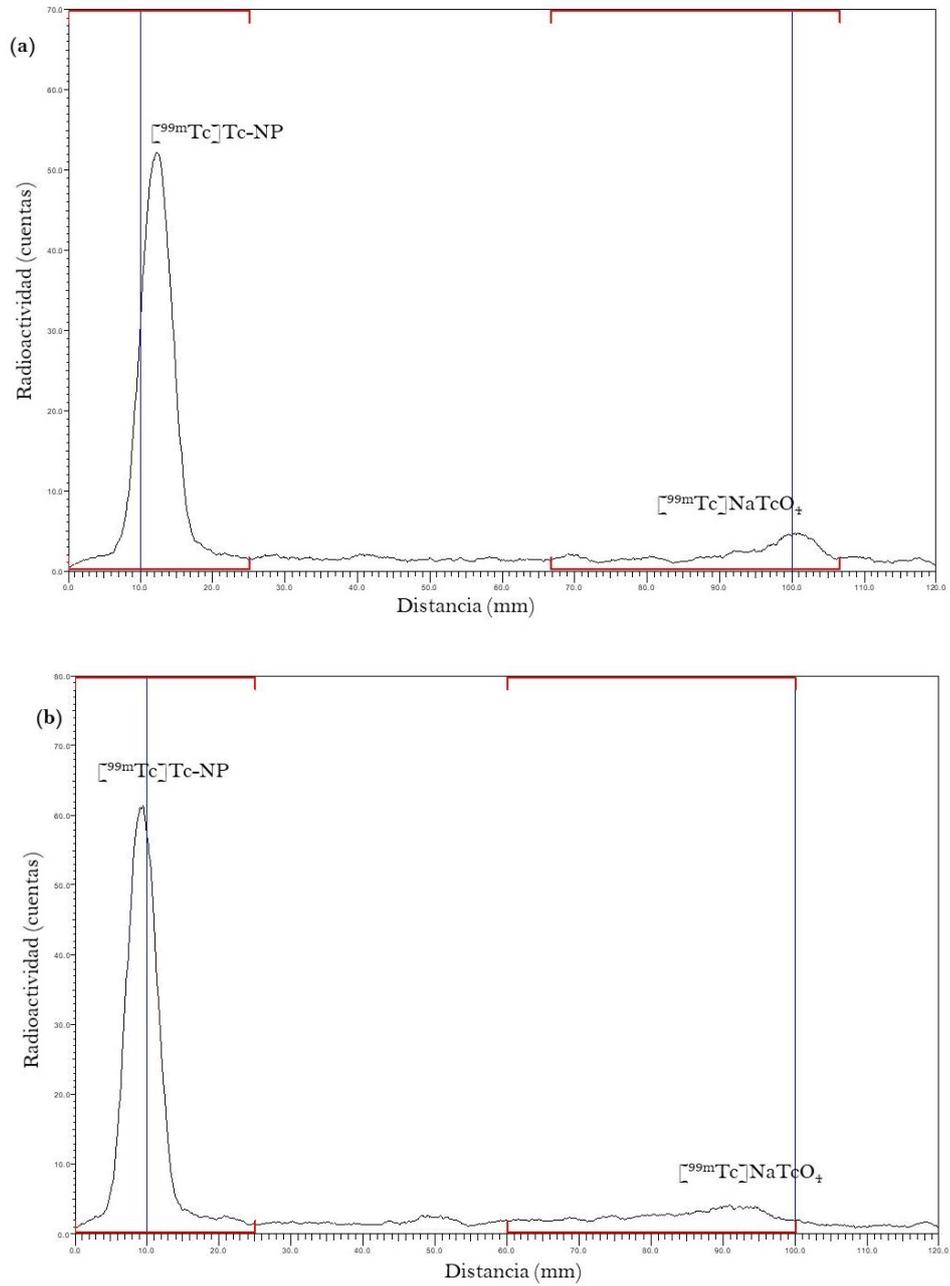


Figura VII. 2. Cromatogramas del radiomarcaje externo de las formulaciones con tecnecio-99m (a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$ y (b) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$.

4.2 Radiomarcaje y encapsulación del bevacizumab

4.2.1 Purificación de excipientes, cuantificación del anticuerpo purificado y análisis de la pureza química.

La cuantificación indicó $[\text{bevacizumab-PE}] = 2.89 \text{ mg/ml}$. Los resultados de SEC-HPLC (Figura VII. 3) indicaron R_t similares entre el Avastin® y el bevacizumab-PE (5.347 min vs 5.772 min).

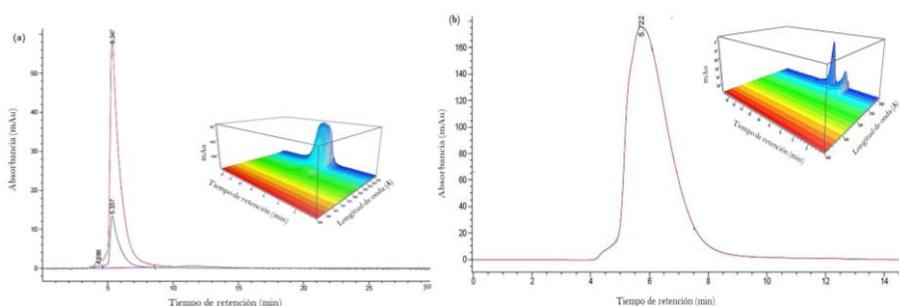


Figura VII. 3. Caracterización del anticuerpo antes y después de su purificación; (a) Avastin®, $R_t = 5.337$, $\lambda = 250 \text{ nm}$ (curva verde) and $5.347 \lambda = 280 \text{ nm}$; (b) $R_t = 5.722$, $\lambda = 280 \text{ nm}$. Los datos espectrales ($\lambda = 200\text{-}400 \text{ nm}$) muestran diferencias en el patrón de absorbancia, permitiendo identificar más adecuadamente el pico del mAb en ausencia de excipientes.

4.2.2 Preparación del precursor y control de calidad.

Los resultados obtenidos del análisis del radiosintón por radiocromatografía planar (Figura VII. 4) y radio-SEC-HPLC (Figura VII. 5), indicaron una correcta preparación del precursor $\text{fac-}[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ con un valor de % PRQ = 93-95.

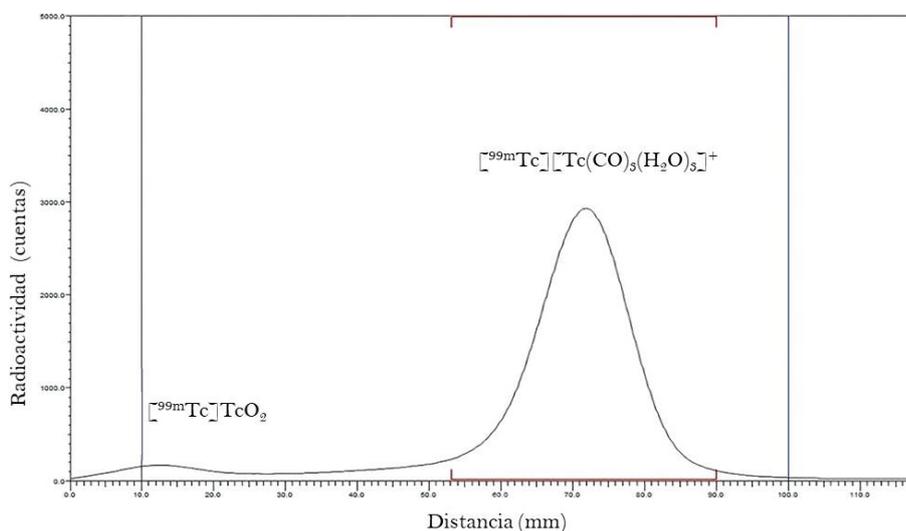


Figura VII. 4. Evaluación del % PRQ por radio-TLC del sintón $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_5]^+$; $R_f= 0$ corresponde a impurezas radiocoloidales; $R_f= 0,7$ corresponde al precursor.

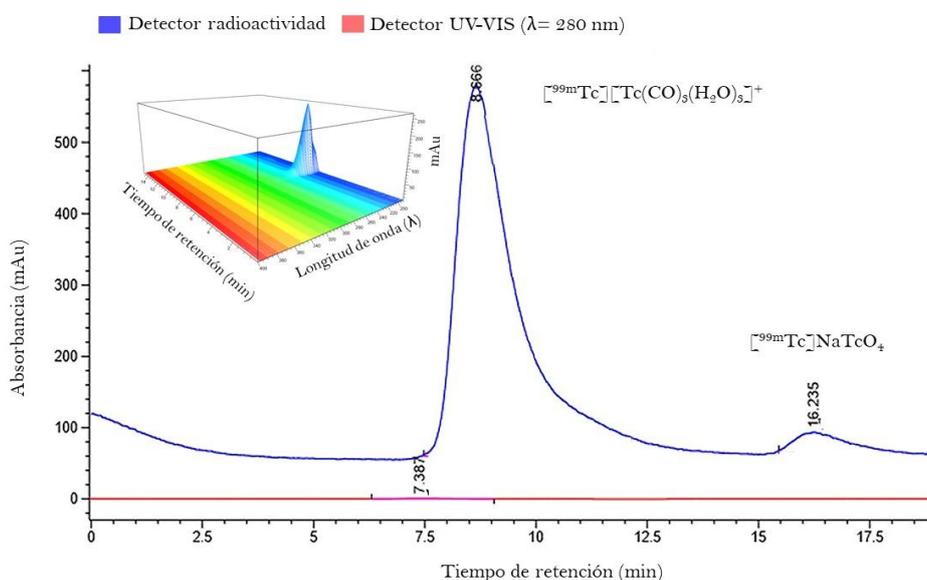


Figura VII. 5. Evaluación del % PR y el % PRQ por radio-SEC-HPCL; $R_t= 7.387$ min (línea roja, UV detector $\lambda = 280$ nm) y 8.666 min (línea azul, NaI (Tl), detector de radioactividad) corresponden al precursor; $R_t = 16.235$ min corresponde a $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$.

4.2.3 Radiomarcaje del bevacizumab y control de calidad

El $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Bevacizumab}$ se obtuvo con un % PRQ = 72, que tras la purificación se elevó hasta alcanzar un 96 % (Figura VII. 6). Estos resultados quedaron confirmados por el análisis realizado por radio-SEC-HPLC (Figura VII. 7).

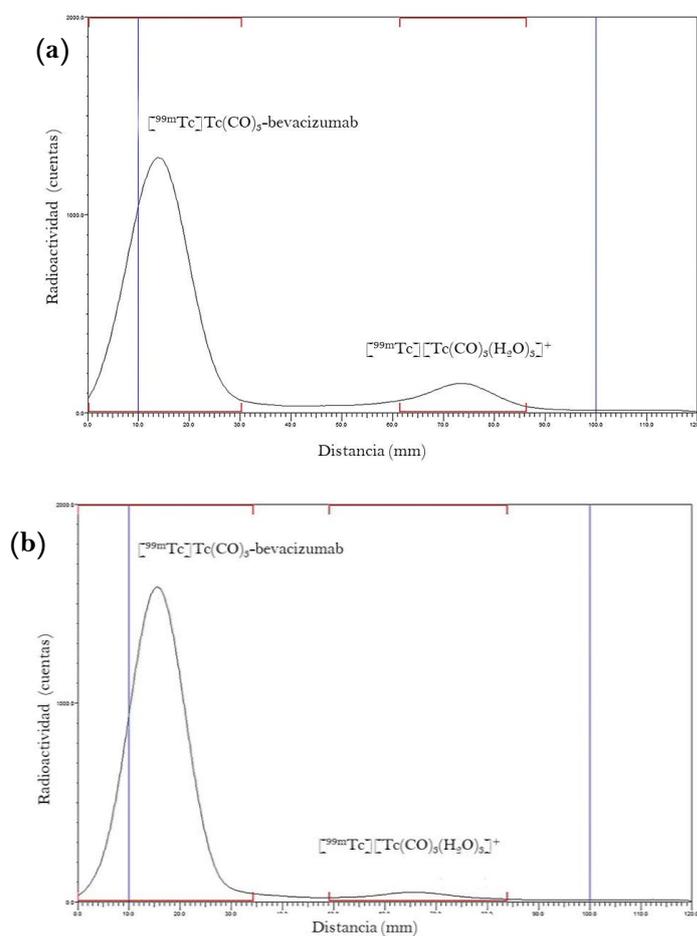


Figura VII. 6. Resultados del % PRQ del anticuerpo radiomarcado (a) antes y (b) después de su purificación, obtenida por radiocromatografía planar.

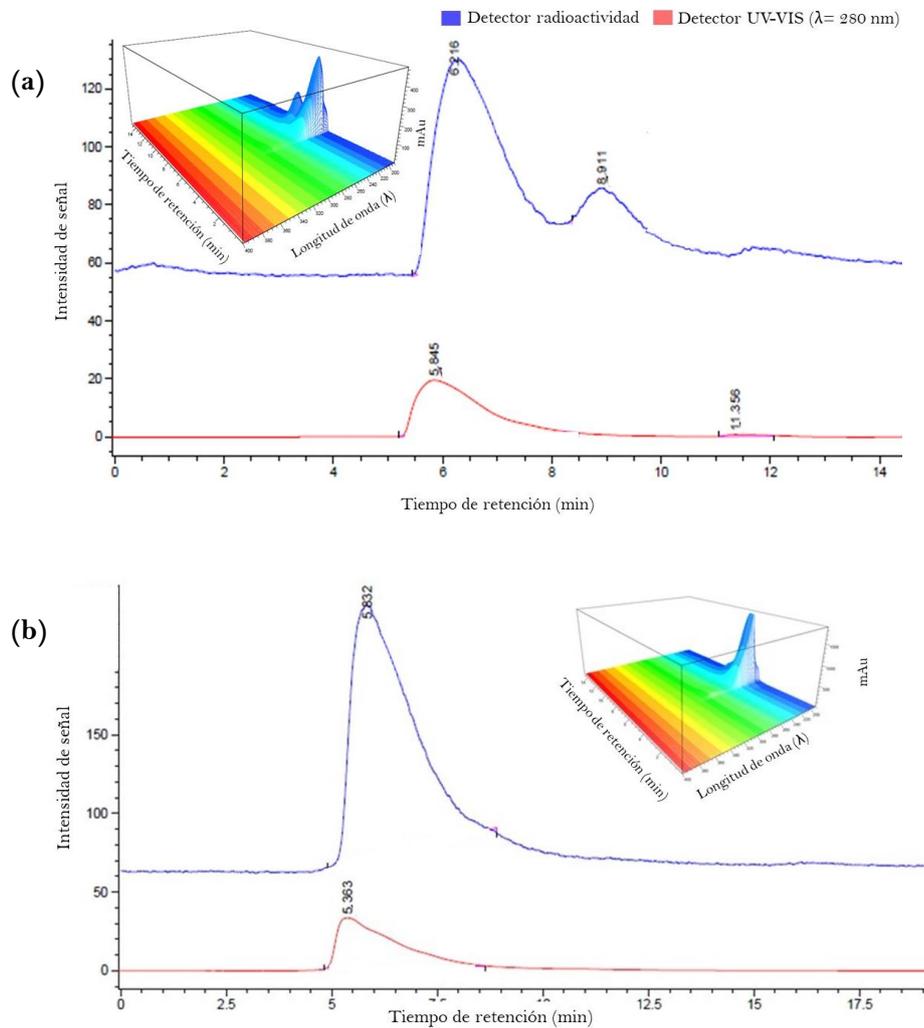


Figura VII. 7. Resultados del % PRQ del anticuerpo radiomarcado (a) antes y (b) después de su purificación, obtenida por radio-SEC-HPLC.

4.2.4 Encapsulación del anticuerpo radiomarcado

Los resultados de caracterización de la formulación NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$ indicaron un $R_f = 0.01$ y un % PRQ = 97,5. Por otro lado, los valores de TP (227.5 ± 0.3 nm vs 228.9 ± 3.9 nm) y de PDI ($0.286 \pm$

0.002 vs 0.170 ± 0.019) fueron similares a los obtenidos para la formulación NP-HSA-B-PEG

4.3 Estudios de biodistribución

La Figura VII. 8 muestra de forma representativa las imágenes SPECT/CT obtenidas a 1, 4, 10 y 24 horas después de la administración i.v. de las suspensiones de NPs radiomarcadas. La Figura VII. 9 muestra las imágenes de los controles de ^{99m}Tc - $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Bevacizumab}]$ y ^{99m}Tc - $[\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$ a los mismos tiempos.

A la derecha de las imágenes estáticas de cada grupo se expone de forma gráfica el promedio del % $R_{\text{órgano}}$ de cada uno de los órganos seleccionados (hígado, pulmones, riñones, estómago, intestino, tiroides y cerebro) para cada punto temporal.

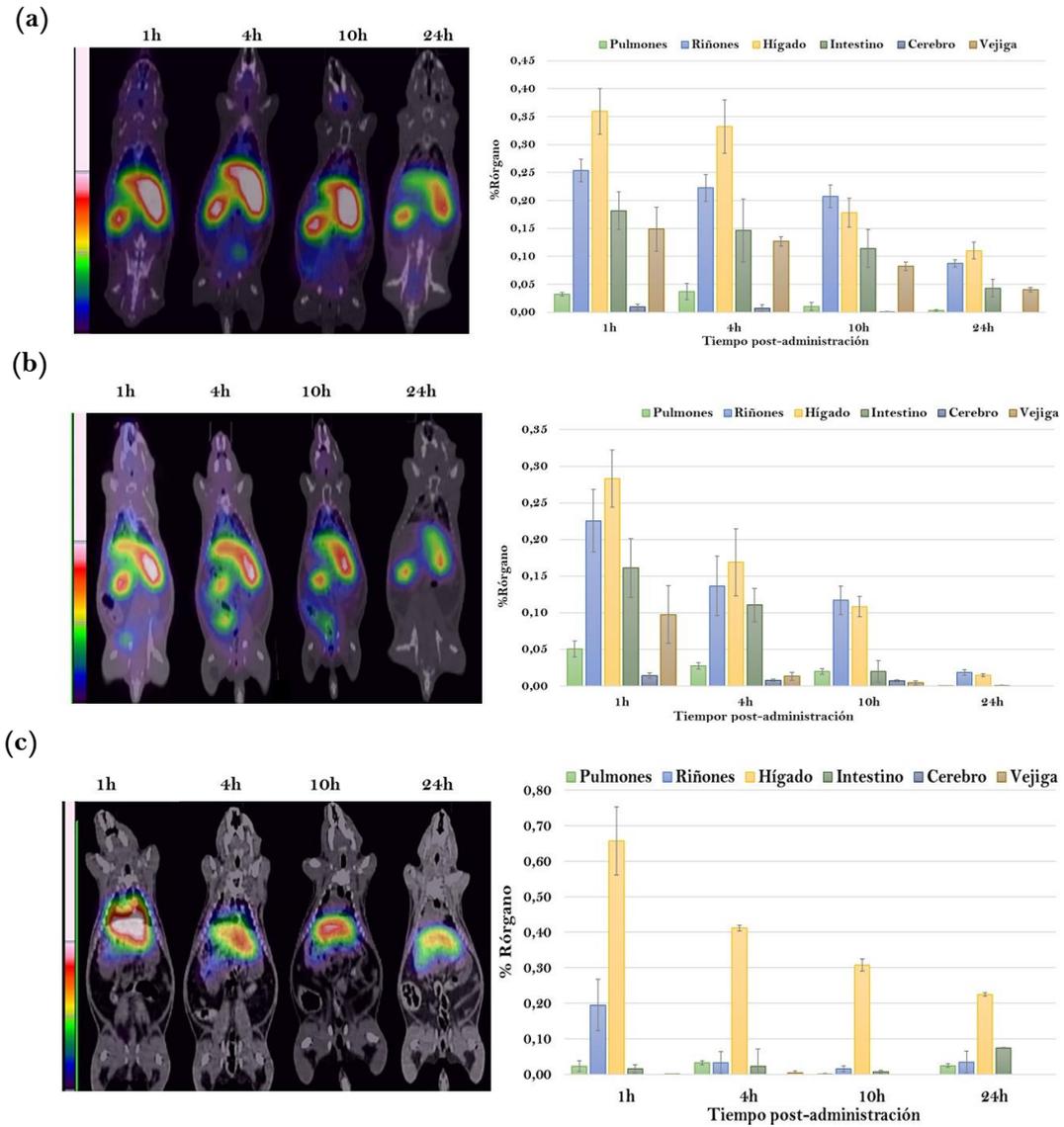


Figura VII. 8. (a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$, (b) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y (c) $\text{NP-HSA-}[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_2\text{-Bevacizumab-PEG}$ Las gráficas muestran el promedio de la cuantificación de los focos de captación de las imágenes SPECT/CT situadas a la izquierda de cada gráfica. Los datos gráficos están expresado en % Órgano, calculado según Ecuación VII. 2

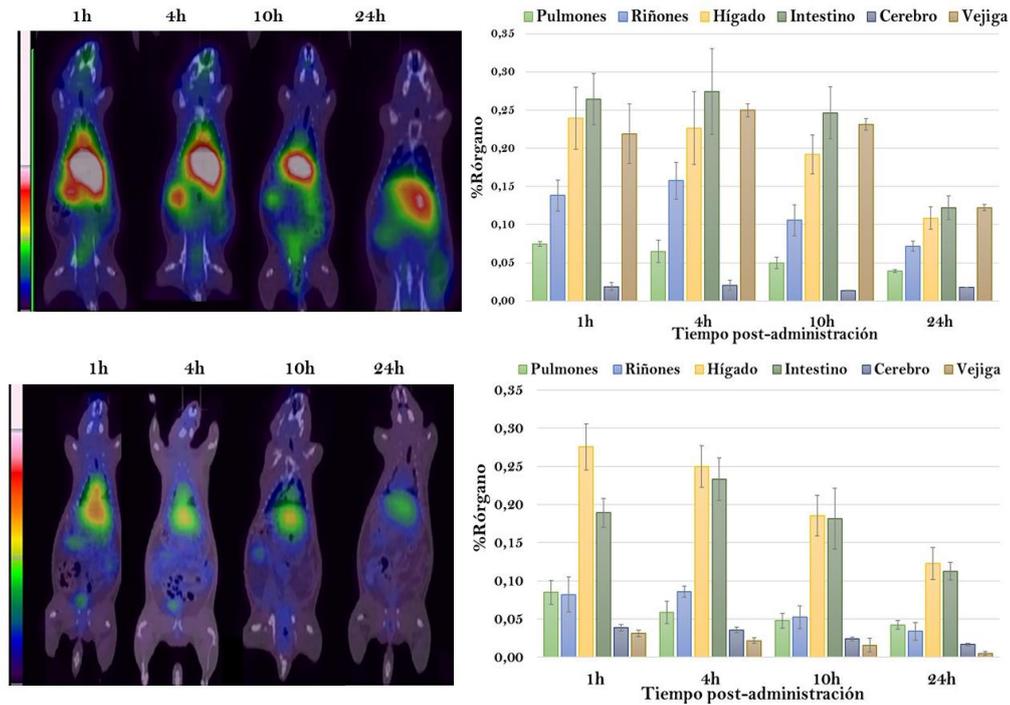


Figura VII. 9. (a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Becavizumab}$ y (b) $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ Las gráficas, al igual que para la Figura VII. 8 muestran el promedio de la cuantificación de los focos de captación de las imágenes SPECT/CT.

Comparando los estudios entre ellos puede estimarse que:

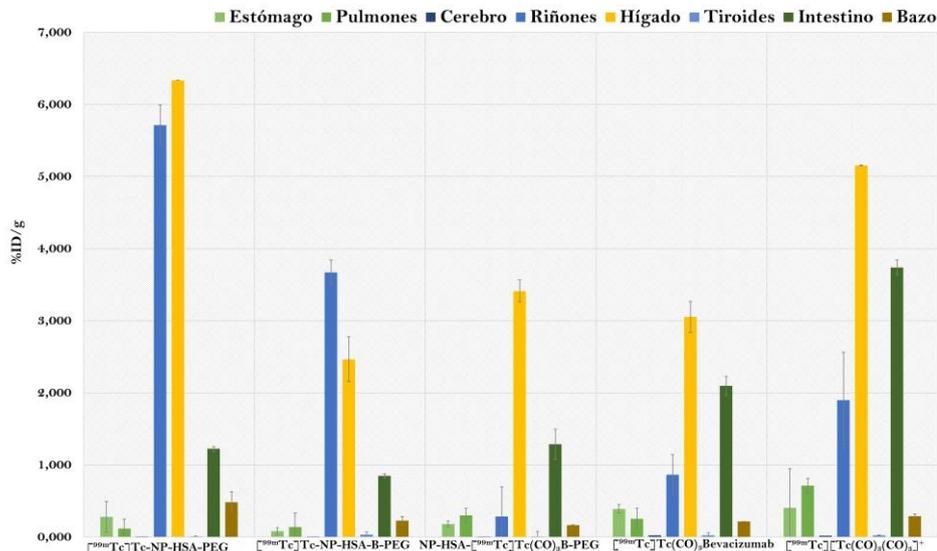
- El perfil de biodistribución de las formulaciones de nanopartícula mostró una menor captación de tejidos no específicos respecto de los controles.
- El análisis cualitativo de las imágenes de todos los grupos realizadas plano a plano, indicó que no hubo captación estomacal, esplénica, ni tiroidea.

- La distribución de las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$ y formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ a lo largo del estudio fue similar. Ambas mostraron una elevada captación hepática y renal; la eliminación de las formulaciones se dio de forma mixta y simultánea a través del sistema hepatobiliar y del sistema renal. No obstante, la velocidad de excreción fue superior en la formulación que contiene bevacizumab, mientras la captación renal de las NPs vacía fue constante durante las 10 primeras horas post-administración ($0,25 \pm 0,02 \%$, $0,22 \pm 0,02 \%$ y $0,21 \pm 0,02 \%$).

La formulación NP-HSA- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$ presentó una acumulación principalmente hepática, con periodo de permanencia superior a la observada en la formulación $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ ($0,66 \pm 0,1 \%$ vs $0,28 \pm 0,04 \%$ a 1 hora post-administración).

- Tras 4 horas post-administración el porcentaje de captación renal del anticuerpo marcado y encapsulado ($0,03 \pm 0,03 \%$) fue similar a los cuantificados a las 24 horas en las formulaciones de NPs marcadas externamente
- Las imágenes de los controles de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Bevacizumab}$ y *fac*- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ indicaron distintas rutas de eliminación, siendo predominante la excreción hepatobiliar para el anticuerpo marcado y la renal para el ion triaquaacarboniltecnecio (I).

Todos estos resultados quedaron confirmados por los estudios *ex vivo* (Gráfica VII. 1) La baja captación en estómago y en tiroides, de todos los compuestos, indicó la una elevada estabilidad radioquímica *in vivo*, incluso del compuesto *fac*- $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ como más adelante se expone en el apartado de Discusión.



Gráfica VII. 1. Estudios *ex vivo* a 24 horas post-administración. Los datos se expresan como el promedio del porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido ($n=3/5$).

El análisis estadístico indicó que para las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ la captación renal e intestinal fue significativamente superior ($p < 0.05$) en comparación con la formulación $\text{NP-HSA-}[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$. Por otro lado, la actividad de los compuestos control asociada a órganos no específicos, como el cerebro, mostró diferencias significativas respecto a las formulaciones de NPs.

5. DISCUSIÓN

Numerosas publicaciones describen las propiedades poliméricas de las nanopartículas como vehículos de liberación sostenida [17–19]. Sin embargo, poco se conoce sobre el comportamiento *in vivo* de los nanosistemas, valorados en este estudio, una vez se han administrado. Con el objetivo de entender mejor que sucede con las formulaciones de nanopartículas de HSA cargadas con bevacizumab, en este capítulo se ha realizado un estudio de biodistribución comparativo entre el vehículo de NPs cargadas con bevacizumab (mediante radiomarcaje de su cubierta) y la carga (mediante preparación de [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-mAb y posterior encapsulación).

Las formulaciones NP-HSA-PEG y NP-HSA-B-PEG se marcaron de forma directa con tecnecio-99m, utilizando el sistema tipo kit desarrollado previamente para cada formulación en los capítulos IV y V. En base a los resultados obtenidos en el capítulo V tras el radiomarcaje de la formulación NP-HSA-B-PEG (V, 4.2.2), los equipos reactivos en esta ocasión se purgaron con helio sólo durante 5 minutos. Sin embargo, los resultados obtenidos con estas nuevas condiciones de preparación, muestran valores semejantes de VTP₀ a los obtenidos tras purgar hasta sequedad (7,86 % vs 8 %).

En segundo lugar se radiomarcó el bevacizumab empleando el método desarrollado por Alberto et al. [20] y optimizado en capítulo VI. En el complejo de coordinación que forma el precursor de los carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ el radiometal posee una configuración electrónica d⁶ de bajo espín [21], lo que limita el mecanismo de la reacción a una sustitución de intercambio (I_a o I_d); por esta razón la sustitución está favorecida para grupos funcionales que contienen grupos aminas, tioéteres o tioles [22]; la presencia de dichos grupos en algunos residuos de aminoácidos [23] posibilita que se pueda radiomarcarse con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ casi cualquier biomolécula peptídica. No

obstante, para aplicaciones *in vivo* de este tipo de radiomarcajes es necesario tener en cuenta que:

- I. La esfera de coordinación tras la sustitución debe ser “cerrada”, es decir, preferiblemente todas las moléculas de agua deben ser sustituidas. De este modo el centro radiometálico deja de ser accesible para el medio biológico una vez administrado, lo que permite asegurar que los focos de captación en la imagen SPECT/CT corresponden a la biomolécula de interés [24].

- II. De los ligandos que pueden reaccionar con el sintón aquellas bases de Lewis más fuerte estabilizarán más el centro radiometálico. El grupo imidazol presente en la histidina (N-donador) es un ejemplo de ello; su amina aromática estabiliza cinéticamente el carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$, lo que permite que interaccione menos con las proteínas plasmáticas [25]. El bevacizumab cuenta con 28 histidinas, siendo las más accesibles la que se localizan entre los residuos 214 y el 453 de las cadenas pesadas.

Los datos obtenidos tras incubar en plasma el $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ (VI, 4.1.3) mostraron una baja transquelación tras 24 horas, lo que puede sugerir que la esfera de coordinación cerrada. Esta hipótesis queda respaldada al comparar los resultados de la biodistribución *ex vivo* obtenidos en este capítulo con los de Schibli et al. [26].

La nanoencapsulación de anticuerpos monoclonales puede beneficiar su acción terapéutica, no sólo mediante su liberación sostenida, sino también facilitando un vehículo adecuado que permita que la liberación pueda hacerse en dianas intracelulares [27,28], o limitando los efectos adversos asociados sin que esto suponga una pérdida de la eficacia terapéutica [29,30].

Niveles elevados de bevacizumab en sangre pueden inducir proteinuria,

hipertensión, epistaxis, tromboembolismo, perforación gastrointestinal o hemorragia [31,32]. Sin embargo, como cualquier otro fármaco nanoencapsulado, este mAb debe seguir siendo efectivo frente al VEGF tras su incorporación a un nanosistema. Luis de Redín et al. demostró [33] que el bevacizumab presenta una elevada inmunoreactividad tras encapsularlo en una matriz de HSA-PEG y que sigue siendo efectivo frente a procesos de angiogénesis en diferentes modelos tumorales [34,35]. Sin embargo, el objetivo de este capítulo no es valorar la eficacia del nanosistema, sino conocer el destino tras su administración de las diferentes partes que lo componen, como ya se definió anteriormente.

Los resultados obtenidos indican que existe una disminución de la eliminación del anticuerpo radiomarcado tras su encapsulación; este hecho se observa en el análisis cualitativo y cuantitativo de las imágenes; el % $R_{\text{órgano}}$ del hígado del compuesto [^{99m}Tc][$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab presenta un valor similar a 1 hora post-administración que la formulación NP-HSA-[^{99m}Tc][$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -B-PEG a las 24 horas.

Al comparar los patrones de distribución de las formulaciones [^{99m}Tc] Tc -NP-B-PEG y NP-HSA-[^{99m}Tc][$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -B-PEG se pueden observar diferencias entre ellas, aun siendo el mismo nanosistema. La captación hepática en ambas era previsible por el tamaño de la NPs, aunque es superior en la formulación que contiene el anticuerpo radiomarcado. Este hecho puede estar relacionado con la elevada expresión en los hepatocitos del receptor neonatal para el Fc (FcRn), también conocido como receptor de Brambell (FcRB) [36]. El FcRn es responsable de proteger a la albúmina y las IgG al catabolismo y de retornarlas a la circulación [37], de este modo el metabolismo de estas macromoléculas es más eficiente y minimiza su síntesis [38]. Sin embargo, a diferencia del bevacizumab, con el que el receptor neonatal de rata (rFcRB) presenta una fuerte unión, el HSA presenta una afinidad pobre [39]. Este hecho

puede explicar porque se observa una eliminación más rápida del nanosistema cuando se radiomarca externamente. Una NP intacta no puede excretarse, por lo primero debe metabolizarse para que pueda eliminarse. Por tanto, la excreción de la formulación [^{99m}Tc]Tc-NP-B-PEG se puede correlacionar con la eliminación de la albúmina, que al no poder ser reciclada por el rFcRB se deshecha. Este hecho también es observable en los estudios de biodistribución del control [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-PEG; el perfil de distribución y la tasa de eliminación de esta formulación es similar a las de las NPs cargadas con bevacizumab.

Por otro lado, la elevada afinidad de las IgG por este receptor (llegando a ser hasta 10 veces superior a la que presentan con el FcRn [40]), puede explicar porque el [^{99m}Tc][Tc(CO) $_3$ -bevacizumab pudo permanecer en circulación durante más tiempo.

El tecnecio-99m se redujo a un estado de oxidación menor para los radiomarcajes, ya que el [^{99m}Tc]TcO $_4^-$, obtenido del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, es químicamente inerte [41]. El estado de oxidación tras la reducción depende del agente reductor utilizado; el SnCl $_2$, empleado para el marcaje externo de las NPs, generalmente permite obtener Tc (V) o Tc (III), mientras que el NaBH $_4$, del kit de IsoLinkTM reduce hasta Tc (I). El tecnecio reducido es “capturado” por un ligando, que estabiliza el nuevo estado de oxidación. Si el complejo ligando-radiometal está unido mediante enlaces débiles, el tecnecio tiende a reoxidarse al estado Tc(VII), cuyo compuesto termodinámicamente más estable es [^{99m}Tc]NaTcO $_4$ [42]. Cuando el [^{99m}Tc]NaTcO $_4$ se administra de forma intravenosa, penetra en los tejidos mediante bombeo iónico [43] utilizando los transportadores NIS [44,45]. Su captación fisiológica se produce en tiroides, estómago y glándulas salivales [46]. Basándonos en la baja captación estomacal y tiroidea obtenida en los estudios de biodistribución, se puede afirmar que todos los compuestos radiomarcados son radioquímicamente estables *in vivo*.

Como el tecnecio-99m tiene un periodo de 6h y el bevacizumab un tiempo de circulación mayor ($t_{1/2} = 18-20$ días [47]), los estudios de biodistribución están limitados a una ventana de observación de 24h. Para complementar estos resultados y conocer el destino final de las dos partes del nanosistema sería útil realizar este estudio con un isótopo de vida media más larga.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.M. Irache, Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas, *An. Sist. Sanit. Navar.* 31 (2008) 7–10. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272008000100001>.
- [2] B. Sarmiento, Have nanomedicines progressed as much as we'd hoped for in drug discovery and development?, *Expert Opin. Drug Discov.* 14 (2019) 723–725. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1621286>.
- [3] S.-D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- [4] Z. Niu, E. Samaridou, E. Jaumain, J. Coëne, G. Ullio, N. Shrestha, J. Garcia, M. Durán-Lobato, S. Tovar, M.J. Santander-Ortega, M.V. Lozano, M.M. Arroyo-Jimenez, R. Ramos-Membrive, I. Peñuelas, A. Mabondzo, V. Préat, M. Teixidó, E. Giralt, M.J. Alonso, PEG-PGA enveloped octaarginine-peptide nanocomplexes: An oral peptide delivery strategy, *J. Control. Release.* 276 (2018) 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.004>.
- [5] A. de Barros, A. Tsourkas, B. Saboury, V. Cardoso, A. Alavi, Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique, *EJNMMI Res.* 2 (2012) 39. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-39>.
- [6] H. Choi, Y.-S. Lee, D.W. Hwang, D.S. Lee, Translational radionanomedicine: a clinical perspective, *Eur. J. Nanomedicine.* 8 (2016) 71–84. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0052>.
- [7] P.P. Di Mauro, V. Gómez-Vallejo, Z. Baz Maldonado, J. Llop Roig, S. Borrós, Novel ¹⁸F Labeling Strategy for Polyester-Based NPs for *in Vivo* PET-CT Imaging, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 582–592.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00040>.

- [8] T. Lammers, S. Aime, W.E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, Theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 1029–1038. <https://doi.org/10.1021/ar200019c>.
- [9] L. Farzin, S. Sheibani, M.E. Moassesi, M. Shamsipur, An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 107 (2019) 251–285. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36550>.
- [10] Z. Liu, ed., *Biomedical Applications of Functional Micro-/nanoinaging Probes*, in: *Adv. Funct. Micro-/Nanoinaging Probes*, Springer Singapore, Singapore, 2018: p. 339. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4804-3>.
- [11] T. Lammers, F. Kiessling, W.E. Hennink, G. Storm, Nanotheranostics and image-guided drug delivery: Current concepts and future directions, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1899–1912. <https://doi.org/10.1021/mp100228v>.
- [12] A. Polyák, I. Hajdu, M. Bodnár, G. Trencsényi, Z. Pöstényi, V. Haász, G. Jánoki, G.A. Jánoki, L. Balogh, J. Borbély, ^{99m}Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities, *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.049>.
- [13] M.M. Kleiter, D. Yu, L.A. Mohammadian, N. Niehaus, I. Spasojevic, L. Sanders, B.L. Viglianti, P.S. Yarmolenko, M. Hauck, N.A. Petry, T.Z. Wong, M.W. Dewhirst, D.E. Thrall, A tracer dose of technetium-99m-labeled liposomes can estimate the effect of hyperthermia on intratumoral doxil extravasation, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6800–6807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0839>.

- [14] J. Garousi, A. Orlova, F.Y. Frejd, V. Tolmachev, Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 5 (2020) 16. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00094-w>.
- [15] M. Hamoudeh, M.A. Kamleh, R. Diab, H. Fessi, Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1329–1346. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.013>.
- [16] J. Llop, P. Jiang, M. Marradi, V. Gómez-Vallejo, M. Echeverría, S. Yu, M. Puigvila, Z. Baz, B. Szczupak, C. Pérez-Campaña, Z. Mao, C. Gao, S.E. Moya, Visualisation of dual radiolabelled poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle degradation in vivo using energy-discriminant SPECT, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 6293–6300. <https://doi.org/10.1039/C5TB01157D>.
- [17] D.E. Lee, H. Koo, I.C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim, I.C. Kwon, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/c2cs15261d>.
- [18] A. Kamkaew, E.B. Ehlerding, W. Cai, Nanoparticles as Radiopharmaceutical Vectors, in: B.M. Lewis, Jason S.;Windhorst, Albert D. and Zeglis (Ed.), *Radiopharm. Chem.*, 4th ed., Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 181–203. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_10.
- [19] R. Singh, J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>.
- [20] T.A. Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, A.P., Abram, U., Kaden, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of

biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand [8], *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 7987–7988. <https://doi.org/10.1021/ja980745t>.

- [21] R. Waibel, R. Alberto, J. Willuda, R. Finnern, R. Schibli, A. Stichelberger, A. Egli, U. Abram, J.P. Mach, A. Plückthun, P. a Schubiger, Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex., *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 897–901. <https://doi.org/10.1038/12890>.
- [22] R. Alberto, U. Abram, 99mTc: Labeling Chemistry and Labeled Compounds, in: M.E. Cherry, S. R., Sorenson, J. A., Phelps (Ed.), *Handb. Nucl. Chem.*, Springer US, Boston, MA, 2011: pp. 2073–2120. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2_43.
- [23] A. Amann, C. Decristoforo, I. Ott, M. Wenger, D. Bader, R. Alberto, G. Putz, Surfactant protein B labelled with $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ retains biological activity in vitro, *Nucl. Med. Biol.* 28 (2001) 243–250. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(01\)00192-5](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(01)00192-5).
- [24] R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, U. Abram, P.A. Schubiger, Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of 99mTc(I)-tricarbonyl complexes: A hint for the future functionalization of biomolecules, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 345–351. <https://doi.org/10.1021/bc990127h>.
- [25] J. Seifert, S., Ku, Reactivity of technetium (I) thioether carbonyl complexes towards histidine — an EXAFS study in solution, *Inorganica Chim. Acta.* 322 (2001) 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00544-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00544-8).
- [26] P.A. Schibli, R., Schubiger, Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*

- 29 (2002) 1529–1542. <https://doi.org/10.1007/s00259-002-0900-8>.
- [27] D.H. Fermentation, Polyester-Based Nanoparticles for the Encapsulation of Monoclonal Antibodies, in: V. Picanço-Castro, K. Swiech (Eds.), *Recomb. Glycoprotein Prod.*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 109–116. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5>.
- [28] S.J. Shin, J.R. Beech, K.A. Kelly, Targeted nanoparticles in imaging: paving the way for personalized medicine in the battle against cancer, *Integr. Biol.* 5 (2013) 29–42. <https://doi.org/10.1039/c2ib20047c>.
- [29] D.W. Grainger, Controlled-release and local delivery of therapeutic antibodies, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4 (2004) 1029–1044. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.7.1029>.
- [30] S. Kunjachan, J. Ehling, G. Storm, F. Kiessling, T. Lammers, Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects, *Chem. Rev.* 115 (2015) 10907–10937. <https://doi.org/10.1021/cr500314d>.
- [31] S. Taugourdeau-Raymond, F. Rouby, A. Default, M.-J. Jean-Pastor, Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68 (2012) 1103–1107. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1232-7>.
- [32] A.T. Falk, J. Barrière, E. François, P. Follana, Bevacizumab: A dose review, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 94 (2015) 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.012>.
- [33] J.M. Llabot, I. Luis de Redin, M. Agüeros, M.J. Dávila Caballero, C. Boiero, J.M. Irache, D. Allemandi, In vitro characterization of new stabilizing albumin nanoparticles as a potential topical drug delivery system in the treatment of corneal neovascularization (CNV), *J. Drug*

Deliv. Sci. Technol. 52 (2019) 379–385.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.042>.

- [34] I. Luis de Redín, F. Expósito, M. Agüeros, M. Collantes, I. Peñuelas, D. Allemandi, J.M. Llabot, A. Calvo, J.M. Irache, In vivo efficacy of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of colorectal cancer, Drug Deliv. Transl. Res. (2020).
<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00722-7>.
- [35] I. Luis de Redín, C. Boiero, S. Recalde, M. Agüeros, D. Allemandi, J.M. Llabot, A. García-Layana, J.M. Irache, In vivo effect of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of corneal neovascularization, Exp. Eye Res. 185 (2019) 107697.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107697>.
- [36] R.S. Blumberg, T. Koss, C.M. Story, D. Barisani, J. Polischuk, A. Lipin, L. Pablo, R. Green, N.E. Simister, A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes, J. Clin. Invest. 95 (1995) 2397–2402. <https://doi.org/10.1172/JCI117934>.
- [37] K.M.K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H.T. Noordzij, I. Sandlie, J.T. Andersen, Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics, Front. Immunol. 5 (2015) 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00682>.
- [38] P. Telleman, R.P. Junghans, The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2326999/pdf/imm0100-0245.pdf> (accessed June 20, 2018).
- [39] J.T. Andersen, J. Cameron, A. Plumridge, L. Evans, D. Sleep, I. Sandlie, Single-chain Variable Fragment Albumin Fusions Bind the Neonatal Fc

- Receptor (FcRn) in a Species-dependent Manner, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 24277–24285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.463000>.
- [40] Y.N. Abdiche, Y.A. Yeung, J. Chaparro-Riggers, I. Barman, P. Strop, S.M. Chin, A. Pham, G. Bolton, D. McDonough, K. Lindquist, J. Pons, A. Rajpal, The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity, *MAbs.* 7 (2015) 331–343. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008353>.
- [41] H. Spies, H.J. Pietzsch, Stannous chloride in the preparation of ^{99m}Tc pharmaceuticals, in: I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharm. Prep. Qual. Control Nucl. Med.*, 1st ed., 2007: pp. 59–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33990-8_3.
- [42] N. Chemistry, *Handbook of Nuclear Chemistry*, Springer US, Boston, MA, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0720-2>.
- [43] H.A. Ziessman, J.P. O'Malley, J.H. Thrall, *Radiopharmaceuticals*, in: F.H. Fahey (Ed.), *Nucl. Med.*, 4th ed., Elsevier, 2014: pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00001-8>.
- [44] H.A. Ziessman, J.P. O'Malley, J.H. Thrall, *Gastrointestinal System*, in: F.H. Fahey (Ed.), *Nucl. Med. (Fourth Ed.)*, Elsevier, 2014: pp. 288–321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08299-0.00013-4>.
- [45] H. Lee, J.H. Kim, Y. Kang, J.H. Moon, Y. So, W.W. Lee, Quantitative single-photon emission computed tomography/computed tomography for technetium pertechnetate thyroid uptake measurement, *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016) e4170. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004170>.
- [46] P.O. Kiratli, T. Aksoy, M.F. Bozkurt, D. Orhan, Detection of ectopic gastric mucosa using ^{99m}Tc pertechnetate: Review of the literature, *Ann. Nucl. Med.* 23 (2009) 97–105. <https://doi.org/10.1007/s12149->

008-0204-6.

- [47] Roche Pharma AG, annex I summary of product characteristics avastin, (2015).
- [48] S.C. Moore, S. Southehal, M.A. Park, S.J. McQuaid, M.F. Kijewski, S.P. Muller, Improved regional activity quantitation in nuclear medicine using a new approach to correct for tissue partial volume and spillover effects, *IEEE Trans. Med. Imaging.* 31 (2012) 405–416. <https://doi.org/10.1109/TMI.2011.2169981>.

VIII. CONCLUSIONES

En este capítulo se presentan las conclusiones generales de los estudios realizados en cada uno de los capítulos que forman parte de esta tesis doctoral.

1. Los estudios realizados sobre el sistema tipo “kit”, desarrollado para el marcaje directo con tecnecio-99m de distintas formulaciones de nanopartículas de albúmina sérica humana (NP-HSA-PEG, NP-HSA-GLU, NP-HSA-Gantrez, NP-HSA-B, NP-HSA-B-PEG y NP-HSA-B-GLU), permiten concluir que:
 - a. El radiomarcaje de todas ellas se pudo realizar de forma sencilla, reproducible y con elevados porcentajes de pureza radioquímica.
 - b. La cantidad de agente reductor (SnCl_2) más adecuada para el radiomarcaje de todas fue de 2 $\mu\text{g}/\text{kit}$.
 - c. El proceso de preparación y radiomarcaje de los equipos reactivos permitió preservar las características fisicoquímicas de las NPs (% VTP₀ < 10 y PDI < 0,3).
 - d. Los equipos reactivos deben emplearse en el mismo día de su preparación, a fin de evitar una disminución de la pureza radioquímica del radiomarcaje (% PRQ < 95) y/o una variación en las características fisicoquímicas de las NPs (% VTP_n < 10 y PDI < 0,3).

2. De los estudios de biodistribución *in vivo* realizados mediante imagen SPECT/CT, en un modelo animal de rata Wistar sana, tras la aplicación tópica en ojo de distintas formulaciones radiomarcadas ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-GLU}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-Gantrez}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$), se puede concluir que:
 - a. Todas las formulaciones estudiadas permanecieron en el punto de administración durante al menos 10 horas tras su administración.
 - b. La modificación superficial de la formulación cargada con bevacizumab (NP-HSA-B) aumentó el tiempo de residencia de la misma en la superficie ocular. No obstante, de los dos agente empleados para el recubrimiento, el polietilenglicol-35000 mostró un porcentaje de

- permanencia de la suspensión radiomarcada (% PSR) superior al obtenido cuando la formulación se reticuló con glutaraldehído.
- c. El perfil de eliminación de todas las formulaciones radiomarcadas, observado en las imágenes SPECT-CT, fué principalmente gastrointestinal. Dicha eliminación fué comparativamente más lenta en las formulaciones cargadas con bevacizumab.
3. Del desarrollo de las dos estrategias planteadas para el radiomarcaje directo del bevacizumab con tecnecio-99m se puede concluir que ambos métodos son procedimientos sencillos, reproducibles y que permiten radiomarcarse el anticuerpo con una elevada pureza química (% PQ > 95) y radioquímica (% PRQ > 95). Sin embargo, sólo el método que emplea carbonilocomplejos de ^{99m}Tc (I) permite obtener un marcaje estable y con preservación del peso molecular y de la inmunoreactividad del anticuerpo.
 4. La preparación de un nanosistema de HSA cargado con $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab y recubierto con PEG se realizó de forma satisfactoria, con un tamaño de partícula y un valor de PDI similares a los obtenidos para la formulación análoga sin radiomarcarse.
 5. El estudio comparativo de biodistribución *in vivo* de las formulaciones NP-HSA- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab-PEG y $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -NP-HSA-B-PEG mostró diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles de eliminación de las mismas, a pesar de ser el mismo nanosistema. Este hecho refuerza la necesidad de evaluar la plataforma de liberación sostenida y su carga de forma conjunta.

IX. ANEXOS

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

Artículos derivados de esta Tesis:

“In vivo SPECT-CT imaging and characterisation of technetium-99m labelled bevacizumab-loaded human serum albumin pegylated nanoparticles”.

Rocío Ramos Membrive, Álvaro Erhard, Ines Luis de Redin, Gemma Quincoces, María Collantes, Margarita Ecay, Juan Irache, Ivan Penuelas

Artículo aceptado para su publicación en el Journal of Drug Delivery Science and Technology.

Journal Pre-proof

In vivo SPECT-CT imaging and characterization of technetium-99m-labeled bevacizumab-loaded human serum albumin pegylated nanoparticles

Rocío Ramos-Membrive, Álvaro Erhard, Inés Luis de Redín, Gemma Quincoces, María Collantes, Margarita Ecay, Juan Manuel Irache, Iván Peñuelas



PII: S1773-2247(20)30495-0

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101809>

Reference: JDDST 101809

To appear in: *Journal of Drug Delivery Science and Technology*

Received Date: 25 March 2020

Revised Date: 11 May 2020

Accepted Date: 13 May 2020

Please cite this article as: Rocío Ramos-Membrive, Álvaro Erhard, Inés Luis de Redín, Gemma Quincoces, María Collantes, Margarita Ecay, Juan Manuel Irache, Iván Peñuelas, *In vivo* SPECT-CT imaging and characterization of technetium-99m-labeled bevacizumab-loaded human serum albumin pegylated nanoparticles, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101809>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

Comunicaciones orales y posters a Congresos derivados de esta Tesis:

1. R. Ramos-Membrive, I. Luis de Redín, G. Quinconces, B. García García, L. Sancho, J.M. Irache, J. Ángel Richter, I. Peñuelas. **Estudio de biodistribución in vivo de nanopartículas proteicas poliméricas (NPPP) radiomarcadas con ^{99m}Tc en un modelo ortotópico de hepatocarcinoma en ratones nude.** *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2015;34(Supl 1):135
35º Congreso de la Sociedad Española de Medicina Nuclear. 17-19 de junio, Burgos 2015. Premio a comunicación oral de Radiofarmacia
2. R. Ramos-Membrive, A. Brotons, G. Quinconces, L. Inchaurreaga, I. Luis de Redín, V. Morán, B. García-García, J.M.I Irache, I. Peñuelas. **Radiolabeling and SPECT/CT imaging of different polymer-decorated zein nanoparticles for oral administration.** *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry, At: Salzburg, Austria, Volume: 1*
18 th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, Salzburgo, 7-10 de abril Austria, 2016
3. Rocío Ramos Membrive, Álvaro Erhard, Ines Luis de Redin, Gemma Quinconces, María Collantes, Margarita Ecay, Juan Irache, Ivan Penuelas. **Nanopartículas de HSA con bevacizumab radiomarcadas: desarrollo del marcaje del anticuerpo con $^{99m}\text{Tc}[(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]$, construcción de las NP y análisis comparativo de biodistribución in vivo mediante SPECT/CT.** *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2018;37(Supl 1):105
38º Congreso de la Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (SEMNUM). 20-22 junio, Oviedo, 2018.

4. Rocío Ramos Membrive, Álvaro Erhard, Gemma Quincoces, María Collantes, Margarita Ecay, Clara Pinilla, Inés Luis de Redin Juan Irache, Iván Penuelas. [^{99m}Tc]Tc-Bevacizumab: desarrollo de un método de marcaje directo utilizando HDP, DPD y PYP comerciales como ligandos intermedios.

39º Congreso de la Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (SEMNUM). Granada, junio de 2020 (Suspendido por la pandemia).

**X. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS, GRÁFICAS
Y ECUACIONES.**

1. FIGURAS

Capítulo I

<i>Figura I. 1. Representación de un monómero de Ig</i>	32
<i>Figura I. 2. Resumen de la obtención de mAbs mediante la tecnología del hibridoma. Adaptación de la imagen de la referencia [11].</i>	34
<i>Figura I. 3. Representación de la humanización de los mAb y de su potencial inmunogénico.</i>	35
<i>Figura I. 4. Ejemplos de diferentes técnicas de bioimagen en función del tipo de radiación electromagnética que emplean para obtener la imagen.</i>	37
<i>Figura I. 5. Esquema de la imagen molecular con isótopos radioactivos</i>	38
<i>Figura I. 6. (a) imagen funcional (SPECT), (b) imagen anatómica (CT), (c) imagen multimodal (SPECT-CT).</i>	39
<i>Figura I. 7. Resumen de las etapas necesarias para desarrollar un fármaco [43].</i>	40
<i>Figura I. 8. Diagrama de decaimiento del $^{99m}\text{Tc} \rightarrow ^{99}\text{Tc} \rightarrow ^{99}\text{Ru}$. El tiempo de vida media del ^{99}Tc y el tipo de emisión que tienen permite que la intervención de este fenómeno físico durante la adquisición de imagen sea despreciable.</i>	42
<i>Figura I. 9 (a) Esquema de un generador comercial de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. El vial de elución está en depresión, de modo que tras conectarlo al puerto de elución por diferencia de presión provoca que pase la solución salina a través de la columna de alúmina, realizando el intercambio aniónico y permitiendo la obtención del ^{99m}Tc $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$. (b) Principio de producción y elución del isótopo hijo. Imágenes modificada de la referencia [63].</i>	44
<i>Figura I. 10. RF tecnecios comerciales [62] que han empleado SnCl_2 como agente reductor, pero han obtenido un estado de oxidación distinto en función de la naturaleza del ligando, el pH y la temperatura de incubación de la mezcla. El $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HMPAO}$,</i>	

$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-DMSA}$ y el $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIBI}$ tiene un estado de oxidación (V), (III) y (I), respectivamente..... 45

Figura I. 11. Detectores empleados en radiocromatografía para determinar el % PRQ. (a) activímetro: basado en una cámara que contiene un gas que se ioniza por la radiación emitida por el radionucleido; (b) contador gamma; (c) radiocromatógrafo. Ambos emplean cristales de centello como sistema de detección; los átomos que conforman el cristal centellean en presencia de radiaciones ionizantes..... 48

Figura I. 12. Resumen del carácter multifuncional de la NP. Imagen modificada de la referencia [86] 50

Figura I. 13. Diferentes tipos de transporte de NPs. Imagen modificada de la referencia [89]..... 51

Figura I. 14. Tipos de nanopartículas en función de la naturaleza de su matriz. Imagen modificada de la referencia [90]. 52

Figura I. 15. Estrategias de marcaje con isótopos de un nanosistema. (a) marcaje de un material de la matriz, (b) encapsulación de un RF, (c) marcaje de la superficie, (d) marcaje de NP previamente unida a un ligando bifuncional. Imagen modificada de la referencia [110] 55

Capítulo IV

Figura IV. 1 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del monómero de Gantrez ES-425. 92

Figura IV. 2. (a) Estructura química y (b) conformación 3D el monómero de polietilenglicol. El tipo de PEG empleado contiene 35000 repeticiones del monómero polietilenglicol. 93

Figura IV. 3 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del glutaraldehído..... 93

Figura IV. 4 Esquema de la preparación y radiomarcaje de los kits fríos de cada formulación con distintas concentraciones de cloruro de estaño. Sobre el esquema se han numerado las etapas desde la preparación del “kit” hasta su radiomarcaje: 1. Preparación de las soluciones de SnCl₂ a partir de una disolución madre, 2. Mezcla de la formulación con la disolución de agente reductor, 3. Purgado con helio 4. Radiomarcaje de los equipos reactivos con [^{99m}Tc]NaTcO₄.....95

Figura IV. 5. Esquema del control de calidad de los equipos reactivos preparados para cada formulación durante el estudio de optimización de la concentración de SnCl₂. Los pasos de control de calidad se han marcado sobre la imagen con la siguiente nomenclatura: 1. 5 µl de suspensión marcada en la fase estacionaria, 2. Desarrollo de la tira con la fase móvil, 3. Lectura de la tira en el radio-TLC, 4. Interpretación del cromatograma, cálculo del R_f y del % PRQ.....96

Figura IV. 6. Esquema de los grupos de animales empleados en los estudios de imagen SPECT/CT99

Figura IV. 7. Disposición de los animales anestesiados en el equipo SPECT/CT para adquisición de imagen.100

Figura IV. 8. Cromatogramas de [^{99m}Tc]Tc-HSA. (a) [SnCl₂] =0, 05 mg/ml (b) [SnCl₂] =0, 5 mg/ml.....102

Figura IV. 9. Imágenes estáticas de las formulaciones [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-GLU, [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-PEG35000 y [^{99m}Tc]Tc-NP-HSA-Gantrez comparadas con [^{99m}Tc]Tc-HSA y [^{99m}Tc]NaTcO₄ como controles de biodistribución. Las imágenes de cada fila corresponden al mismo animal a lo largo del estudio. El tiempo post-administración está indicada en la parte superior las imágenes. a. Punto de administración: ojo izquierdo; b. Estómago; c. Intestino.....104

Capítulo V

Figura V. 1. Medida del tamaño de partícula antes y después del radiomarcaje del sistema tipo “kit”. Los pasos intermedios hasta el marcate del equipo reactivo se han marcado sobre la imagen con la siguiente nomenclatura: 1. Preparación del “kit” (n=3 por formulación), 2. Purgado hasta sequedad; 3. Radiomarcaje de los equipos reactivos con $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$; 4. Determinación del tamaño de partícula tras 30 minutos de incubación.127

Figura V. 2. Esquema del estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” en un periodo de 3 meses. 1. Preparación del sistema tipo “kit”; 2. Almacenamiento en frío; 3. Radiomarcaje con $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ e incubación durante 30 minutos; 4. Determinación de la calidad del radiomarcaje y la nanopartícula.129

Figura V. 3. Imágenes estáticas SPECT/CT y % Radioactividad de las formulaciones $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-GLU}$. Las imágenes de cada fila corresponden al mismo animal a lo largo del estudio. El tiempo post-administración está indicado en la parte superior las imágenes. Las localizaciones anatómicas de los focos de captación se han marcado con la siguiente nomenclatura: a. Punto de administración: ojo izquierdo; b. Estómago; c. Intestino. Las gráficas dispuestas a la derecha de las imágenes SPECT/CT representan el promedio de la actividad (cuentas) obtenidas en los VOIs dibujados sobre los animales estudiados para cada tipo de NP (n=3). Los resultados están expresados en % Radioactividad; este parámetro se ha calculado dividiendo la actividad cuantificada en el ojo (azul) entre la actividad total cuantificada en ese animal en ese mismo punto temporal. Se ha operado de igual forma para el cálculo del porcentaje en el abdomen (amarillo).138

Capítulo VI

Figura VI. 1. Esquema de la purificación de excipientes del bevacizumab. 1. Preparación de los patrones. 2. Determinación la recta de calibrado a $\lambda = 280 \text{ nm}$ y cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer; 3. Determinación de la ecuación de la recta 4. Purificación de los

excipientes por SEC; 5. Determinación de las fracciones con anticuerpo a $\lambda = 280$ nm. 6. Aplicación de la ecuación de la recta para determinar [Bevacizumab purificado].161

Figura VI. 2. Esquema de la reducción parcial del bevacizumab. 1. Concentración por ultrafiltración por centrifugado; 2. Transvase a Eppendorf y determinación de [bevacizumab]; 3. Adición del 2-Mercaptoetanol; 4. Reacción de reducción de los puentes disulfuro del anticuerpo; 5. Cromatografía de exclusión molecular; 6. Elución del anticuerpo reducido separándolo de las posibles impurezas generadas y el exceso de 2-Mercaptoetanol.....163

Figura VI. 3. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del medronato de sodio (MDP).....164

Figura VI. 4 (a) Estructura química y (b) conformación 3D del ácido pirofosfato de sodio (PYP)164

Figura VI. 5. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del oxidrónico (HDP)...165

Figura VI. 6. (a) Estructura química y (b) conformación 3D del ácido etindrónico (DPD).165

Figura VI. 7. Esquema del radiomarcaje del anticuerpo con carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc(I)}$. A. Preparación del precursor: 1. Radiomarcaje del "kit"; 2. Formación del núcleo de tricarbonilo ($M = ^{99m}\text{Tc}$); 3. Enfriamiento a Ambiente; 4. Ajuste del valor de pH. B. Incubación del bevacizumab-PE y el precursor.167

Figura VI. 8. Desarrollo del gel de poliacrilamida. En el pocillo 1 se cargó el marcador de tamaño; el resto de pocillo se cargaron con muestras para su análisis.171

Figura VI. 9. Cromatogramas de muestras de bevacizumab mediante SEC-HPLC con detector UV ($\lambda = 280$ nm). (a) Muestra de Avastin; (b) Bevacizumab purificado de excipientes; (c) Bevacizumab parcialmente reducido y purificado.175

Figura VI. 10. Evaluación del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab mediado por (a) PYP, (b) HDP y (c) DPD. El $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab: $R_t = 4,8$ minutos (curva de color azul, detector DAD, 280 nm) y 5,3 minutos (curva amarilla, detector de NaI). Impureza de DPD (curva azul) con $R_t = 7,1$ min en el cromatograma..... 176

Figura VI. 11. Evaluación del $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ $R_t = 7,081$ minutos (curva de color azul, detector DAD, 280 nm) y 7,497 minutos (curva amarilla, detector de NaI)..... 178

Figura VI. 12. Cromatograma del $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab (a) antes y (b) después antes de la purificación..... 179

Figura VI. 13. Análisis de la integridad del anticuerpo marcado con ligandos. En la membrana de nitrocelulosa, teñida con azul de Coomassie, pueden observarse las siguientes muestras en los pocillos: (1) el marcador de tamaño, (2) muestra control de Avastin, (3,4) muestra control de bevacizumab parcialmente reducido y purificado, (5, 6) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-DPD, (7, 8) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-HDP y (9, 10) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-PYP..... 183

Figura VI. 14. Determinación de la actividad presente en la membrana. Cromatograma correspondiente al pocillo 7 (muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -bevacizumab-HDP representadas en la Figura VI. 13) pero representativo de lo obtenido para cada uno de los marcajes analizados..... 184

Figura VI. 15. Análisis de la integridad del anticuerpo marcado carbonilocomplejos de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$. En la membrana de nitrocelulosa, teñida con azul de Coomassie, pueden observarse las siguientes muestras en los pocillos: (1) el marcador de tamaño, (2,3,4) muestra control de Avastin, (5, 6, 7) muestra control de bevacizumab purificado, (8, 9 y 10) muestra de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab..... 184

Capítulo VII

Figura VII. 1. Resumen de la experimentación realizada en este capítulo. **1a.** Radiomarcaje directo con tecnecio-99m de la formulación NP-HSA-PEG **1b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* ($n=5$). **2a** preparación de la formulación NP-HSA-B-PEG; **2b.** Radiomarcaje directo con tecnecio-99m de la formulación NP-HSA-B-PEG **2c.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* ($n=5$); **3a.** Radiomarcaje del anticuerpo con el precursor $\text{fac-}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$ **3b.** Encapsulación de anticuerpo radiomarcado (NP-HSA- $^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-B-PEG}$); **3c.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* ($n=5$); **4a.** Preparación del precursor $\text{fac-}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$; **4b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* ($n=3$); **5a.** Radiomarcaje anticuerpo con el precursor $\text{fac-}^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$; **5b.** Estudios de biodistribución *in vivo* y *ex vivo* ($n=3$). Todos los estudios *in vivo* se han realizado mediante imagen SPECT/CT a 1, 4, 10 y 24 horas post-administración; después de la última imagen se sacrificaron los animales; tras la escisión de los órganos seleccionados, se determinó la radiactividad con un contador gamma.213

Figura VII. 2. Cromatogramas del radiomarcaje externo de las formulaciones con tecnecio-99m (a) $^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc-NP-HSA-PEG}$ y (b) $^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$215

Figura VII. 3. Caracterización del anticuerpo antes y después de su purificación; (a) Avastin®; $R_t= 5.337, \lambda=250 \text{ nm}$ (curva verde) and $5.347 \lambda=280\text{nm}$; (b) $R_t= 5.722, \lambda=280 \text{ nm}$. Los datos espectrales ($\lambda= 200\text{-}400 \text{ nm}$) muestran diferencias en el patrón de absorbancia, permitiendo identificar más adecuadamente el pico del mAb en ausencia de excipientes.216

Figura VII. 4. Evaluación del % PRQ por radio-TLC del sintón $^{99\text{m}}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$; $R_f= 0$ corresponde a impurezas radiocoloidales; $R_f= 0,7$ corresponde al precursor.217

Figura VII. 5. Evaluación del % PR y el % PRQ por radio-SEC-HPCL; $R_t= 7.387 \text{ min}$ (línea roja, UV detector $\lambda = 280 \text{ nm}$) y 8.666 min (línea azul, NaI (Tl), detector de

radioactividad) corresponden al precursor; $R_t = 16.235$ min corresponde a $[^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$.
217

Figura VII. 6. Resultados del % PRQ del anticuerpo radiomarcado (a) antes y (b) después de su purificación, obtenida por radiocromatografía planar.218

Figura VII. 7. Resultados del % PRQ del anticuerpo radiomarcado (a) antes y (b) después de su purificación, obtenida por radio-SEC-HPLC.....219

Figura VII. 8. (a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-PEG}$, (b) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-NP-HSA-B-PEG}$ y (c) $\text{NP-HSA}-[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Bevacizumab-PEG}$ Las gráficas muestran el promedio de la cuantificación de los focos de captación de las imágenes SPECT/CT situadas a la izquierda de cada gráfica. Los datos gráficos están expresado en % Órgano, calculado según Ecuación VII. 2.....221

Figura VII. 9. (a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Becavizumab}$ y (b) $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ Las gráficas, al igual que para la Figura VII. 8 muestran el promedio de la cuantificación de los focos de captación de las imágenes SPECT/CT.222

2. TABLAS

Capítulo I

Tabla I. 1. Características y funciones de las inmunoglobulinas. Información obtenida del artículo de Schroeder y Cavacini [4].33

Capítulo IV

Tabla IV. 1. Factor de retardo y pureza radioquímica exigida en el marcaje de las distintas formulaciones de nanopartículas96

Tabla IV. 2. Resultados caracterización físico-química de las nanopartículas.....100

Tabla IV. 3. Resultados de la pureza radioquímica de los distintos equipos reactivos elaborados en el estudio de optimización de la especie reductora para el desarrollo de un sistema tipo “kit”.....101

Capítulo V

Tabla V. 1. Parámetros empleados en la estabilización de la formulación NP-HSA-B.....125

Tabla V. 2. Parámetros de evaluación fijados para el ensayo de determinación de la estabilidad del sistema tipo “kit”.....130

Tabla V. 3. Resultados del tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de las nanopartículas de cada formulación estudiada.....132

Tabla V. 4. Resultados de la pureza radioquímica de los distintos equipos reactivos elaborados en el estudio de optimización de la especie reductora para el desarrollo de un sistema tipo “kit”.....133

Tabla V. 5. Tamaños de partícula de las tres formulaciones antes y después de la preparación de los equipos reactivos.....134

Tabla V. 6. %PRQ y Rf de los equipos reactivos, según el tipo de formulación empleada, el día de la preparación (día 0) de los kits para el estudio de estabilidad.....135

Tabla V. 7. Variación del tamaño de partícula a lo largo del estudio de caducidad del sistema tipo “kit”.....137

Capítulo VI

Tabla VI. 1. Parámetros empleados para el marcaje indirecto de bevacizumab empleando equipos reactivos comerciales como ligandos de transferencia.....166

Tabla VI. 2. Cantidad de bevacizumab cuantificada aplicando la ley de Lamber-Beer sobre las fracciones con mayor absorbancia y porcentaje de recuperación de la columna de exclusión molecular.....174

Tabla VI. 3. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis del bevacizumab mediante SEC-HPLC.....175

Tabla VI. 4. Resultados de pureza química y radioquímica de las distintas muestras analizadas por SEC-HPLC.....177

Tabla VI. 5. Resultados obtenidos después de incubar muestras de los radiomarcaje a temperatura ambiente y refrigerado.....180

Tabla VI. 6. Porcentaje de bevacizumab activo (% BA) tras someterlo al proceso de radiomarcaje. Expresado como el promedio \pm SD (n=3).....185

3. ECUACIONES

Capítulo V

Ecuación V. 1. Variación del tamaño de partícula de las NPs analizadas asociada al proceso de preparación y radiomarcaje de los equipos reactivos.128

Ecuación V. 2. Variación del tamaño de partícula asociada al proceso de almacenamiento de los equipos reactivos. El cálculo se realiza el tamaño de partícula promedio.....130

Ecuación V. 3. Calculo del %Radioactividad en ojo o abdomen. Actividad cuantificada en cada VOI dibujado (sobre ojo o abdomen) a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada en ese mismo animal (VOI cuerpo completo) en el mismo punto temporal. .131

Ecuación V. 4. Calculo del porcentaje de permanencia de la suspensión radiomarcada. Actividad cuantificada en cada VOI dibujado sobre ojo izquierdo a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada 1 hora después de la administración sobre el ojo izquierdo.....132

Capítulo VI

Ecuación VI. 1. Cálculo del % de PRQ del bevacizumab radiomarcado en el estudio de estabilidad.....170

Ecuación VI. 2. Determinación de bevacizumab activo tras su radiomarcaje con tecnecio-99m.....172

Capítulo VII

Ecuación VII. 1. Cálculo de la concentración de bevacizumab purificado de excipientes. Concentración calculada se expresa en mg/ml.....207

Ecuación VII. 2. Cálculo del %Radioactividad en cada órgano mencionado. Actividad cuantificada mediante dibujo de VOIs sobre cada órgano de interés respecto a la actividad cuantificada en ese mismo animal (VOI cuerpo completo) a 1 hora post-administración.211

Ecuación VII. 3. Determinación del porcentaje de dosis acumulada en un órgano. Actividad del órgano cuantificada en el contador gamma y corregida por decaimiento a la hora de administración de la dosis.....212

Capítulo VI

Tabla VII. 1. R_f y PRQ exigida en el marcaje de las distintas especies analizadas.....208

Tabla VII. 2. Criterios para evaluar la pureza de fac-[^{99m}Tc][Tc(OH)₂]₃(CO)₃]⁺.....208

Tabla VII. 3. Criterios para evaluar la pureza de [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-bevacizumab.

** R_f para cromatografía planar y R_t para radio-SEC-HPLC.....209*

Tabla VII. 4. Resultados de caracterización de las NPs antes y después del marcaje externo con tecnecio-99m.214

4. GRÁFICAS

Capítulo V

- Gráfica V. 1. Resultados de la del estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” (n=3). .136*
- Gráfica V. 2 . Evolución del tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad del sistema tipo “kit” según el tipo de nanopartícula.137*
- Gráfica V. 3. Permanencia de la suspensión radiomarcada (% PSR); se representa el promedio de la actividad cuantificada en ojo izquierdo a lo largo del estudio respecto a la actividad cuantificada en el mismo animal 1 hora tras la administración de la suspensión de nanopartícula radiomarcada correspondiente.140*

Capítulo VI

- Gráfica VI. 1. Recta patrón de Avastin en PBS para determinar el coeficiente de absortividad molar.173*
- Gráfica VI. 2. Perfil de elución del bevacizumab al purificar su solución comercial Avastin® de excipientes. Los primeros 0,5 ml correspondieron al volumen eluido tras la aplicación de la muestra.174*
- Gráfica VI. 3. Ensayo de estabilidad del [^{99m}Tc]Tc-bevacizumab tras incubarlo en un medio competitivo. a 37 °C.181*
- Gráfica VI. 4. Estabilidad de [^{99m}Tc]Tc-bevacizumab tras incubación en plasma.182*
- Gráfica VI. 5. Curva patrón del ensayo ELISA para cuantificación del anticuerpo activo tras el radiomarcaje.185*

Capítulo VII

- Gráfica VII. 1. Estudios ex vivo a 24 horas post-administración. Los datos se expresan como el promedio del porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (n=3/5).224*