



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Doctorado en Ciencias Químicas

**Síntesis y evaluación de nanosistemas de liberación controlada basados endendrimeros dirigidos al receptor de quimiocina-4**

Protocolo de investigación Presenta:

**M. en C. y T. F. Rosa Maydelid Trujillo Nolasco**

Dirigido por:

D. en C.Q. Enrique Morales Avila (UAEMéx)

Dra. en C. Blanca Eli Ocampo García (ININ)

Dra. en C. Guillermina Ferro Flores (ININ)

Toluca, Estado de México, 2021



Este trabajo se realizó de manera conjunta entre la Universidad Autónoma del Estado de México y el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), en el Departamento de Materiales Radiactivos, bajo la asesoría del Dr. en C. Q. Enrique Morales Avila, Dra. en C. Blanca E. Ocampo García y la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores.

El presente trabajo contó con el financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB-A1S38087) y de la Agencia Internacional de Energía Atómica (CRP-F2264).

INDÍCE

<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	9
<b>1.1. DENDRÍMEROS</b> .....	9
<b>1.2. C19</b> .....	10
<b>1.3. KRAS</b> .....	11
<b>1.4. Radiación</b> .....	13
<b>1.5. CXCL12</b> .....	18
<b>1.6. CXCR4</b> .....	18
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	21
<b>3.1. Conjugación de DOTA-DN</b> .....	21
<b>3.2. Activación de grupos carboxilo en CXCR4L</b> .....	21
<b>3.3. Conjugación de CXCR4L a los grupos de amina del DOTA-DN (DOTA-DN-CXCR4L)</b> ....	21
<b>3.4. Preparación de DOTA-DN(C19) y DOTA-DN(C19)-CXCR4L</b> .....	22
<b>3.5. Preparación de <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L, <sup>177</sup>Lu-DN (C19) y <sup>177</sup>Lu-DN-CXCR4L</b> .....	22
<b>3.6. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta (Z)</b> .....	23
<b>3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b> .....	24
<b>3.8. Espectroscopía FT-IR</b> .....	24
<b>3.9. Espectroscopía UV-Vis</b> .....	24
<b>3.10. Eficiencia de atrapamiento</b> .....	24
<b>3.11. Perfil de liberación in vitro de C19</b> .....	25
<b>3.12. Pureza radioquímica</b> .....	25
<b>3.13. Estabilidad en suero</b> .....	25
<b>3.14. Captación e internalización celular</b> .....	26
<b>3.15. Viabilidad celular</b> .....	26
<b>3.16. <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L Dosimetría celular</b> .....	27
<b>3.17. Ensayo clonogénico</b> .....	28
<b>3.18. Apoptosis</b> .....	28
<b>3.19. Análisis estadístico</b> .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1. Tamaño de partícula</b> .....	30
<b>4.2. Caracterización por HPLC/UV-Vis</b> .....	35

4.3. Eficiencia de encapsulación .....	36
4.4. Perfil de liberación .....	37
4.5. Estabilidad en suero y pureza radioquímica.....	38
4.6. Captación e internalización celular .....	39
4.7. Viabilidad celular .....	40
4.8. Dosimetría celular <sup>177</sup> Lu-DN(C19)-CXCR4L .....	42
4.9. Ensayo clonogénico .....	43
4.10. Apoptosis.....	45
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIÓN.....	50

## INDÍCE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL DENDRÍMERO DE PAMAM GENERACIÓN 4.0.....	10
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE C19. ....	10
FIGURA 4. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE RAS.....	12
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA ENERGÍA DE RETROCESO DE PARTÍCULAS ALFA. ....	16
FIGURA 6. COMPLEJO DE COORDINACIÓN ENTRE EL AGENTE QUELANTE DOTA Y LU-177.....	17
FIGURA 7. ESQUEMA DE DECAÍMIENTO DEL LU-177.....	18
FIGURA 8. ESQUEMA DE LA SÍNTESIS DE PREPARACIÓN DE A) DOTA-DN, B) DOTA-DN-CXCR4L, C) DOTA-DN(C19)-CXCR4L Y D) <sup>177</sup> LU-DN(C19)-CXCR4L.....	23
FIGURA 9. MICROGRAFÍAS REPRESENTATIVAS OBTENIDAS POR TEM DE LOS SISTEMAS DOTA-DN-CXCR4L Y DOTA-DN(C19)-CXCR4L.....	31
FIGURA 10. ESPECTROS FT-IR DE A) PAMAM G 4.0 (DN), B) P-SCN-BN-DOTA (DOTA), C) CXCR4L, D) C19, E) DOTA-DN, F) DOTA-DN-CXCR4L Y G) DOTA-DN(C19)-CXCR4L.....	34
FIGURA 11. CROMATOGRAMAS HPLC DE A) DOTA, B) DOTA-DN, C) DOTA-DN-CXCR4L, E) C19 Y F) DOTA-DN(C19)-CXCR4L; Y ESPECTROS UV-VIS G) MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DEL DN CON DOTA (DOTA-DN), H) CONJUGACIÓN DE CXCR4L A DOTA-DN (DOTA-DN-CXCR4L) Y I) DOTA-DN(C19)-CXCR4L.....	36
FIGURA 12. PERFIL DE LIBERACIÓN IN VITRO DE DOTA-DN(C19)-CXCR4L A PH 5.3 (MICROAMBIENTE TUMORAL) Y PH 7.4 (CONDICIONES FISIOLÓGICAS).....	38
FIGURA 13. RADIOCROMATOGRAMAS HPLC DE <sup>177</sup> LU-DN(C19)-CXCR4L A) DÍA 1 Y B) DÍA 7.....	39
FIGURA 14. COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS NO DIRIGIDOS <sup>177</sup> LU-DN(C19), CAPTACIÓN E INTERNALIZACIÓN CELULAR DE <sup>177</sup> LU-DN(C19)-CXCR4L EN CÉLULAS CON Y SIN BLOQUEO DE RECEPTORES, A) CAPTACIÓN EN MIA PACA-2, B) INTERNALIZACIÓN (CON RELACIÓN A LO CAPTADO) DE <sup>177</sup> LU-DN(C19).....	40
FIGURA 15. VIABILIDAD CELULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MIA PACA-2 Y PANC-1 A LAS 48 H DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS CON 4.3 BQ/CÉLULA DE INTERNALIZACIÓN <sup>177</sup> LU, 1.12 NM DE C19 Y UNA CONCENTRACIÓN EQUIVALENTE DE DOTA-DN. ....	42
FIGURA 16. ENSAYO CLONOGÉNICO DE LAS LÍNEAS CELULARES MIA PACA-2 Y PANC-1. ....	45
FIGURA 17. DOTA-DN(C19)-CXCR4L PROMUEVE APOPTOSIS EN LAS LÍNEAS CELULARES DE A) MIA PACA-2 Y B) PANC-1. ANÁLISIS DE ANEXINA V Y 7ADD DE CÉLULAS TRATADAS CON EL SISTEMA CARGADO Y SIN CARGAR CON C19 POR 72 H. N=3; **P < 0.001.....	46

## INDÍCE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE C19.....	11
TABLA 2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE RADIONÚCLIDOS EMISORES ALFA UTILIZADOS EN TAT.....	15
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES SISTEMAS (PROMEDIO ± DE, N=3) POR DLS	30
TABLA 4. PRINCIPALES BANDAS DE VIBRACIÓN (CM <sup>-1</sup> ) DE LOS SISTEMAS DOTA-DN, DOTA-DN-CXCR4L Y DOTA-DN(C19)-CXCR4L OBTENIDAS POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR.....	34
TABLA 5. MODELO BIOCINÉTICO Y DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA PRODUCIDA POR CADA BEQUEREL (BQ) DE <sup>177</sup> LU-DN(C19)-CXCR4L DEL CITOPLASMA AL NÚCLEO DE LAS CÉLULAS MIA PACA-2 Y PANC-1.....	43



## RESUMEN

En los últimos años, la investigación y desarrollo en nanomedicina se ha dirigido a la aplicación y desarrollo de nanosistemas diseñados para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades a nivel celular y molecular. En las terapias contra el cáncer, la administración de agentes terapéuticos cobra un interés relevante el transporte y liberación de fármacos a sitios específicos, minimizando los efectos adversos en tejidos sanos.

En este contexto los sistemas nanoparticulados han mostrado un importante potencial terapéutico. Los enfoques de la administración dirigida mediante estos sistemas representan una estrategia prometedora para alcanzar objetivos específicos y producir más de un mecanismo de daño, lo que resulta en un mayor efecto terapéutico [1–3]. En particular, se ha demostrado que las nanopartículas poliméricas dirigidas hacia receptores que se sobreexpresan en cáncer producen un efecto sinérgico cuando la quimioterapia y la radioterapia se direccionan hacia un objetivo seleccionado mientras se reduce la citotoxicidad en los tejidos periféricos sanos [1].

Se han empleado varios tipos de moléculas para permitir que las nanopartículas alcancen la diana tumoral deseada y mejorar la selectividad y efectividad del tratamiento. Y numerosos informes han documentado la idoneidad de las nanopartículas para transportar y administrar diferentes moléculas de interés en medicina como genes, proteínas o pequeños agentes oncoterapéuticos. Aun cuando la administración de fármacos dirigida ha demostrado ser un enfoque eficaz las aplicaciones clínicas de las nanopartículas siguen siendo limitadas [4].

Hasta hoy diferentes marcadores de membrana han sido estudiados con la finalidad de direccionar los sistemas hacia estos. En particular, se sabe que el receptor de quimiocinas CXCR4 y su ligando heterodimérico primario CXCL12 (SDF-1) se sobreexpresan en una amplia variedad de tumores y se ha informado como un “target” terapéutico prometedor para inhibir la migración e invasión de células cancerosas. Este receptor (CXCR4) se sobreexpresa en lesiones pancreáticas precancerosas malignas y en células madre pancreáticas cancerosas [5].

El cáncer de páncreas es muy letal y de mal pronóstico, ya que suele diagnosticarse en estadios avanzados o incluso en estadio metastásico. El desafío en su tratamiento es la resistencia intrínseca a los fármacos contra el cáncer, que está mediada por la interacción entre CXCR4-CXCL12 [6].

En los cánceres humanos, los tres genes RAS (HRAS, NRAS y KRAS) constituyen la familia de oncogenes mutados con mayor frecuencia. La mutación KRAS (homólogo del oncogén viral del



sarcoma 2 de rata de Kirsten) es muy prevalente en la carcinogénesis pancreática. La incidencia de la mutación de KRAS4b en el cáncer de páncreas se correlaciona con un mal factor en la supervivencia, mientras que KRAS4a se relaciona con una supervivencia superior. Este gen tiene una importante contribución en el crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia celular mediante la regulación de varias vías de señalización, lo que lo convierte en un objetivo prometedor para la terapia contra el cáncer [7].

El bloqueo de la asociación de membrana de KRAS4b se considera una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer. Recientemente, la molécula de C19 ((2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)-metilamina]propanamida) ha demostrado tener la capacidad de estabilizar el complejo KRAS4b-PDE $\delta$  de manera eficaz, bloqueando la asociación KRAS4b-membrana, que es necesaria para su activación [8–10]. Se ha demostrado que los dendrímeros son herramientas prometedoras dentro del campo de las nanopartículas para la terapia contra el cáncer. En particular, los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) se han modificado y empleado con éxito como sondas moleculares para la administración de fármacos dirigidos y la radioterapia [2, 3].

El lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) es actualmente el radionúclido teranóstico más utilizado debido a su capacidad para funcionar como una herramienta de generación de imágenes aprovechando sus emisiones gamma de baja energía (0.208 MeV con 10% de abundancia y 0.113 MeV con 6% de abundancia) y como agente radioterapéutico, debido a su emisión beta máxima de 0.497 MeV (78%) que le permite penetrar en los tejidos (2 mm).  $^{177}\text{Lu}$  forma un complejo de coordinación muy estable con ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y sus derivados, proporcionando radiofármacos estables [11].



## 1. MARCO TEÓRICO

Una de las estrategias potencialmente útiles en la administración de fármacos incluyen micelas, dendrímeros, liposomas y nanopartículas poliméricas que debido a su tamaño, pueden penetrar en los sitios tumorales y depositar su carga. Los dendrímeros se consideran sistemas ideales de entrega de fármacos debido a su morfología, funcionalidad y dimensiones [12].

### 1.1. DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son estructuras poliméricas hiper-ramificadas con una alta solubilidad en agua, y alta biocompatibilidad, constan de unidades repetidas, con grupos funcionales en su superficie que le permiten funcionalizarse con un gran número de moléculas. Tienen la capacidad de atrapar en sus cavidades a diferentes fármacos (conjugación no covalente) o bien pueden conjugarse con los grupos funcionales de la periferia (conjugación covalente). De manera específica los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) son macromoléculas esféricas compuestas por unidades repetidas de poliamidoamina, tienen baja toxicidad biológica, buena biocompatibilidad y estabilidad in vivo, sus amplias cavidades internas les permiten acomplejar fármacos hidrófobos y han sido ampliamente reportados por su uso para el transporte de estos [3,12–18].

Los dendrímeros de PAMAM generación 4.0 (Figura 1) son estructuras con un tamaño aproximado de 4 nm, con un peso molecular de 14.215 g/mol. En su superficie tienen 64 grupos amino primarios que le confieren carácter hidrofílico y naturaleza catiónica, mientras que en el interior posee 62 grupos amino terciarios a los que se les atribuye el carácter hidrofóbico [13,14].



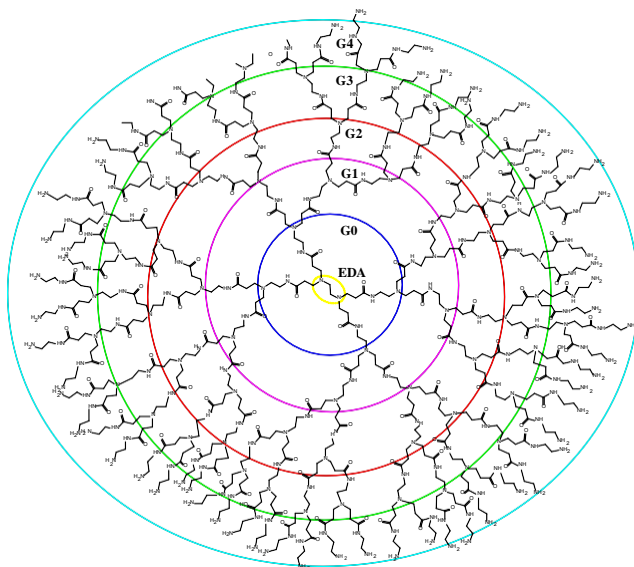


Figura 1. Estructura del dendrímero de PAMAM generación 4.0.

## 1.2. C19

El ((2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)-metilamino] propanamida) denominado C19 (Figura 2) es una molécula orgánica con un peso molecular de 383.3 g/mol que se une y estabiliza el complejo KRAS4b-PDE $\delta$  [8].

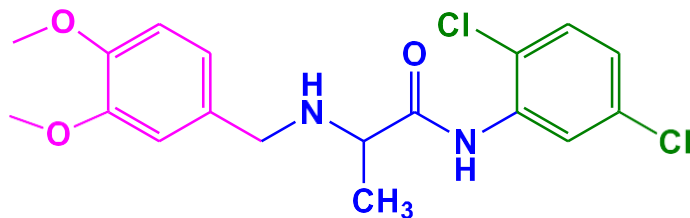


Figura 2. Estructura de la molécula de C19.

Dentro de sus propiedades fisicoquímicas más importantes se encuentran las siguientes:

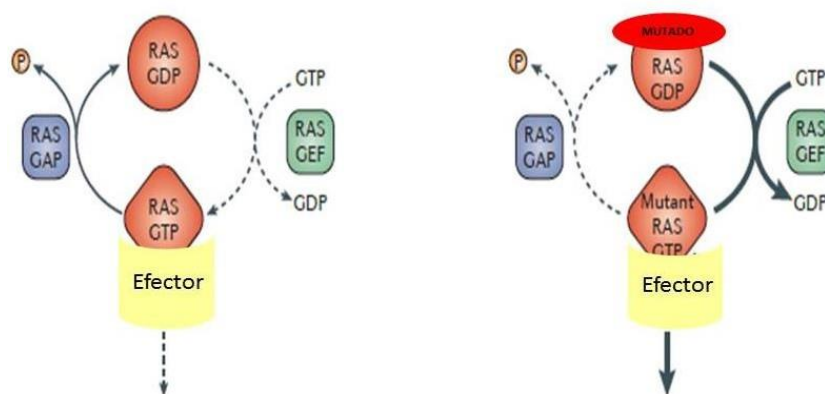


**Tabla 1. Principales características fisicoquímicas de C19.**

	<b>Nombre IUPAC</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>	<b>Fórmula</b>	<b>LogP</b>
<b>C19</b>	(2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2- [(3,4- dimetoxifenil)metilamino] propanamida	383.3	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.36

### 1.3. KRAS

Las mutaciones RAS son eventos genéticos que ocurren en la fase temprana de la progresión del tumor. La frecuencia y distribución de las mutaciones del gen RAS no son uniformes en todos los tipos de cáncer, KRAS es la isoforma con mayor frecuencia (86%), seguida por NRAS (11%) y, con menor frecuencia, HRAS (3%). KRAS actúa como una pequeña GTPasa, la cual alterna de su estado activo unido al nucleótido de GTP y su estado inactivo unido a GDP, este cambio ocurre debido a la estimulación de la hidrólisis de GTP por parte de las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), mientras que el intercambio de nucleótidos se lleva a cabo por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (RASGEF). Cuando existe una mutación en KRAS hay un deterioro en la estimulación de GAP que favorece la unión persistente de RAS a GTP (Figura 3). Después de la estimulación del factor de crecimiento y la activación de los RASGEF, la unión de nucleótidos se desestabiliza y se libera el nucleótido. Como las concentraciones celulares de GTP son diez veces más altas que las de GDP, los RASGEF promueven la formación transitoria de RAS-GTP, y los RASGAP devuelven la proteína al estado inactivo unido a GDP [19,20].



**Figura 3. Mecanismo de activación de RAS.**

Las proteínas RAS se sintetizan inicialmente como proteínas inactivas en el citosol. Las cuatro proteínas RAS tienen una terminación CAAX que es necesaria para diferentes modificaciones postraduccionales con la finalidad de mejorar la hidrofobicidad de RAS facilitando su asociación a la membrana de la célula. El primer paso es catalizado por la enzima citosólica farnesiltransferasa (FTasa), encargada de la adición covalente de un isoprenoide de farnesilo de 15 carbonos (C15) a la cisteína de la molécula CAAX, posteriormente hay una eliminación proteolítica del péptido AAX catalizada por la enzima convertidora de RAS1 (RCE1) y, finalmente, la carboximetilación catalizada por la enzima metiltransferasa (ICMT) de la cisteína farnesilada ahora terminal [19].

La mayoría de las mutaciones bloquean KRAS4b en la conformación unida a GTP, lo que causa una activación constitutiva y favorecen la unión a moléculas efectoras como las RAF quinasas. Para activarse fisiológicamente, KRAS4b además de las modificaciones postraduccionales debe translocarse desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática; este proceso es mediado por la fosfodiesterasa  $\delta$  (PDE $\delta$ ) [8,21].

Las consecuencias funcionales de las mutaciones presentes en KRAS en los diferentes tipos de cáncer en los que participa esta proteína incluyen el aumento de la proliferación celular, la supresión de la apoptosis, un metabolismo celular alterado y cambios en el microambiente tumoral.



## 1.4. Radiación

La radiación ionizante es la energía que se libera por parte de algunos átomos de elementos inestables o radionúclidos en forma de ondas electromagnéticas (rayos  $\gamma$  o rayos X) o partículas ( $\alpha$ ,  $\beta$  o neutrones). Cada radionúclido se caracteriza dependiendo del tipo de radiación que emite, su energía, abundancia y tiempo de vida media. Aprovechando estas características se generan los radiofármacos en los que generalmente se incluye una biomolécula, un conector, un radionúclido y un agente quelante bifuncional (BFCA) (Ramos, Ramos, Jesús, & García, 2013). Particularmente los radiofármacos de Lutecio ( $^{177}\text{Lu}$ ), con reconocimiento molecular específico, han sido propuestos por su capacidad terapéutica debido a las propiedades terapéuticas y diagnósticas de este radionúclido.

Una de las características importantes que se debe tomar en cuenta es la elección del agente quelante bifuncional, ya que de este depende en gran medida la estabilidad del radiofármaco, actualmente 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y sus derivados son los más utilizados.

### 1.4.1. Radiación alfa

Las partículas alfa ( $4\text{ He}^{2+}$ ) son considerados potentes agentes terapéuticos que tienen dos ventajas sobre las terapias beta. Primero, la alta transferencia lineal de energía (LET) de una partícula  $\alpha$  es 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que la LET de las partículas  $\beta$  (100 keV/ $\mu\text{m}$  frente a 0.2 keV/ $\mu\text{m}$ ). Esta característica única de las partículas alfa permite que una mayor fracción de la energía total se deposite en las células, aumentando así la eficacia terapéutica. En segundo lugar, el corto alcance de la radiación alfa en tejido humano va de 50 a 100  $\mu\text{m}$ , debido a su alto LET, comparado con el alcance de las partículas  $\beta$  (rangos máximos de 2 y 11 mm), esto permite la destrucción efectiva de las células cancerosas diana debido a la radiación altamente citotóxica, al mismo tiempo que limita el daño al tejido sano circundante. Por lo tanto, los avances de la nanotecnología en la administración basada en partículas alfa ofrecen el mejor potencial para tratar las micrometástasis sin afectar los tejidos normales [20–22].



Los efectos de la alta transferencia lineal de energía y el corto alcance de la radiación alfa, se reflejan en la producción de roturas de doble cadena en el ADN, que aumentan la toxicidad debido a la capacidad limitada para reparar el daño, lo que desencadena la muerte celular instantánea por una sola partícula capaz de atravesar el núcleo. La toxicidad para las células tumorales por efecto de las partículas  $\beta$  es menos eficaz debido a la aparición de radicales libres, que dañan indirectamente el ADN, y que a menudo se pueden reparar de manera más eficiente [23]. Esta mayor eficacia biológica de las partículas alfa es independiente de la concentración de oxígeno, la tasa de dosis y la etapa del ciclo celular.

Recientemente, ha ido en aumento el interés en el uso de partículas alfa debido a su alto potencial citotóxico que puede usarse de manera eficaz en la terapia contra el cáncer. La terapia dirigida con partículas alfa (TAT) implica la irradiación de células cancerosas, micrometástasis o tumores mediante la emisión de una sola partícula alfa o mediante una cascada de partículas alfa en su vecindad.

A pesar de la eficacia que ofrece el uso de partículas alfa en la terapia contra el cáncer, existen algunas desventajas que han impedido su uso, como la disponibilidad limitada o la alta producción para aplicaciones médicas. Aunque hay más de 100 radionúclidos que se desintegran por emisión  $\alpha$ , la mayoría de ellos tienen tiempos de vida media demasiado cortos o muy largos para su uso terapéutico o sus propiedades químicas no permiten su uso óptimo en medicina. La elección del radionúclido adecuado depende de diversos criterios: tiempo de vida media, esquema de desintegración, energía de retroceso, energía de emisión asociada, propiedades físicas y químicas y disponibilidad. La Tabla 2 muestra las propiedades físicas de varios emisores alfa utilizados en la terapia dirigida de partículas alfa (TAT) [23]. El problema más difícil con el manejo de partículas alfa está asociado con la liberación de las hijas de radioisótopos, así como la falta de sistemas quelantes bifuncionales apropiados que brinden estabilidad in vivo, un requisito indispensable para lograr la focalización selectiva de emisores alfa en sitios tumorales [23,24]. Actualmente, la terapia dirigida que utiliza isótopos emisores alfa presenta una oportunidad en el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer para tratar diversas enfermedades neoplásicas.

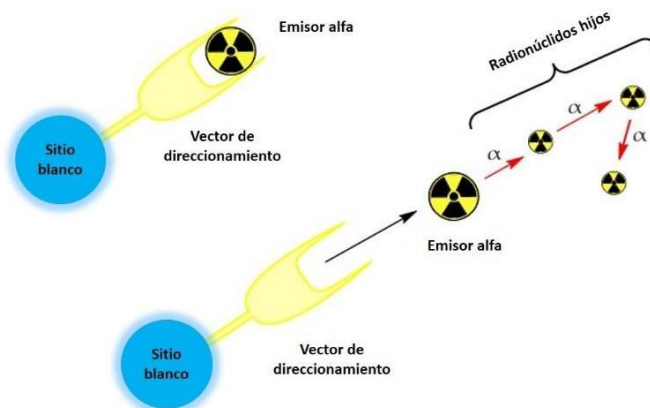


Tabla 2. Principales características de radionúclidos emisores alfa utilizados en TAT.

Radionúclido	t <sub>1/2</sub>	Emisiones	Energía (MeV)	Energía de retroceso (KeV)	Rango (µm)	Hijos	t <sub>1/2</sub>	Decaimiento	Energía (MeV)
<sup>227</sup> Th	18.7 d	α	6	---	50-70	<sup>223</sup> Ra*			
<sup>225</sup> Ac	10 d	α	5.8	---	50-90	<sup>221</sup> Fr	4.8 m	α	7
				105		<sup>217</sup> At	32.3 ms	α	7
				116		<sup>213</sup> Bi	45.6 m	α	6
								β <sup>-</sup>	0.444
								γ	0.440
				132		<sup>213</sup> Po	4.2 µs	α	8
<sup>223</sup> Ra	11.4 d	α	5.7 d	108.4	50-70	<sup>219</sup> Ra	3.96 s	α	6.8
				126		<sup>215</sup> Po	1.78 ms	α	7.4
				140		<sup>211</sup> Pb	36.1 m	β <sup>-</sup>	---
						<sup>211</sup> Bi	2.13 m	α	6.6
								β <sup>-</sup>	---
				128		<sup>211</sup> Po	0.516 s	α	---
<sup>213</sup> Bi	45.6 m	α	6	50-90	132	<sup>213</sup> Po	4.2 µs	α	8
						<sup>209</sup> Tl	2.2 m	β <sup>-</sup>	0.659
						<sup>209</sup> Pb	3.5 h	β <sup>-</sup>	0.198
						<sup>209</sup> Bi	Stable	---	---
<sup>212</sup> Bi	60.6 m	α	6.1	40-100	---	<sup>212</sup> Po	0.3 µs	α	---
						<sup>208</sup> Tl	3.1 m	β <sup>-</sup>	---
						<sup>208</sup> Pb	Stable	---	---
<sup>211</sup> At	7.2 h	α EC	5.9	55-80	116	<sup>207</sup> Bi	33.4 y	β <sup>-</sup>	---
						<sup>211</sup> Po	0.516 s	α	---
						<sup>207</sup> Pb	Stable	---	---

### 1.4.1.1. Energía de retroceso

El uso de partículas alfa a pesar de sus ventajas se ve obstaculizado principalmente por la energía de retroceso. La energía de retroceso provoca la ruptura entre la molécula objetivo o el agente quelante, dejando libre al radionúclido. Esta liberación implica la transformación del padre en una nueva hija con una química diferente a la del padre; y la emisión de la primera partícula  $\alpha$  (Figura 4). Posteriormente, hay un retroceso del átomo principal alejándose del agente quelante. Parte de la energía de desintegración se transfiere a un núcleo hijo debido a la ley de conservación del momento, y los intermedios posteriores que emiten partículas  $\alpha$  (hijas) tienen energía de retroceso debido al nucleido hijo de aproximadamente 100 keV. Este tiene la capacidad de romper al menos 10,000 enlaces químicos (asumiendo 10 eV/por enlace). Esto no es deseable porque la desintegración alfa provocará la ruptura del enlace y el escape de átomos hijos que pueden irradiar órganos y tejidos sanos, reduciendo así la dosis terapéutica administrada al sitio enfermo y un sin número de efectos adversos [25,26].



**Figura 4. Esquema de la energía de retroceso de partículas alfa.**

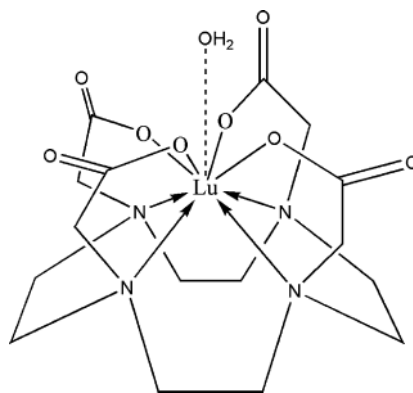
Las partículas alfa son extremadamente efectivas para matar las células tumorales, pero también pueden causar un daño a los tejidos sanos debido a la inestabilidad química del radiomarcaje. Por lo tanto, es de gran importancia lograr la estabilidad in vivo y lograr el confinamiento de los emisores alfa al microambiente tumoral. Para satisfacer estas

necesidades, se están desarrollando estrategias para favorecer la retención de las hijas que se producen tras la descomposición y reducir el impacto de la energía de retroceso. Estas estrategias incluyen 1) encapsulación de radionúclidos en un nanoportador, 2) uso de vehículos dirigidos (anticuerpos o péptidos) y 3) administración local [27–29].

## 1.4.2. Radiación beta

### 1.4.2.1. Lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )

Lutecio es el último elemento de la serie de lantanidos, posee 71 electrones con una configuración  $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^16s^2$ . En reacciones químicas, los átomos de lutecio pierden los dos electrones más externos y el único electrón 5d, generando la especie catiónica +3. Los cationes trivalentes en solución tienen una fuerte tendencia a formar complejos con átomos donadores de electrones como O, F y N [3]. El número de coordinación termodinámicamente más estables suele ser 8 o 9, con ligandos de tipo poliaminopolicarboxilato acíclico o cíclico que tienen 8 o 9 átomos donantes como DOTA y algunos de sus derivados (Figura 5).



**Figura 5. Complejo de coordinación entre el agente quelante DOTA y Lu-177.**

El  $^{177}\text{Lu}$ , tiene vida media de 6.647 días, su decaimiento es principalmente por emisión de partículas  $\beta$  (emisión  $\beta$ -máxima de 497 keV) aunque también presenta emisiones  $\gamma$  con energías de 113 y 208 keV (Figura 6). Estas emisiones son las que vuelven a este radionúclido útil en la práctica clínica por sus aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico [32].



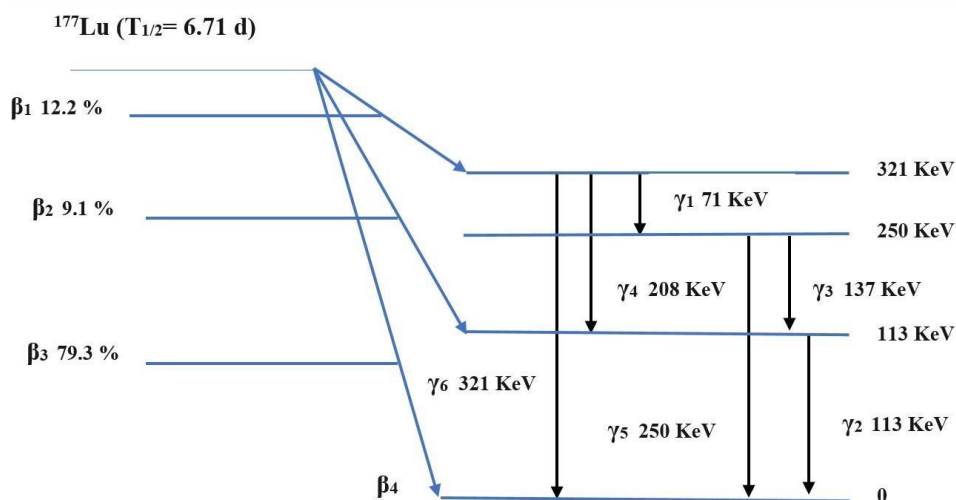


Figura 6. Esquema de decaimiento del Lu-177.

### 1.5. CXCL12

Las quimiocinas son una familia de citocinas conocidas por su capacidad para inducir quimiotaxis y son secretadas por una variedad de células estromales y epiteliales. La quimiocina CXCL12 también conocida como factor 1 derivado del estroma (SDF-1) es una quimiocina expresada en muchos tejidos, incluidos cerebro, corazón, bazo, pulmón, hígado, riñón, médula ósea y timo; ejerce fuertes efectos quimiotácticos sobre los linfocitos y juega un papel importante en el sistema inmunológico. CXCL12 interactúa con su receptor específico CXCR4 para activar diferentes vías de señalización que favorecen el crecimiento de las células cancerosas, su migración, adhesión, supervivencia y proliferación celular [5,32–34].

### 1.6. CXCR4

El receptor de quimiocina-4, se expresa en varios tejidos involucrados en la regulación inmunológica y está regulado positivamente en muchas enfermedades, es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que funciona como un receptor inmunomodulador. El CXCR4 se sobreexpresa en más de 23 tipos de cánceres humanos incluidos riñón, pulmón, cerebro, próstata, mama, páncreas, ovario y melanomas, esta sobreexpresión contribuye al crecimiento tumoral, procesos de angiogénesis, metástasis y resistencia terapéutica. La



expresión elevada de CXCR4 se ha correlacionado en varios cánceres como un biomarcador de mal pronóstico [5,33]. CXCR4 se expresa comúnmente en la mayoría de los tipos de células hematopoyéticas, incluidos macrófagos, monocitos, linfocitos T y B, neutrófilos hematopoyéticos, progenitores endoteliales y células madre en sangre o médula ósea [35,36]. CXCR4 existe como un homodímero constitutivo en células malignas en presencia y ausencia de ligandos. La dimerización juega un papel importante en varias funciones del receptor, incluida la unión de ligandos, el acoplamiento de proteínas G y la endocitosis [18,37].

La interacción entre CXCL12/CXCR4 conduce a la activación aguas abajo de las vías PI3K/AKT y MAPK que conducen a la supervivencia, proliferación progresión tumoral, angiogénesis, metástasis y del tumor. El mecanismo incluye primero, la diseminación de CXCR4 a órganos donde se expresa CXCL12, y por lo tanto permite que las células tumorales accedan a diferentes nichos celulares, como la médula, favoreciendo la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales. En segundo lugar, CXCL12 puede estimular la supervivencia y el crecimiento de las células neoplásicas de manera paracrina. Y en tercer lugar, CXCL12 puede promover la angiogénesis tumoral atrayendo células endoteliales al microambiente tumoral [33,38,39].



## 2. OBJETIVO

Diseñar, preparar, caracterizar y evaluar *in vitro e in vivo* nanosistemas de liberación controlada basados en dendrímeros dirigidos al receptor de quimiocina-4, los cuales resultan útiles como nanosistemas de radioterapia y oncoterapia para el tratamiento oportuno de tumores que sobre-expresan CXCR-4.



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Conjugación de DOTA-DN

En la Figura 7a se observa el esquema de la conjugación de p-SCN-Bn-DOTA (DOTA) al dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) G 4.0 para la síntesis de DOTA-DN, para la cual se disolvieron 0.285  $\mu\text{mol}$  de DN en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9.5) y se mezclaron con una solución de DOTA (4.3  $\mu\text{mol}$  de DOTA disueltos en 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M y 500  $\mu\text{L}$  de buffer de  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.5). La mezcla se incubó a 37  $^\circ\text{C}$  durante 1 h (relación molar DOTA:DN de 15:1). El sistema final se purificó mediante ultracentrifugación (filtros MWCO 3,000 Da; Millipore; 2,500 g) hasta lograr un pH neutro. El filtrado se resuspendió en agua, se liofilizó y se almacenó para su posterior caracterización fisicoquímica (DLS, TEM, FT-IR, UV-Vis).

#### 3.2. Activación de grupos carboxilo en CXCR4L

Para la activación de los grupos carboxilo se disolvió CXCR4L (1.0 mg; 0.8  $\mu\text{mol}$ ) en 200  $\mu\text{L}$  de DMF y se añadió a una mezcla que contenía 100  $\mu\text{L}$  de DIPEA (medio básico) (58.5  $\mu\text{mol}$ ; 10.2  $\mu\text{L}$  DIPEA / 400  $\mu\text{L}$  DMF) y 100  $\mu\text{L}$  del agente activador de carboxilato HATU (2.6  $\mu\text{mol}$ ; 1 mg en 100  $\mu\text{L}$  de DMF). La mezcla se agitó durante 15 min a temperatura ambiente.

#### 3.3. Conjugación de CXCR4L a los grupos de amina del DOTA-DN (DOTA-DN-CXCR4L)

Para la síntesis de DOTA-DN-CXCR4L (Ver Figura 7b) se añadió el DOTA-DN previamente sintetizado (0.23  $\mu\text{mol}$ ; 3.5 mg / 100  $\mu\text{L}$  de buffer de  $\text{NaHCO}_3$  0.2 M pH 9.5) a la solución de CXCR4L con los grupos carboxilato activados (relación molar CXCR4L:DOTA-DN de 3.5:1), y la mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se purificó mediante ultracentrifugación (filtros MWCO 3,000 Da; Millipore; 2,500 g) hasta que se alcanzó un pH neutro. Finalmente, el filtrado se resuspendió en agua, se liofilizó y se almacenó para la caracterización fisicoquímica (DLS, TEM, FT-IR, UV-Vis) y uso posterior.



### 3.4. Preparación de DOTA-DN(C19) y DOTA-DN(C19)-CXCR4L

Para encapsular C19 en DOTA-DN y DOTA-DN-CXCR4L (Figura 7c), se mezclaron 1.6 mg de DOTA-DN o DOTA-DN-CXCR4L con C19 (1.2 mg en DMSO). La mezcla final se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se purificó mediante ultracentrifugación (filtros MWCO 3,000 Da; Millipore; 2,500 g) para eliminar el C19 libre.

### 3.5. Preparación de $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L, $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19) y $^{177}\text{Lu}$ -DN-CXCR4L

El radiomarcado de los sistemas dendrimericos con  $^{177}\text{Lu}$  (Figura 7d) se realizó utilizando el agente quelante bifuncional DOTA en condiciones ácidas (buffer de acetato 1 M, pH 5.0). Se adicionaron 9.25 MBq (20  $\mu\text{L}$ ) de la solución de  $^{177}\text{LuCl}_3$  a los diferentes sistemas dendrimericos DOTA-DN(C19)-CXCR4L, DOTA-DN(C19) y DOTA-DN-CXCR4L (250  $\mu\text{g}$ ) y se incubaron durante 1 h a 50  $^\circ\text{C}$ . Después del radiomarcado, los nanosistemas se purificaron mediante ultracentrifugación (filtros MWCO 3,000 Da; Millipore; 2,500 g). Para calcular el rendimiento del radiomarcaje ambas fracciones (filtradas y sin filtrar) se midieron en un calibrador de dosis (Capintec, EE. UU.). La pureza radioquímica de  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L,  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19) y  $^{177}\text{Lu}$ -DN-CXCR4L se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución (fase reversa) en un sistema Waters Empower utilizando una columna C18 (Bondapak® C18 10 m 125 Å; columna de 3.9  $\times$  300 mm) con un gradiente lineal (1 mL/min) de agua/acetonitrilo que contenían 0.1% de TFA de 98/10 a 2/90 en 30 min.

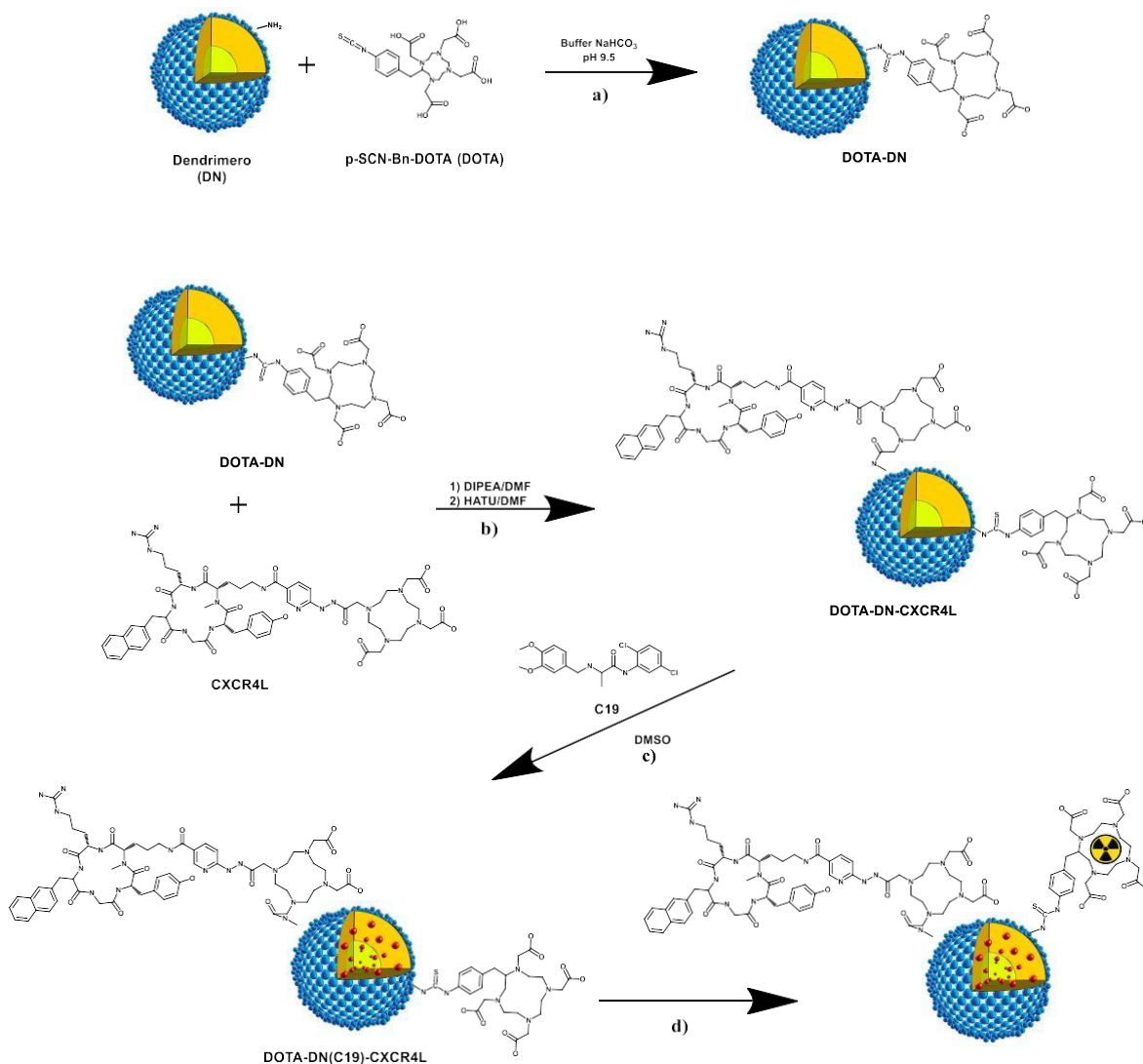


Figura 7. Esquema de la síntesis de preparación de a) DOTA-DN, b) DOTA-DN-CXCR4L, c) DOTA-DN(C19)-CXCR4L y d) <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L.

### 3.6. Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Zeta (Z)

La distribución del tamaño de partícula y el potencial Z se llevaron a cabo mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), utilizando el equipo Nanotracs (Microtract; FL, EE. UU.). Los análisis se realizaron con una longitud de onda de 657 nm (20 °C, corriente de 15.79 mA, un campo eléctrico de 14.35 V/cm y un tiempo de muestreo de 128 s) en solución acuosa. Para cada muestra, se reportó el promedio del diámetro y la desviación



estándar ( $n = 3$ ). El potencial zeta se midió en muestras diluidas para asegurar una fuerza iónica constante y adecuada.

### 3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las características morfológicas de los sistemas dendriméricos fueron observadas por TEM con el equipo JEOL-EMDSC-U10A (JEOL; Japón) operando a 200 kV. Se colocó una gota de las muestras en solución sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se dejó evaporar al vacío antes de las mediciones. Se midieron al menos 200 nanopartículas utilizando el software ImageJ para determinar su diámetro promedio.

### 3.8. Espectroscopía FT-IR

Los espectros IR de las materias primas y muestras liofilizadas se obtuvieron en un espectrómetro PerkinElmer System 2000 con plataforma ATR (Pike Technologies), aplicando espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FT-IR). Los espectros se adquirieron con 50 exploraciones en un rango operativo de  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  y una resolución de  $0.4\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.9. Espectroscopía UV-Vis

Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro Thermo Genesys 10S en un rango de 200 a 800 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Las suspensiones de nanopartículas se midieron mediante espectroscopía UV-Vis para controlar las reacciones de conjugación.

### 3.10. Eficiencia de atrapamiento

La eficiencia de encapsulado de C19 en los sistemas dendriméricos se determinó usando un método indirecto. La cuantificación se llevó a cabo mediante HPLC de fase reversa en un sistema Waters Empower utilizando una columna C18 (Bondapak® C18 10 m  $125\text{ \AA}$ , columna de  $3,9 \times 300\text{ mm}$ ) y un gradiente de agua/acetonitrilo que contenía 0.1% TFA, de 95/5 (v/v) a 20/80 (v/v) como fase móvil (flujo de  $1\text{ mL/min}$  y tiempo de corrida de 30 min). La concentración de C19 se cuantificó a  $\lambda = 277.4\text{ nm}$  midiendo el C19 libre en el sobrenadante (curva de calibración de  $R^2 = 0.997$ ;  $6.0\text{--}750.0\text{ g/mL}$ ), que se relacionó con la cantidad inicial añadida a los dendrímeros. Los experimentos se realizaron por triplicado.



La eficiencia de encapsulación (EE%) se calculó de la siguiente manera:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de C19 cargado}}{\text{Cantidad de C19 adicionada}} \times 100$$

### 3.11. Perfil de liberación in vitro de C19

Para la determinación del perfil de liberación de C19, se colocaron 5 mg del sistema DOTA-DN(C19)CXCR4L en 1 mL de buffer de fosfatos (PBS) en una bolsa de diálisis (MWCO 10,000 Da). La bolsa cerrada se colocó en un tubo que contenía 10 mL de PBS como medio de liberación. Se utilizaron dos medios de pH, simulando las condiciones fisiológicas y el microambiente intratumoral (pH 7.4 y 5.3, respectivamente). El tubo se mantuvo en agitación lenta a 37 °C. Se recolectaron alícuotas de 500 µL a diferentes tiempos (1, 2, 4, 24, 48 y 120 h), y el volumen se reemplazó con PBS nuevo haciendo la corrección. La liberación de C19 se cuantificó mediante HPLC de fase reversa con la metodología descrita anteriormente.

### 3.12. Pureza radioquímica

Para la evaluación de la pureza radioquímica, se diluyeron 50 µL (1 mg/mL) del sistema <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L en solución salina (4:1) y se incubaron a 37 °C a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 24 h). La concentración de <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución (fase reversa) en un sistema Waters Empower usando una columna C18 (Bondapak® C18 10 m 125 Å; columna de 3.9 × 300 mm) como se ha descrito previamente.

### 3.13. Estabilidad en suero

La estabilidad del sistema <sup>177</sup>Lu-DN(C19)-CXCR4L en suero se evaluó utilizando 500 µL de suero humano (muestra de suero humano certificada por NIST-909c; Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EE. UU.) y 100 µL de <sup>177</sup>LuDN(C19)-CXCR4L. La solución se incubó en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 24 h). Una vez que se alcanzó cada tiempo, se añadió 1 mL de MeOH/ACN (1:1) y la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. La actividad





del sobrenadante ( $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ ) y el sedimento (proteínas  $^{177}\text{Lu}$ ) se midió en un contador gamma (NML Inc.; EE. UU.).

### 3.14. Captación e internalización celular

Las líneas celulares de cáncer pancreático humano PANC-1 (ATCC-CRL-1469) y Mia PaCa-2 (ATCC CRL-1420), positivas a los receptores CXCR4 [13], se cultivaron con medio de cultivo RPMI y se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos ( $1 \times 10^5$  células/pozo). Después de 24 h, se retiró el medio y las células se expusieron a 430 kBq/pozo (62.5 ng/L) de cada tratamiento ( $^{177}\text{Lu-DN(C19)CXCR4L}$  y  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ ) a diferentes tiempos. Los tratamientos se retiraron a las 1, 2 y 3 h, y las células se lavaron dos veces con PBS. Luego, las células se incubaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de buffer de glicina (50 mM, pH 2.8) durante 5 min, y la solución se recolectó en tubos de ensayo para su medición (en este tratamiento se recuperaron las nanopartículas unidas a la membrana celular; las soluciones de ambos lavados se combinaron). Luego, las células se incubaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M durante 5 min, y la solución se recolectó en tubos de ensayo para su medición (en este tratamiento se recuperó las nanopartículas internalizadas dentro de la célula; se combinaron las soluciones de ambos lavados). Los estudios de bloqueo de receptores se llevaron a cabo en paralelo. Las células se preincubaron con CXCR4L, en una concentración 500 veces mayor que la añadida en el tratamiento (25.54 nM), durante 5 min antes de la adición de los tratamientos. La radiactividad se midió en muestras recogidas de las células tratadas con nanopartículas marcadas utilizando un detector de centelleo de tipo pocillo de NaI (TI) (NML Inc.; EE. UU.). La actividad inicial de cada tratamiento se consideró el 100%.

### 3.15. Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó en las mismas líneas celulares PANC-1 y Mia PaCa-2 utilizando el kit de ensayo XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5 carboxianilida; 0.1 mg/ml) (Roche, Alemania). Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (10,000 células/pozo) y se incubaron durante 24 h para permitir su adherencia. Posteriormente, las células se incubaron con 50  $\mu\text{L}$  (4.3 Bq/célula, 1.12 nM de C19) de cada tratamiento ( $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ ,  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ ,  $^{177}\text{Lu-DN-CXCR4L}$ ,



$^{177}\text{Lu-DN}$ ,  $^{177}\text{LuCl}_3$ , DOTA-DN(C19)-CXCR4L, DOTA-DN(C19), DOTA-DN-CXCR4L, DOTA-DN y C19. El tratamiento se puso a una concentración equimolar de CXCR4L y C19. La viabilidad se evaluó a 24 y 48 h después de la exposición al tratamiento. La proliferación celular en cada pozo se evaluó mediante la medición espectrofotométrica de la viabilidad celular a 450 nm en un lector de absorbancia de microplaca (Epoch<sup>TM</sup>; BioTek Instruments; EE. UU.). Los resultados se evaluaron por triplicado. La absorbancia de las células no tratadas fue considerado 100% de viabilidad.

### 3.16. $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ Dosimetría celular

El modelo biocinético y la estimación de la dosis de radiación absorbida de los radiofármacos  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  y  $^{177}\text{LuDN(C19)}$  en el núcleo celular se ajustaron a una función exponencial de la absorción experimental y el comportamiento de internalización para cada línea celular utilizando el software OLINDA/EXM. De esta forma se obtuvo el comportamiento biológico  $[qh(t)]$  en membrana o citoplasma (que fue corregido por decaimiento radiactivo). En esta expresión, " $h$ " representa el compartimento de la celda. La constante de eliminación efectiva se obtuvo como  $\lambda_{\text{eff}} = \lambda_{\text{biol}} + \lambda_{\text{Phys}}$ . La ecuación  $[A_h(t)]$  se integró a las 48 h para obtener el número total de desintegraciones (N) de  $^{177}\text{Lu}$  en cada región de origen (membrana o citoplasma).

$$N = \int_{0\text{ h}}^{48\text{ h}} Ahd(t)$$

La dosis de radiación absorbida por el núcleo de las células Mia PaCa-2 o PANC-1 se calculó de la siguiente manera:

$$\overline{D}_{\text{núcleo} \leftarrow \text{fuente}} = N * S_{\text{núcleo} \leftarrow \text{fuente}}$$

Donde  $\overline{D}$  representa el promedio la dosis absorbida en la región objetivo (membrana o citoplasma). El parámetro S implica las características físicas de  $^{177}\text{Lu}$  y las geometrías específicas del factor de dosis absorbido para membrana o citoplasma [14]. Para las células



Mia PaCa-2, se consideraron 10  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$  como la célula y el radio del núcleo, respectivamente. Los valores para las células PANC-1 se tomaron de Aghevlian y cols., (radio de la célula = 17.1  $\mu\text{m}$ ; radio del núcleo = 7  $\mu\text{m}$ ).

### 3.17. Ensayo clonogénico

Para evaluar la capacidad de una sola célula de crecer y formar una colonia después de la exposición al tratamiento, se sembraron 400-500 células de las líneas celulares Mia PaCa-2 y PANC-1 en cada pozo (placa de 6 pozos) y se trataron con 1.3 Bq/célula (C19 1.12 nM) de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)CXCR4L}$ ,  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ ,  $^{177}\text{Lu-DN-CXCR4L}$ ,  $^{177}\text{Lu-DN}$ ,  $^{177}\text{LuCl}_3$  o la misma concentración de C19 en cada uno de los sistemas dendriméricos (DOTA-DN(C19)CXCR4L, DOTA-DN(C19), DOTA-DN-CXCR4L, DOTA-DN) en 1.5 mL de medio de cultivo. Los controles consistieron en 400-500 células expuestas al medio de cultivo solo durante 48 h. Después de la exposición, los tratamientos o el medio se retiraron y se reemplazaron con medio fresco. Las placas se incubaron durante 12 días. Las colonias supervivientes se fijaron durante 10 min con paraformaldehído (PFA) al 4% a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante 30 min, se lavaron con agua destilada, se secaron y fotografiaron. Para la cuantificación, se añadió ácido acético al 10% durante 5 min para extraer el cristal violeta y se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de absorbancia de microplacas (Epoch<sup>TM</sup>; BioTek Instruments; EE. UU.).

### 3.18. Apoptosis

Se determinó la apoptosis en las líneas celulares PANC-1 y Mia PaCa-2 con del kit de Anexina V y muerte celular (Merck Millipore; Burlington, MA, EE. UU.). Las células se sembraron en matraces de cultivo celular a una densidad de  $1 \times 10^6$  células y se expusieron a 1.8 MBq de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ ,  $^{177}\text{LuDN CXCR4L}$  o 1.12 nM de C19 durante 72 h. Las células no tratadas se utilizaron como grupo de control. Las células se tripsinizaron y suspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% ( $1 \times 10^6$  células/ml). Luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de Anexina V y 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de muerte celular de cada suspensión. Posteriormente la suspensión se agitó suavemente en vórtex y se incubó a temperatura ambiente protegido de



la luz durante 20 min. Las intensidades de fluorescencia se midieron mediante citometría de flujo utilizando un analizador de células Muse (Merck Millipore; Burlington, MA, EE.UU.) y se realizaron por triplicado.

### 3.19. Análisis estadístico

La significancia entre las líneas celulares se analizó cuantitativamente mediante un análisis de ANOVA bidireccional en el software GraphPad Prism. Los resultados de captación, internalización y citotoxicidad se reportaron como el promedio y la desviación estándar. La significancia se evaluó mediante la prueba de t-Student (significancia  $p < 0.05$ ).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Tamaño de partícula

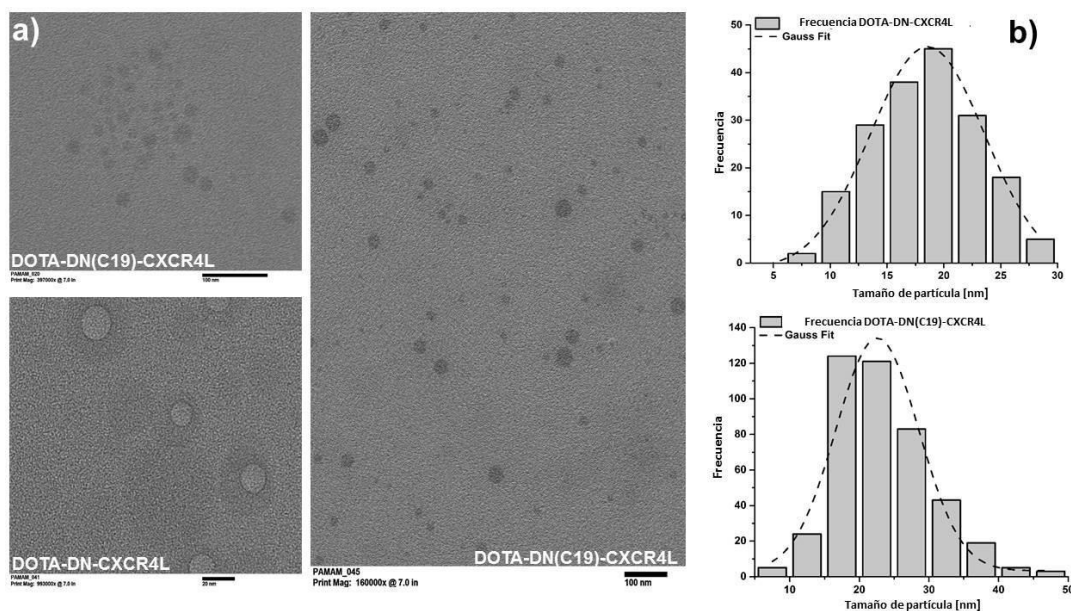
Está bien documentado que los dendrímeros de PAMAM son altamente efectivos para incorporar diferentes fármacos dentro de sus cavidades, mientras que los grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) de su superficie permiten su conjugación con diferentes biomoléculas [15]. En este trabajo el dendrímero (DN) de PAMAM se conjugó con p-SCN-Bn-DOTA (DOTA), un agente quelante que se utilizó posteriormente para quelar a los átomos de  $^{177}\text{Lu}$ . La conjugación se llevó a cabo mediante la formación de un enlace tiourea en una relación de 15:1 (DOTA: DN) [2]. Con la finalidad de conocer el impacto de agregar nuevas moléculas a la estructura principal, se analizaron el tamaño, la distribución y la morfología mediante técnicas de DLS y TEM, respectivamente. El diámetro hidrodinámico del dendrímero solo fue de  $3.3 \pm 1.65$  nm, después de la conjugación a DOTA el diámetro hidrodinámico de DOTA-DN aumentó a  $11.6 \pm 5.13$  nm (Figura 8) [2, 16].

En una segunda etapa se realizó la conjugación de la secuencia peptídica CXCR4L en una proporción molar de 3.5:1 (CXCR4L: DOTA-DN) para sintetizar DOTA-DN-CXCR4L mediante la formación de enlaces amida. El diámetro hidrodinámico ( $n = 3$ ) fue cinco veces mayor ( $59.0 \pm 10.7$  nm) que la obtenida para DOTA-DN ( $11.6 \pm 5.13$  nm), lo que se atribuyó a las interacciones electrostáticas entre las nanopartículas individuales. Finalmente, la molécula C19 fue atrapada en las cavidades de DOTA-DN-CXCR4L ( $81.13 \pm 13.84\%$  de eficiencia de encapsulación), lo que produjo un tamaño de partícula de  $67 \pm 23$  nm (Tabla 3).

**Tabla 3. Características de los diferentes sistemas (Promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ ) por DLS.**

Sistema	Diámetro hidrodinámico $\pm$ DE [nm]	PDI	PZ [mV]
DN	$3.3 \pm 1.65$	0.1002	SD
DOTA-DN	$11.6 \pm 5.13$	0.1153	$+29.5 \pm 8.85$
DOTA-DN-CXCR4L	$59.0 \pm 10.70$	1.2136	$+26.5 \pm 13.70$
DOTA-DN(C19)-CXCR4L	$67.0 \pm 23.17$	0.2181	$+21.4 \pm 5.19$

En las micrografías se observó una distribución monomodal en cada nanosistema evaluado. El aumento del diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (0.1002 a 0.2181, Tabla 3) se atribuyó a la conjugación en la superficie del DN, sin embargo no se observó modificación en la distribución de partículas. El análisis por microscopía electrónica de transmisión (Figura 8) reveló estructuras dendríticas cuasi esféricas bien definidas con distribución homogénea con un diámetro promedio ( $\approx 200$  nanopartículas) de 18.84 nm para DOTA-DN-CXCR4L y 22.53 nm para el sistema completo DOTA-DN(C19)-CXCR4L. Estos tamaños fueron menores que los obtenidos por DLS, ya que en TEM es el resultado de la medida del diámetro de partícula, mientras que DLS proporciona el diámetro hidrodinámico en suspensión. Acorde con los resultados de DLS, en el análisis TEM, el aumento de tamaño también se observó como resultado de las nuevas moléculas agregadas a la superficie y cavidades del DN [2]. Los valores del potencial Z (Tabla 3) disminuyeron debido a la disminución de las aminas primarias protonadas disponibles en la superficie del dendrímero en cada etapa. El DOTA-DN tenía un potencial Z de +29,5 mV, mientras que el DOTA-DN-CXCR4L y DOTA-DN(C19)-CXCR4L mostraron +26,5 mV y +21,4 mV, respectivamente.



**Figura 8. Micrografías representativas obtenidas por TEM de los sistemas DOTA-DN-CXCR4L y DOTA-DN(C19)-CXCR4L.**



Los resultados del análisis por espectroscopia FT-IR muestran en la Figura 9(a) el espectro de PAMAM G 4.0 con las bandas distintivas en  $3269$  y  $3061\text{ cm}^{-1}$  atribuidas al enlace N-H de los grupos de amina primaria en la superficie del dendrímero. A  $2928$  y  $2826\text{ cm}^{-1}$  las bandas de absorción se correlacionaron con las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del enlace C-H (cadena alifática de DN), también se observaron vibraciones en  $1464$  y  $1428\text{ cm}^{-1}$  del enlace C-H. A  $1151\text{ cm}^{-1}$ , también se detectó el modo vibracional C-N de la amina terciaria (del núcleo del DN). Finalmente, se observó una banda intensa y bien definida centrada en  $1625\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a enlaces C-O (de la región amida) y otras dos bandas a  $1538$  y  $1312\text{ cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento de C-N de amida) [2]. El espectro de p-SCN-Bn-DOTA (Figura 9(b)) muestra bandas en  $3349$  y  $3094\text{ cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones N-H, a  $2946\text{ cm}^{-1}$  y  $2855\text{ cm}^{-1}$  señales de estiramiento asyC-H y syC-H fueron detectadas. A  $2091\text{ cm}^{-1}$ , se observó una banda bien definida atribuida al grupo de isotiocianato (NCS) del DOTA. Entre  $1506$  y  $1348\text{ cm}^{-1}$  se observaron bandas vibratorias atribuidas al enlace C-N del anillo aromático del grupo -NCS. Además, se observó la vibración de estiramiento C-C del anillo de fenilo. En el rango de  $924$  a  $660\text{ cm}^{-1}$  también fue posible detectar las bandas vibratorias C-H fuera del plano de DOTA [17].

En la Figura 9(e), el espectro FT-IR de DOTA-DN conjugado mostró un corrimiento hacia el rojo y una disminución en la intensidad de las señales a  $3255$  y  $3063\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a enlaces N-H de la estructura del DN (Figura 9(a)), el cual inicialmente tenía 64 grupos  $\text{NH}_2$  disponibles, por lo que este cambio sugiere la disminución de los grupos amina primaria presentes después de la conjugación con DOTA. Otro cambio importante fue la aparición de una nueva banda a  $710\text{ cm}^{-1}$  del enlace C-S, atribuida a la formación del nuevo enlace tiourea que confirma una conjugación adecuada. Además, se pudo observar un desplazamiento hacia el azul y una disminución en la intensidad de las bandas entre  $1633\text{ cm}^{-1}$  y  $1545\text{ cm}^{-1}$ , atribuidas a las frecuencias de estiramiento C-O y C-N [18].

El espectro del péptido CXCR4L (Figura 9(c)) mostró una banda ancha centrada en  $3230\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del enlace N-H de las aminas libres de la secuencia peptídica (Tyr, Orn, Arg y Gly), además se observó a  $3070\text{ cm}^{-1}$  señales del enlace C-H de los anillos

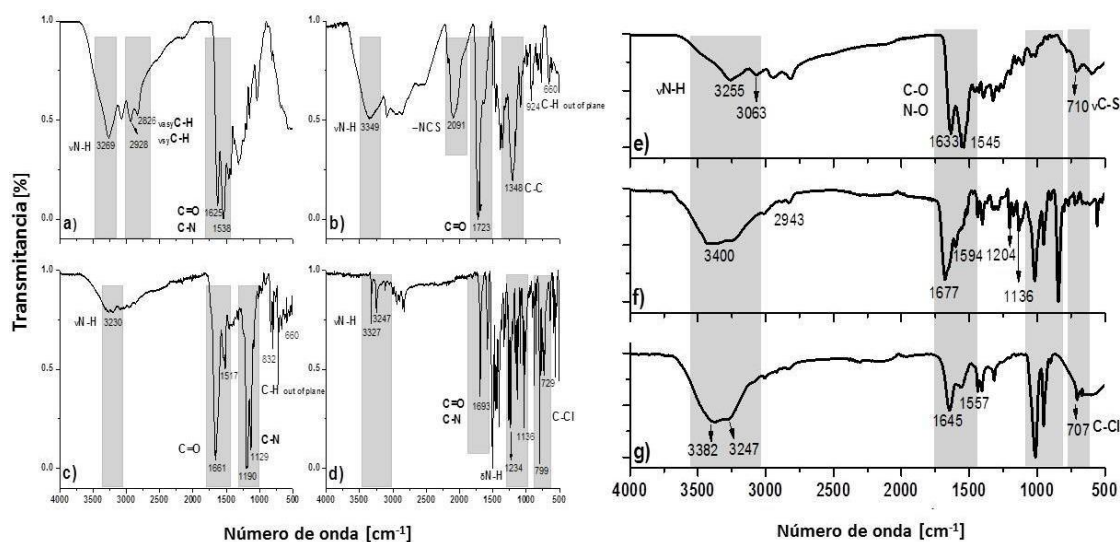




aromáticos (tirosina, naftilo y la molécula de HYNIC). A 1661 y 1517  $\text{cm}^{-1}$  vibraciones características del enlace C–C–C de los anillos aromáticos (tirosina, el grupo naftilo y HYNIC) fueron detectadas. Entre 832 y 660  $\text{cm}^{-1}$ , se puede observar un espectro altamente estructurado debido a las sustituciones en los anillos aromáticos. Finalmente, a 1190 y 1120  $\text{cm}^{-1}$  están presentes dos bandas de alta intensidad, que se atribuyeron a las vibraciones de enlace C–N de las aminas terciarias encontradas en el macrociclo DOTA [17]. Una vez realizada la conjugación DOTA-DN con CXCR4L se observaron cambios importantes que indicaron que el sistema DOTA-DN-CXCR4L se formó correctamente (Figura 9(f)). Aproximadamente a 3400  $\text{cm}^{-1}$  (N–H), se observó un ensanchamiento de la banda como resultado de la contribución de las aminas primarias presentes en la estructura DOTA-DN (Figura 9(e)). Asimismo, se encontró una disminución en la intensidad de las bandas en la región del enlace C–H de los metilenos (2943  $\text{cm}^{-1}$ ), mientras que a 1677 y 1594  $\text{cm}^{-1}$  se encontró un corrimiento hacia el rojo (44 y 49 unidades, respectivamente) este cambio es característico de la conjugación con nuevos enlaces C–C, C–O y anillos aromáticos [17]. A 1204 y 1136  $\text{cm}^{-1}$  se observó un cambio a mayores energías (desplazamiento hacia el azul) debido a la formación de un nuevo enlace amida. Este desplazamiento está correlacionado al cambio del grupo –COO del ácido carboxílico en el macrociclo DOTA por un enlace amida (C–N) (un átomo con menos masa y mayor electronegatividad).

Como resultado de la complejidad del sistema final DOTA-DN(C19)-CXCR4L (Figura 9(g)) y las interacciones entre C19 y el sistema dendrimérico DOTA-DN-CXCR4L, los cambios en los espectros son menos evidentes; sin embargo, entre 3382 y 3247  $\text{cm}^{-1}$  se apreció un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes al enlace N-H como efecto del aporte de las aminas libres presentes en el sistema DOTA-DN-CXCR4L (Figura 9(f)) y C19 (Figura 9(d)). El desplazamiento hacia el azul de algunas bandas entre 1645 y 1557  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyó a los enlaces de estiramiento C–O y C–N. Aunque la superposición de algunas bandas no permite la detección de modificaciones significativas, la banda a 707  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C–Cl de C19 (Figura 9(d)), fue indicativa de la presencia de C19 en el sistema final. Las modificaciones observadas en los sistemas finales se resumen en la Tabla 4.





**Figura 9.** Espectros FT-IR de a) PAMAM G 4.0 (DN), b) p-SCN-Bn-DOTA (DOTA), c) CXCR4L, d) C19, e) DOTA-DN, f) DOTA-DN-CXCR4L y g) DOTA-DN(C19)-CXCR4L.

**Tabla 4.** Principales bandas de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ ) de los sistemas DOTA-DN, DOTA-DN-CXCR4L y DOTA-DN(C19)-CXCR4L obtenidas por espectroscopia ATR-FTIR.

Grupo funcional	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	DOTA-DN	DOTA-DN-CXCR4L	DOTA-DN(C19)-CXCR4L
$\nu\text{N-H}$	3255	3400	3382
$\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2\text{-}$	2943	2877	2924
$\nu_{\text{sy}}\text{-CH}_2\text{-}$	2813	2821	2839
C=O (DOTA)	1633	1677	1645
N-H			
-C-N	1545	1598	1561
C=C			
$\nu\text{C-C}$ del anillo aromático	---	1436-1309	1438-1316
$\nu\text{N-H}$ en el plano	1398-1044	1204-1018	1012
$\nu\text{C-H}$ fuera del plano	---	951-544	950
$\nu\text{C-Cl}$	---	---	707

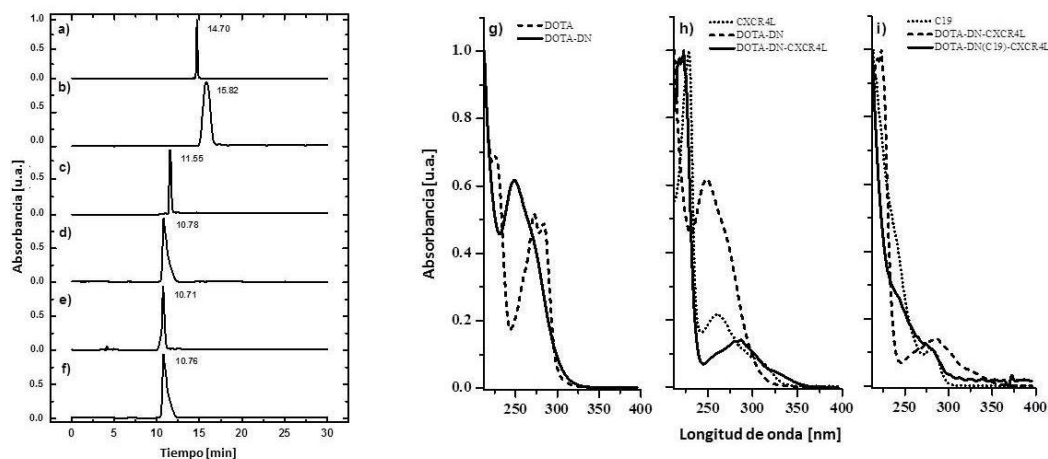


## 4.2. Caracterización por HPLC/UV-Vis

La formación adecuada de los sistemas fue seguida por HPLC de fase reversa con detección de matriz de fotodiodos. Los cambios en la polaridad de las moléculas se controlaron mediante los tiempos de retención ( $T_R$ ). El  $T_R$  de la molécula de DOTA (Figura 10(a)) fue de 14.7 min ( $\lambda_{\text{máx}} = 226$  nm). Una vez realizada la conjugación con el DN hubo un corrimiento a 15.82 min (Figura 10(b)). Este efecto fue explicado debido a la disminución de polaridad conferida por la formación del nuevo enlace tiourea, ya que el momento dipolar de los enlaces C–N–C produjeron una reducción del carácter polar. La molécula de CXCR4L presentó un pico a los 11.5 min (Figura 10(c)), que se desplazó a 10.78 min (Figura 10(d)) cuando se formó el sistema DOTA-DN-CXCR4L, este cambio fue explicado por la presencia de grupos –COOH en el molécula CXCR4L, que le confiere un aumento de polaridad. C19 presentó un máximo pico a 10.71 min (Figura 10(e)) mientras que el sistema completo DOTA-DN(C19)-CXCR4L presentó un tiempo de retención de 10.76 min (Figura 10(f)), este corrimiento se debe a la encapsulación de C19 en el dendrímero que aumenta su carácter hidrofílico; razón por la cual, en comparación con el DOTA-DN-CXCR4L vacío, hubo una disminución en el tiempo de retención. Todos los cambios antes mencionados corroboran la adecuada formación de los sistemas.

En cuanto a los espectros UV-Vis asociados a la picos de HPLC, la longitud de onda de absorbancia máxima se determinó para cada subproducto. El espectro de DOTA (Figura 10(g)) mostró 3 bandas de absorción en la región ultravioleta que corresponden a electrones  $\pi$  y pares de electrones no enlazantes. La transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  corresponde a longitud de onda ( $\lambda$ ) de 226 nm (mayor energía), mientras que las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  corresponden a las longitudes de onda de 274 y 284 nm. Después de la conjugación de DOTA con el DN (Figura 10(g)), se observó una única banda ancha  $\lambda = 245$  nm, lo que indica cambios en la estructura de DOTA y su conjugación al DN. Posteriormente se llevó a cabo la conjugación con el péptido CXCR4L (Figura 10(h)) y el espectro UV-Vis mostró 3 bandas de absorción atribuidas a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ , después de la conjugación, DOTA-DN-CXCR4L mostró un cambio batocrómico a 288 nm con respecto al sistema DOTA-DN y conservó la banda característica del péptido a 306 nm, estos cambios se explicaron

basándose en el aumento del número de insaturaciones y la presencia de los átomos de O y N. Para el sistema final DOTA-DN(C19)-CXCR4L (Figura 10(i)), un ensanchamiento de la banda aproximadamente a 270-280 nm fue observada y se le atribuyó a la contribución de las insaturaciones de cada componente. Los cambios y disminuciones de las longitudes de onda de absorción de UV se han informado como evidencia de la formación de complejos de dendrímeros de PAMAM con otros fármacos [19, 20], lo que sugiere la correcta formación de los sistemas.



**Figura 10. Cromatogramas HPLC de a) DOTA, b) DOTA-DN, c) DOTA-DN-CXCR4L, e) C19 y f) DOTA-DN(C19)-CXCR4L; y espectros UV-Vis g) modificación superficial del DN con DOTA (DOTA-DN), h) conjugación de CXCR4L a DOTA-DN (DOTA-DN-CXCR4L) y i) DOTA-DN(C19)-CXCR4L.**

### 4.3. Eficiencia de encapsulación

Los sistemas dendriméricos tienen la capacidad de incorporar una gran variedad de moléculas dentro de su estructura a través de la formación de enlaces covalentes entre sus aminas primarias de la superficie y la molécula, o a través del atrapamiento físico dentro de las cavidades del dendrímero a través de la formación de enlaces hidrógeno, o interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas [15, 21]. En este trabajo se logró el atrapamiento de C19 en las cavidades del DN con una eficiencia de  $81.13 \pm 13.84\%$ . La reacción se llevó a cabo a pH neutro, pH en el cual las aminas primarias de la superficie están completamente



protonadas ( $pK_a = 7.0-9.0$ ) [20, 21] mientras que en el interior de la estructura, solo una pequeña cantidad de aminas terciarias se encuentran protonadas ( $pK_a = 3.0-6.0$ ), conservando así la baja polaridad [18, 21–23] y por lo tanto, exhibiendo una mayor afinidad por C19 con un  $\log P$  de 3.363 [8] mediante interacciones hidrofóbicas. Simultáneamente, a este valor de pH con las aminas primarias de la superficie protonadas y algunas aminas terciarias en las cavidades también protonadas se generan repulsiones de cargas creando espacios, lo que favorece la carga de C19. Este efecto también fue observado por Tekade y cols., con la carga de MTX, justificando su interacción con la repulsión entre grupos amina protonados [24].

Dado que fármacos pequeños pueden encapsularse fácilmente en las cavidades de los dendrímeros debido a la repulsión de cargas, el tamaño de C19 y su peso molecular ( $PM = 383.3$  g/mol) también contribuyeron a su capacidad de carga. Este efecto también fue observado por Tekade y cols., donde el MTX ( $PM = 454.5$  g/mol) tuvo una eficiencia de encapsulación de  $79.74 \pm 1.11\%$  a pH 7.4 [24].

#### 4.4. Perfil de liberación

Para evaluar la influencia del DN sobre la liberación de C19, se realizó un perfil de liberación simulando las condiciones fisiológicas y el microambiente tumoral (pH 7.4 y 5.3, respectivamente) [25] (Figura 11). Para Ambas condiciones, se encontró un patrón bifásico con una liberación rápida durante las primeras 4 h de la evaluación con un concentración acumulada de 29 % a pH 7.4 y 36 % a pH 5.3. Después de 24 h para ambas condiciones de pH, se observó una disminución en la tasa de liberación. La velocidad de liberación dependía del pH y fue mayor a pH de 5.3 ( $p < 0,05$ ), como resultado de la alta protonación de los grupos amina, que producían repulsión de cargas y cambios conformacionales en el DN. En consecuencia, se aceleró la liberación de C19.

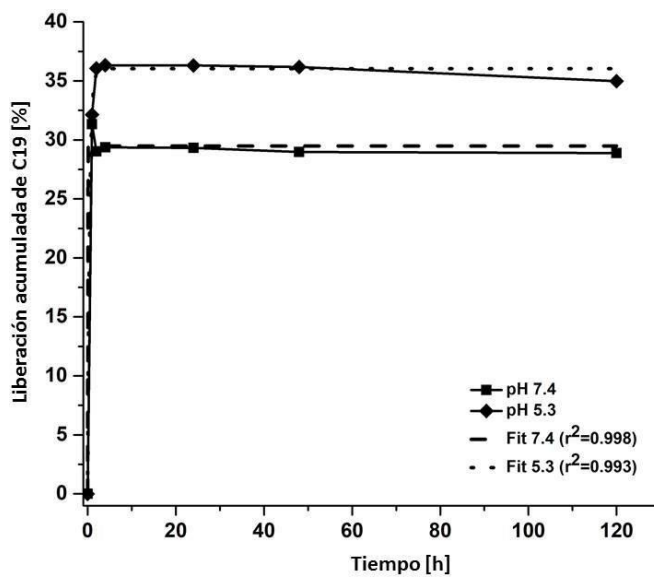
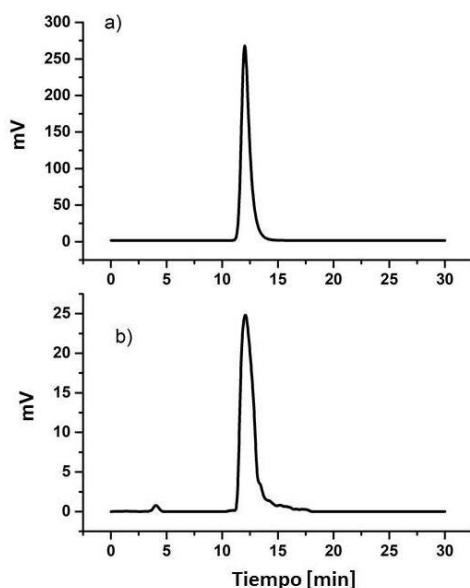


Figura 11. Perfil de liberación in vitro de DOTA-DN(C19)-CXCR4L a pH 5.3 (microambiente tumoral) y pH 7.4 (condiciones fisiológicas).

#### 4.5. Estabilidad en suero y pureza radioquímica

El sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-DOTA}$  demostró tener una adecuada estabilidad en suero. Su unión a proteínas plasmáticas resultó en 2.38, 2.88, 3.86 y 9.13 % a 1, 3, 6 y 24 h, respectivamente. Además, el radiofármaco se mantuvo estable en solución salina durante al menos 7 días. La Figura 12 muestra que la pureza radioquímica del nanosistema fue 99.95 y 97.90 % a 1 y 7 días, respectivamente. Estos resultados sugieren que el sistema permanecerá inalterado durante este tiempo en el organismo, además de asegurar que no habrá  $^{177}\text{Lu}$  libre que podría generar una dosis de radiación innecesaria a tejidos sanos.



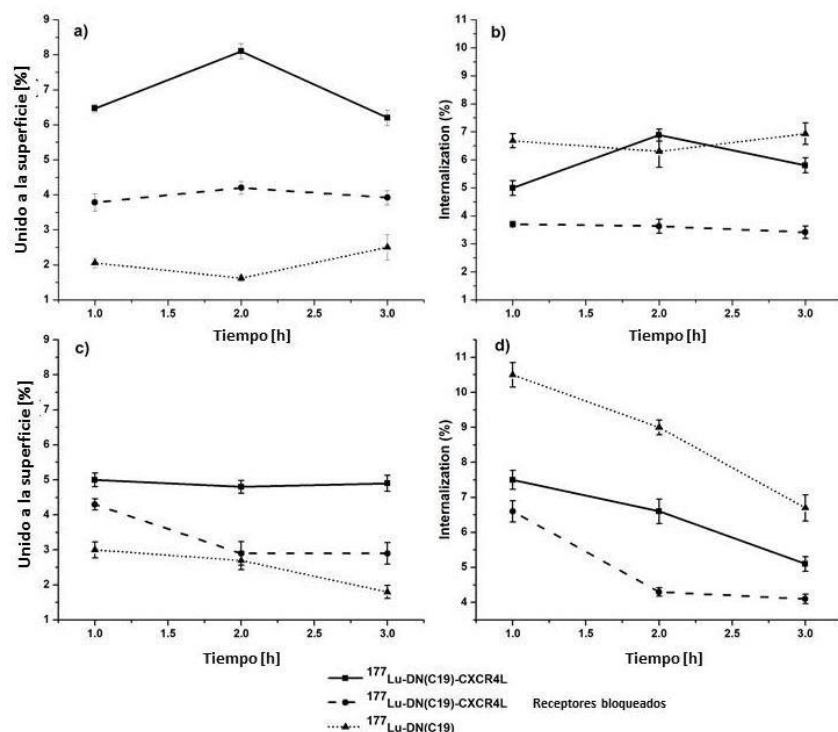
**Figura 12. Radiocromatogramas HPLC de  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L a) día 1 y b) día 7.**

#### 4.6. Captación e internalización celular

Para demostrar la especificidad del sistema  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L con respecto a  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19), se llevaron a cabo estudios de captación e internalización en dos líneas celulares de cáncer de páncreas que sobreexpresan los receptores CXCR4 (Mia PaCa-2 y PANC-1) [13].

Al hacer la comparación de la captación en la línea celular PANC-1 (Figura 13(c)) entre el sistema no dirigido  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19) y el sistema final  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4, se observó una captación significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) ( $3.0 \pm 0.2\%$  vs  $5.0 \pm 0.2\%$ ) con este último. En la línea celular Mia PaCa-2 (Figura 13(a)), también se observó ese comportamiento al hacer la comparación entre  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19) ( $2.0 \pm 0.13\%$ ) y  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4 ( $6,4 \pm 0,10\%$ ) demostrando que existe una mayor captación estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) con el sistema que contiene la molécula de reconocimiento específico evidenciando el mecanismo de captación mediada por el péptido de direccionamiento CXCR4L. La mayor captación fue obtenida en la línea celular Mia PaCa-2, estos resultados se correlacionan con los informados por Li y cols., en los que se reporta una mayor expresión del receptor CXCR4 en la línea celular Mia PaCa-2 comparada con PANC-1[13]. Para corroborar la captación específica de  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-

CXCR4L, se evaluó el efecto del bloqueo del receptor CXCR4 pretratando las células con CXCR4L (25.54 nM), como resultado se observó una disminución de la captación hasta 4 veces en la línea celular de PANC-1 (Figura 13(c)) y más del doble en células Mia PaCa-2 (Figura 13(a)). Estos hallazgos revelaron un proceso de unión específica entre CXCR4L y sus receptor CXCR4. La internalización del sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ , con respecto a la captación calculada a 1, 2 y 3 h, fue aumentado gradualmente (Figura 13(b; d)).



**Figura 13. Comparación de los sistemas no dirigidos  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ , captación e internalización celular de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  en células con y sin bloqueo de receptores, a) captación en Mia PaCa-2, b) internalización (con relación a lo captado) de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ .**

#### 4.7. Viabilidad celular

Las diferencias significativas del efecto de los tratamientos entre la línea celular Mia PaCa-2 con una mutación en KRAS (KRAS dependiente) y la línea celular PANC-1 (independiente de KRAS) se determinaron mediante ANOVA de dos vías usando el





software Prism. En el estudio se evidenció diferencias significativas entre  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  ( $P < 0.05$ ),  $^{177}\text{Lu-DN-CXCR4L}$  ( $P < 0.05$ ),  $\text{DOTA-DN(C19)}$  ( $P < 0.05$ ) y  $\text{DOTA-DN-CXCR4L}$  ( $P < 0.05$ ). Dado que  $\text{DOTA-DN-CXCR4L}$  no incluye el componente radioterapéutico ( $^{177}\text{Lu}$ ) o el componente oncoterapéutico C19, la viabilidad observada fue superior al 80%. Por lo tanto, este tratamiento no se considera citotóxico para ninguna línea celular.

En Figura 14 se observa el mayor efecto citotóxico sobre la línea celular dependiente de KRAS después de 48 h de tratamiento con  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  (viabilidad de  $7.4 \pm 0.54\%$  para la línea celular Mia PaCa-2 vs  $59.0 \pm 0.73\%$  para la línea celular PANC-1). Este efecto se atribuyó a la internalización mediada por receptores, que fue conferida por el péptido de direccionamiento CXCR4L en la superficie del dendrímero, optimizando de esta manera la entrega de C19 en el sitio deseado. Por lo tanto, es posible sugerir el bloqueo exitoso de la asociación de KRAS a la membrana debido a la estabilización del complejo KRAS4b-PDE en la línea celular Mia PaCa-2 debido al mecanismo intrínseco de C19 [26, 27].

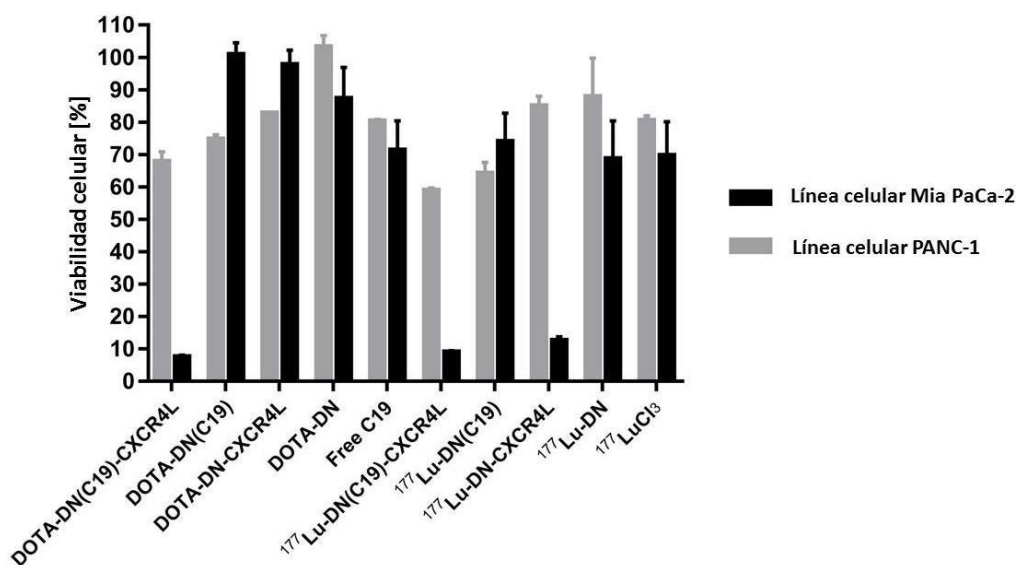
Durante las primeras 24 h (datos no mostrados) se observó una citotoxicidad dependiente de C19. Al comparar  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  con C19 libre, se observó un mayor efecto citotóxico con C19 (viabilidad de  $79.0 \pm 0.61\%$  vs  $69.9 \pm 0.57\%$  para PANC-1 y  $91.5 \pm 0.53\%$  vs  $82.4 \pm 0.89\%$  para Mia PaCa-2), Este comportamiento se atribuyó a la baja liberación de C19 por parte del sistema dendrimérico ya que a las 24 h solo se disponía del 29%, mientras que para las células expuestas al C19 libre, la biodisponibilidad de C19 no se vio afectado por el DN. Por otra parte se reveló la biocompatibilidad del sistema DOTA-DN en ambas líneas celulares (viabilidad superior al 90%). Después del tratamiento con  $\text{DOTA-DN(C19)}$ , la viabilidad disminuyó tres veces comparado con  $\text{DOTA-DN}$  demostrando la eficacia de C19. Aunque PANC-1 es la línea celular independiente de KRAS, el tratamiento con  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  durante 48 h mostró un efecto sinérgico entre C19 y  $^{177}\text{Lu}$ , que evidentemente fue mejorado por el reconocimiento específico de la receptores CXCR4L. La viabilidad después del tratamiento con  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  disminuyó significativamente ( $59.0 \pm 0.73\%$ ) al compararlo con





DOTA-DN(C19)-CXCR4L (que no contiene  $^{177}\text{Lu}$ ) o  $^{177}\text{Lu}$ -DN-CXCR4L (que no contiene C19).

La viabilidad más baja ( $7.4 \pm 0.54\%$ ) después del tratamiento con  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L se observó en la línea celular Mia PaCa-2 dependiente de KRAS, mientras que para DOTA-DN(C19)-CXCR4L y  $^{177}\text{Lu}$ -DN-CXCR4L, la viabilidad fue  $9.25 \pm 0.76\%$  y  $12.9 \pm 1.39\%$ , respectivamente. Estos resultados ponen en evidencia el impacto de la dependencia de KRAS y el efecto de la presencia de C19 (inhibidor de KRAS). Para ambas líneas, un efecto sinérgico entre la radioterapia dirigida y la terapia producida por la estabilización de KRAS4b-PDE pudo observarse.



**Figura 14. Viabilidad celular de las líneas celulares de Mia PaCa-2 y PANC-1 a las 48 h después de los tratamientos con 4.3 Bq/célula de internalización  $^{177}\text{Lu}$ , 1.12 nM de C19 y una concentración equivalente de DOTA-DN.**

#### 4.8. Dosimetría celular $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L

La dosis más alta de radiación absorbida se observó en la línea celular Mia PaCa-2 (3.025 Gy/Bq). Este resultado es congruente con los obtenidos en el estudio de viabilidad, ya que al comparar con la línea celular PANC-1, en Mía PaCa-2 se obtuvo una menor



proliferación (Figuras 14,15). La dosis de radiación absorbida del núcleo al citoplasma en la línea Mia Paca-2 (Tabla 5) se considera produjo la mayor muerte celular. Una vez más, se atribuye a la mayor sobreexpresión de los receptores CXCR4 en esta línea. El efecto de la radioterapia dirigida y la alta energía de las partículas beta liberadas a partir de  $^{177}\text{Lu}$  se evidenciaron fuertemente en el ensayo de viabilidad (Figura 9), con un  $59.0 \pm 0.7\%$  de células PANC-1 viables, y después de la exposición a  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  disminuyó hasta  $7.4 \pm 0.54\%$ . El sistema no dirigido  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$ , por el contrario, produjo una viabilidad superior al 60% para ambas líneas celulares, pero este resultado no fue significativo (Figura 14). Por segunda vez, este resultado confirma la especificidad del sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  para dirigir la radiación y el fármaco C19 en el sitio deseado.

**Tabla 5. Modelo biocinético y dosis de radiación absorbida producida por cada Bequerel (Bq) de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  del citoplasma al núcleo de las células Mia PaCa-2 y PANC-1.**

Línea celular	Modelo biocinético A(t)	$N = \int_{t=0}^{t=48h} A(t) dt$	Dosis (Gy/Bq)
Mia PaCa-2	$q(t) = 15.8e^{-7.8 \times 10^{-7}t} - 12.4e^{-0.941t}$ $A(t) = 15.8e^{-4.3 \times 10^{-3}t} - 12.4e^{-0.984t}$	5.602	3.025
PANC-1	$q(t) = 25.4e^{-0.425t} - 25.7e^{-0.971t} + 2.84e^{-0.527t}$ $A(t) = 25.4e^{-0.429t} - 25.7e^{-0.975t} + 2.84e^{-0.531t}$	0.382	0.552

#### 4.9. Ensayo clonogénico

Una vez que se comprobó el efecto de DOTA-DN(C19)-CXCR4L sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de páncreas, y debido a que KRAS tiene un efecto positivo sobre la proliferación celular, el mecanismo a través del cual C19 regula el crecimiento celular y con la finalidad de conocer la capacidad de las células cancerosas para replicarse después



del tratamiento con el sistema DOTA-DN(C19)-CXCR4L se realizó un ensayo clonogénico. Se observó para ambas líneas celulares, que no hubo diferencia significativa entre cada uno de los sistemas con radiación; sin embargo, si se observó diferencia al compararlo con  $^{177}\text{LuCl}_3$  libre, lo que confirma que el direccionamiento específico es más eficaz. Este resultado también se puede atribuir a la radiorresistencia proporcionada por la presencia del oncogén KRAS.

Comparando las líneas celulares Mia PaCa-2 y PANC-1, se observó un mayor impacto sobre la línea celular Mía PaCa-2 con una diferencia significativa en la viabilidad después del tratamiento con  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  ( $p \leq 0.05$ ) con un 39% y 48% (Figura 15) para Mia PaCa-2 y PANC-1, respectivamente. Este efecto se atribuyó a la mayor sobreexpresión del receptor CXCR4 y la dependencia de KRAS de las células Mia PaCa-2.

Una notable diferencia de viabilidad entre los nanosistemas con y sin radiación ( $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  y DOTA-DN(C19)-CXCR4L) fue observada en ambas líneas celulares, ya que en ambas hubo una disminución significativa cuando el sistema tenía  $^{177}\text{Lu}$  como componente (Figura 15). Por otra parte se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los nanosistemas por la presencia de C19; C19 libre (89%), C19 encapsulado (69%) y después del tratamiento con DOTA-DN(C19)-CXCR4L (55%), (Figura 15).

Para la línea celular PANC-1, se obtuvo una viabilidad del 95% con C19, 82% con DOTA-DN(C19) y 57% con DOTADN(C19)-CXCR4L lo que demostró la especificidad proporcionada por el ligando CXCR4L. Para ambas líneas celulares, fue posible observar un aumento en la viabilidad con el sistema DOTA-DN-CXCR4L, que se atribuyó a la presencia de CXCR4L como se ha reportado anteriormente [28]. El DOTA-DN no demostró tener efectos citotóxicos. Ambas líneas celulares tratadas con nanosistemas radiomarcados mostró una respuesta atribuida únicamente a la dosis de radiación administrada. Aunque la presencia de KRAS se ha reportado que favorece la supervivencia y la radiorresistencia, las vías de señalización a través de las cuales se logran estos efectos dependen de cada línea celular [29]. Además, el uso concomitante de inhibidores de la vía de señalización activados por KRAS en conjunto con la radiación demostró que producen un efecto de radiosensibilización.

Particularmente, en las células Mia PaCa-2 y PANC-1, se encontró que incluso en presencia de C19 (inhibidor de KRAS), no hubo diferencias entre el efecto de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  y  $^{177}\text{Lu-DN-CXCR4L}$ . Esta respuesta se explica a la baja concentración de C19 liberado hasta las 48 h (29% del contenido total en  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ ). Brunner y cols. han demostrado que en comparación con las células con mutaciones HRAS, muchas líneas celulares de cáncer de páncreas con mutaciones KRAS requieren dosis más altas de inhibidores [10]. Grana y cols. Reportaron un efecto similar en la línea celular RIE-1 en la que la inhibición completa de la actividad de MEK (vía de señalización activada por KRAS) mediante el uso de U0126 no indujo ningún cambio en supervivencia, incluso con el uso de radiaciones ionizantes [29].

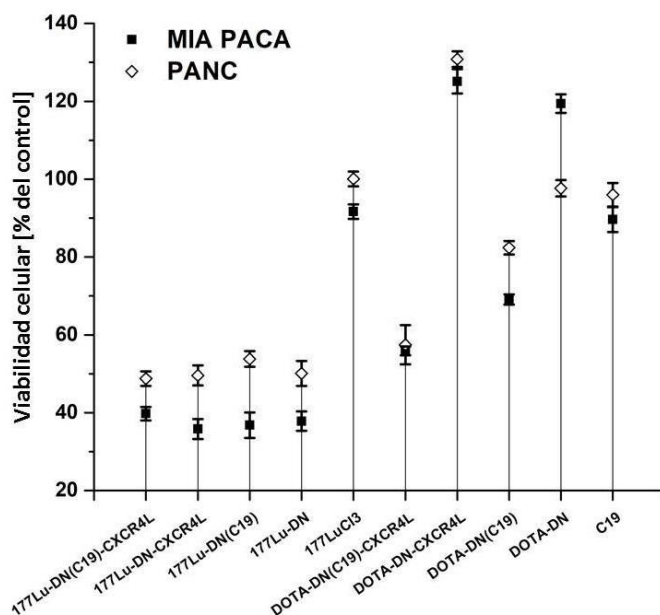


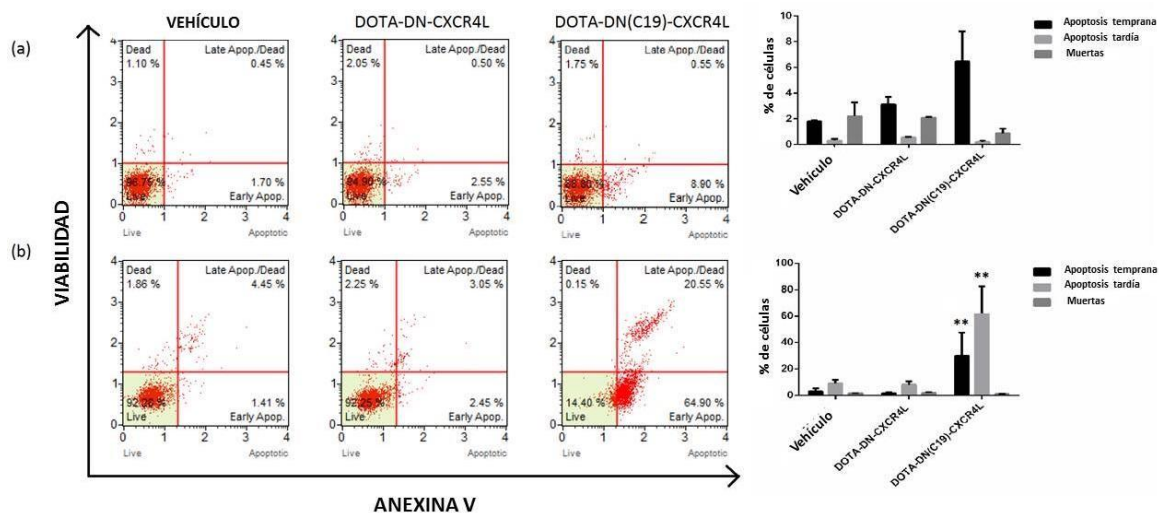
Figura 15. Ensayo clonogénico de las líneas celulares Mia PaCa-2 y PANC-1.

#### 4.10. Apoptosis

Los efectos citotóxicos y antiproliferativos observados después el tratamiento con DOTA-DN(C19)-CXCR4L hizo necesario investigar el tipo de muerte celular producida mediante citometría de flujo. Los resultados revelaron que el sistema DOTA-DN(C19)-CXCR4L promovió la apoptosis temprana (Anexina V + 7AAD-) en aproximadamente el 65% de las células Mia PaCa-2 dependientes de KRAS y del 20% de apoptosis tardía (Anexina V +

7AAD +) (Figura 16(a)). En comparación con las células de cáncer colorrectal dependiente de KRAS, C19 no encapsulado produjo un aumento del 28% de las células que ingresan a apoptosis tardía (Anexina V + 7AAD +), y solo el 1% ingresó apoptosis temprana (Anexina V + 7AAD-) [8]. Este resultado sugiere que el nanosistema DOTA-DN(C19)-CXCR4L fue más eficiente en dirigir el compuesto y aumentar su captación en las células cancerosas dado que se encuentra CXCR4 sobreexpresado con una mayor densidad de receptores en células de cáncer de páncreas Mia PaCa-2 [30].

Además, se ha comprobado que algunos agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados en el ámbito clínico, como el paclitaxel (PTX) en combinación con nanoformulaciones de PLGA (PPNP), promueven un aumento de la apoptosis temprana (12–15%) y apoptosis tardía (aproximadamente 5%) para PANC-1 células [31]. En nuestros resultados, en comparación con el sistema sin C19 (DOTA-DN-CXCR4L), celdas PANC-1, a pesar de ser identificado como KRAS-independiente, presentó un importante aumento de las células apoptóticas tempranas (6-8%) (anexina V +7AAD-) (Figura 16(b)).



**Figura 16. DOTA-DN(C19)-CXCR4L promueve apoptosis en las líneas celulares de a) Mia PaCa-2 y b) PANC-1. Análisis de Anexina V y 7ADD de células tratadas con el sistema cargado y sin cargar con C19 por 72 h. n=3; \*\*p < 0.001.**



## 5. DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer mejor caracterizados genéticamente; entre las muchas alteraciones que surgen durante la formación de tumores pancreáticos se encuentran la activación de oncogenes, principalmente dentro del gen KRAS con una prevalencia del 90% [32]. Se ha reportado que la sobreexpresión de KRAS o la presencia de KRAS mutado aumenta la radiorresistencia de los tumores por lo que el bloqueo de la actividad de KRAS mediante el uso de inhibidores farmacológicos aumenta la radiosensibilidad en ciertos contextos [29, 33].

En esta investigación, sintetizamos un nuevo nanosistema basado en el uso de terapia dirigida y radioterapia para producir un efecto sinérgico. El sistema demostró tener un tamaño en escala nanométrica con una distribución homogénea, con un diámetro promedio de 22.53 nm, que se determinó por TEM (Figura 8). El análisis de FT-IR mostró cambios significativos principalmente en la región de 3382 a 3247  $\text{cm}^{-1}$  (N – H), atribuido a las conjugaciones de las aminas en el superficie dendrímico con DOTA y CXCR4L, así como la aparición de la banda a 707  $\text{cm}^{-1}$  (-C-Cl), que confirmó la presencia del C19 y la correcta formación del sistema final (DOTA-DN(C19)-CXCR4L) (Figura 9(g)). Cambios en las longitudes de onda observado en UV-Vis se atribuyeron al aumento de insaturaciones y la presencia de átomos como O y N (Figura 10), estos corrimientos confirmaron la correcta formación del sistema. Finalmente y como parte de la caracterización de los sistemas se observaron cambios en los tiempos de retención en donde el sistema final DOTA-DN(C19)-CXCR4L tuvo un tiempo de retención de 10.8 min, lo que demuestra un carácter más hidrofílico justificado por la adición de grupos -COOH (DOTA y CXCR4L) y el encapsulamiento de C19.

El sistema tuvo una eficiencia de encapsulación de  $81.13 \pm 13.84\%$ , y el perfil de liberación demostró ser sensible a los cambios de pH, presentando una mayor liberación (36%) a pH 5.3 durante las primeras 4 h. Esta sensibilidad al pH es debido al porcentaje de protonación de las aminas presentes en la estructura del nanosistema (Figura 11) este resultado se correlaciona con lo reportado por otros autores en donde la liberación de fármacos a partir de sistemas dendriméricos de PAMAM tiene una sensibilidad al pH y tiende a ser más



rápida en ambientes ácidos [21, 34-37]. Además,  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  exhibió una captación específica en las líneas celulares pancreáticas Mia PaCa-2 y PANC-1, que sobreexpresan el receptor CXCR4 debido a la presencia de la molécula de reconocimiento específico CXCR4L. Al hacer la comparación entre las líneas celulares, se obtuvo una viabilidad de  $59.0 \pm 0.73\%$  para la línea de PANC-1, y de solo  $7.4 \pm 0.54\%$  en la línea celular Mia PaCa-2 demostrando un efecto más citotóxico. Esta respuesta se atribuyó a varios factores, primero, al analizar la cinética de captación e internalización en ambas líneas celulares (Figura 12), se observó que a las 2 h Mia PaCa-2 tiene el mayor porcentaje de captación ( $8.1 \pm 0.22\%$ ); a la tercer hora estos valores comienzan a disminuir ( $6.2 \pm 0.22\%$ ); sin embargo, en la línea celular PANC1, a partir de la segunda hora, la captación disminuye (2 h, absorción  $4.8 \pm 0.18\%$  y 3 h, absorción  $4.9 \pm 0.22\%$ ), y este hallazgo explica que una mayor cantidad de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  está dentro de la línea celular Mia PaCa-2. Además, en el perfil de liberación (Figura 6), se observó que en las primeras 4 h, hay un mayor porcentaje de liberación de C19, y por lo tanto se espera que haya una alta concentración local de C19, principalmente en la línea celular Mia PaCa-2.

Otro factor a considerar es la dependencia a KRAS de las líneas celulares. Mia PaCa-2 es dependiente de KRAS y por lo tanto, es más susceptible al daño causado por C19. Además, si bien la presencia de KRAS promueve radiorresistencia en las células, el uso concomitante de radiación e inhibidores de las vías de señalización activadas por KRAS se ha demostrado que tiene un efecto de radiosensibilización. El efecto sinérgico de la radiación y la presencia de C19 se demostró en ambas líneas celulares ya que al comparar el sistema DOTA-DN(C19)-CXCR4L (que no contiene  $^{177}\text{Lu}$ ) o  $^{177}\text{Lu-DN-CXCR4L}$  (que no contiene C19) con el sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  este último fue más citotóxico. En el ensayo clonogénico se demostró el efecto de la dependencia de KRAS, ya que este promueve la proliferación a través de la activación de diferentes vías de señalización y  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  disminuyó la proliferación de ambas líneas celulares con una viabilidad del 39 y 48% para las células Mia PaCa-2 y para las células PANC-1, respectivamente (Figura 13).





El análisis de dosimetría celular confirmó que en comparación con el sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)}$  no dirigido (viabilidad celular superior al 60%),  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  produjo la muerte celular más alta, lo que demuestra la importancia del direccionamiento a través de la molécula CXCR4L para la liberación de la radiación beta y el fármaco C19. En las células Mia PaCa-2 se recibió una dosis de 3.02 Gy/Bq (5 veces más que la de células PANC-1) y disminuyó la viabilidad celular hasta  $7.4 \pm 0.54\%$ , mientras que una dosis de 0.552 Gy/Bq para PANC-1 mostró viabilidad de  $59.0 \pm 0.73\%$ . Estos resultados se atribuyen a la mayor densidad de receptores CXCR4 y la liberación controlada de C19 en las células Mia PaCa-2.

Dado que la inhibición de los mecanismos de apoptosis por parte de las células que contienen el oncogén KRAS es una de las consecuencias más importantes y es el desafío más fuerte a nivel terapéutico, era importante demostrar como el sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  es capaz de promover apoptosis en ambas líneas celulares; los resultados demostraron nuevamente la misma tendencia, con un mayor nivel de apoptosis para la línea celular Mia PaCa-2 (dependiente de KRAS) en comparación con la línea PANC-1 (independiente de KRAS).





## 6. CONCLUSIÓN

Se sintetizó y evaluó el nuevo sistema  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$ , combinando quimioterapia específica proporcionada por la presencia de C19 y radioterapia dirigida proporcionada por  $^{177}\text{Lu}$ . El nanoradiofarmacéutico mostró tener un efecto sinérgico capaz de reducir la viabilidad en las líneas celulares Mia PaCa-2 y PANC-1 a través de mecanismos apoptóticos. Además, el nanosistema mostró una captación específica proporcionada por el péptido de direccionamiento CXCR4L. La evaluación in vivo de  $^{177}\text{Lu-DN(C19)-CXCR4L}$  en un modelo de tumor pancreático es necesaria para evaluar el comportamiento nanoradiofarmacéutico. Además, será fundamental explorar el propiedades antitumorales in vivo de  $^{177}\text{Lu-DN-(C19)-CXCR4L}$  como potencial nanoradiofármaco para ser candidato en el tratamiento del cáncer de páncreas.



## REFERENCIAS

1. Schneider BJ, Ben-Josef E, McGinn CJ, Chang AE, Colletti LM, Normolle DP, et al. Capecitabine and radiation therapy preceded and followed by combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics* [Internet]. 2005 Dec;63(5):1325–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301605007583>
2. Gibbens-Bandala B, Morales-Avila E, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Luna-Gutiérrez M, Ramírez-Nava G, et al. Synthesis and evaluation of <sup>177</sup>Lu-DOTA-DN(PTX)-BN for selective and concomitant radio and drug-therapeutic effect on breast cancer cells. *Polymers*. 2019;11(10).
3. Mendoza-Nava H, Ferro-Flores G, Ramírez FDM, Ocampo-García B, Santos-Cuevas C, Aranda-Lara L, et al. <sup>177</sup>Lu-Dendrimer Conjugated to Folate and Bombesin with Gold Nanoparticles in the Dendritic Cavity: A Potential Theranostic Radiopharmaceutical. *Journal of Nanomaterials*. 2016;2016.
4. Carvalho MR, Reis RL, Oliveira JM. Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(6):1128–38.
5. Singh S, Srivastava SK, Bhardwaj A, Owen LB, Singh AP. CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: A novel target for therapy. *British Journal of Cancer*. 2010;103(11):1671–9.
6. Aghevlian S, Cai Z, Lu Y, Hedley DW, Winnik MA, Reilly RM. Radioimmunotherapy of PANC-1 Human Pancreatic Cancer Xenografts in NRG Mice with Panitumumab Modified with Metal-Chelating Polymers Complexed to <sup>177</sup>Lu. *Molecular Pharmaceutics*. 2019;16(2):768–78.
7. Wu H, Xiao J-Q, Xiao S, Cheng Y. KRAS: A Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2019;19(23):2081–97.



8. Cruz-Nova P, Schnoor M, Correa-Basurto J, Bello M, Briseño-Díaz P, Rojo-Domínguez A, et al. The small organic molecule C19 binds and strengthens the KRAS4b-PDE $\delta$  complex and inhibits growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. BMC Cancer. 2018;18(1):1–13.
9. Casique-Aguirre D, Briseño-Díaz P, García-Gutiérrez P, la Rosa CHG, Quintero-Barceinas RS, Rojo-Domínguez A, et al. KRas4B-PDE6 $\delta$  complex stabilization by small molecules obtained by virtual screening affects Ras signaling in pancreatic cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):1–16.
10. Brunner TB, Cengel KA, Hahn SM, Wu J, Fraker DL, McKenna WG, et al. Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: The role of K-ras. Cancer Research. 2005;65(18):8433–41.
11. Parus J, Pawlak D, Mikolajczak R, Duatti A. Chemistry and bifunctional chelating agents for binding <sup>177</sup>Lu. Current Radiopharmaceuticals. 2015;8(2):86–94.
12. Jeon J. Review of Therapeutic Applications of Radiolabeled Functional Nanomaterials. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(9).
13. Kovacs L, Tassano M, Cabrera M, Zamboni CB, Anjos RM, Cabral P. Development of <sup>177</sup>Lu-DOTA-Dendrimer and Determination of Its Effect on Metal and Ion Levels in Tumor Tissue. 2015;30(10):405–9.
14. Bhadra D, Bhadra S, Jain S, Jain NK. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. International Journal of Pharmaceutics. 2003;257(1–2):111–24.
15. Liao H, Liu H, Li Y, Zhang M, Tom??s H, Shen M, et al. Antitumor efficacy of doxorubicin encapsulated within PEGylated poly(amidoamine) dendrimers. Journal of Applied Polymer Science. 2014;131(11):1–10.
16. Zong H, Thomas TP, Lee KH, Desai AM, Li MH, Kotlyar A, et al. Bifunctional PAMAM dendrimer conjugates of folic acid and methotrexate with defined ratio. Biomacromolecules. 2012;13(4):982–91.



17. Ren Y, Kang CS, Yuan XB, Zhou X, Xu P, Han L, et al. Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010;21(3):303–14.
18. Kurtoglu YE, Mishra MK, Kannan S, Kannan RM. Drug release characteristics of PAMAM dendrimer-drug conjugates with different linkers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;384(1–2):189–94.
19. Liu C, Duan H, Zhao Z, Li W, Ma L, Fang X, et al. Improving the inhibitory effect of CXCR4 peptide antagonist in tumor metastasis with an acetylated PAMAM dendrimer. *RSC Advances*. 2018;8(70):39948–56.
20. Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C. Similar but different: Distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*. 2015;6(25):20785–800.
21. Cells A, Song SY, Meszoely IM, Coffey RJ, Pietenpol JA, Leach SD. K-Ras-Independent Effects of the Farnesyl Transferase Inhibitor L-744 , 832 on Cyclin B1 / Cdc2 Kinase Activity , G2 / M Cell Cycle Progression and Apoptosis in Human Pancreatic Ductal. 2000;2(3).
22. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, et al. Small molecule inhibition of the KRAS-PDE $\delta$  interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*. 2013;497(7451):638–42.
23. Kim Y, Brechbiel MW. An overview of targeted alpha therapy. *Tumor biology*. 2012;33(3):573–90.
24. Ferrier MG, Radchenko V, Wilbur DS. Radiochemical aspects of alpha emitting radionuclides for medical application. *Radiochimica Acta*. 2019;107:1065–85.
25. Kratochwil C, Schmidt K, Afshar-romieh A, Bruchertseifer F, Rathke H, Morgenstern A, et al. Targeted alpha therapy of mCRPC : Dosimetry estimate of  $^{213}\text{Bi}$ -PSMA-617. 2018;31–7.



26. Holzwarth U, Jimenez IO, Calzolari L. A random walk approach to estimate the confinement of  $\alpha$ -particle emitters in nanoparticles for targeted radionuclide therapy. *EJNMMI radiopharmacy and chemistry*. 2018;3(1):1-26.
27. Pallares RM, Abergel RJ. Nanoparticles for targeted cancer radiotherapy. 2020;13(11):2887–97.
28. Kozempel J, Mokhodoeva O, Vlk M. Progress in targeted alpha-particle therapy. What we learned about recoils release from in vivo generators. *Molecules*. 2018;23(3).
29. Kerlin MGF, Radchenko V. An Appendix of Radionuclides Used in Targeted Alpha Therapy. *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences [Internet]*. 2019;50(4):S58–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2019.06.051>
30. Verhoeven M, Seimbille Y, Dalm SU. Therapeutic applications of pretargeting. *Pharmaceutics*. 2019;11(9).
31. McDevitt MR, Sgouros G, Sofou S. Targeted and Nontargeted  $\alpha$ -Particle Therapies. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2018;20(January):73–93.
32. Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical Reviews*. 2015;115(8):2934–74.
33. Ma S, Li Q, Pan F. CXCR4 promotes GSK3  $\beta$  expression in pancreatic cancer cells via the Akt pathway. 2014;0–5.
34. Heinrich EL, Lee W, Lu J, Lowy AM, Kim J. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):1–9.
35. Krieg A, Riemer JC, Telan LA, Gabbert HE, Knoefel WT. CXCR4-a prognostic and clinicopathological biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(6):1–17.



36. Demoin DW, Shindo M, Zhang H, Edwards KJ, Serganova I, Pillarsetty NVK, et al. Synthesis and evaluation of an 18F-labeled pyrimidine-pyridine amine for targeting CXCR4 receptors in gliomas. *Nuclear Medicine and Biology* [Internet]. 2016;43(10):606–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.05.005>
37. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. 2010;497–505.
38. Chittasupho C, Anuchapreeda S, Sarisuta N. CXCR4 targeted dendrimer for anti-cancer drug delivery and breast cancer cell migration inhibition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. 2017;119:310–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.07.003>
39. Shen B, Zheng MQ, Lu JW, Jiang Q, Wang TH, Huang XE. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(9):5403–8.
40. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006;107(5):1761–7.



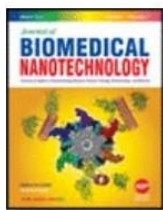
Anexos.

Anexo 1. Productividad asociada.

Trujillo-Nolasco M, Cruz-Nova P, Ferro-Flores G, Gibbens-Bandala B, Morales-Avila E, Aranda-Lara L, Vargas M, Ocampo-García B. Development of  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4 Ligand Nanosystem for Combinatorial Therapy in Pancreatic Cancer. *J Biomed Nanotechnol.* 2021 Feb 28;17(2):263-278. doi: 10.1166/jbn.2021.3016. PMID: 33785097.

<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2021/00000017/00000002/art00009>

Home / Journal of Biomedical Nanotechnology, Volume 17, Number 2



## Development of $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4 Ligand Nanosystem for Combinatorial Therapy in Pancreatic Cancer

**Authors:** Trujillo-Nolasco, Maydelid <sup>1</sup>; Cruz-Nova, Pedro <sup>1</sup>; Ferro-Flores, Guillermina <sup>1</sup>; Gibbens-Bandala, Brenda <sup>1</sup>; Morales-Avila, Enrique <sup>2</sup>; Aranda-Lara, Liliana <sup>3</sup>; Vargas, Miguel <sup>4</sup>; Ocampo-García, Blanca <sup>1</sup>;

**Source:** *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Volume 17, Number 2, February 2021, pp. 263-278(16)

**Publisher:** American Scientific Publishers

**DOI:** <https://doi.org/10.1166/jbn.2021.3016>





## Development of $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4 Ligand Nanosystem for Combinatorial Therapy in Pancreatic Cancer

Maydelid Trujillo-Nolasco<sup>1,2</sup>, Pedro Cruz-Nova<sup>1,3</sup>, Guillermina Ferro-Flores<sup>1</sup>, Brenda Gibbens-Bandala<sup>1,2</sup>, Enrique Morales-Avila<sup>2</sup>, Liliana Aranda-Lara<sup>4</sup>, Miguel Vargas<sup>3</sup>, and Blanca Ocampo-García<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, Ocoyoacac, Estado de México, 52750, Mexico

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, Toluca, Estado de México, 50180, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. I.P.N., 07360, Ciudad de México

<sup>4</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180 Estado de México, Mexico

Pancreatic cancer is highly lethal and has a poor prognosis. The most common alteration during the formation of pancreatic tumors is the activation of KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) oncogene. As a new therapeutic strategy, the C19 molecule ((2S)-N-(2,5-dichlorophenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)-methylamine]propanamide) blocks the KRAS-membrane association in cancer cells. In addition, the chemokine receptor CXCR4 is overexpressed in pancreatic cancer. In this research, a new dendrimer-based nanoradiopharmaceutical ( $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L) encapsulating C19 and functionalized to target CXCR4 receptors is proposed as both, a targeted radiotherapy system (lutetium-177) and an oncotherapeutic approach by the stabilization of KRAS4b-PDE $\delta$  complex to produce dual-specific therapy in pancreatic cancer. The  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L was synthesized and characterized, C19 was encapsulated with 81% efficiency, the final nanosystem rendered a particle size of 67 nm and the specific uptake in pancreatic cell lines was demonstrated. The major cytotoxic effect was observed in the KRAS-dependent and radioresistant cell line Mia PaCa-2, which expresses a high density of CXCR4 receptors. The radiation dose of 3 Gy/Bq decreased viability to 7%, and this effect was attributed to the presence of C19. A synergistic effect (radio and chemotherapy) capable of reducing viability in pancreatic cancer cells through apoptotic mechanisms was demonstrated. Thus,  $^{177}\text{Lu}$ -DN(C19)-CXCR4L nanoradiopharmaceutical is efficacious in pancreatic cancer cell lines overexpressing the CXCR4 receptor.

**KEYWORDS:** Dendrimers, Targeted Radiotherapy, KRAS4b-PDE $\delta$  Blockage, C19, Lutetium-177.

### INTRODUCTION

The polymeric nanoparticles currently used in drug delivery have shown important theranostic potential. Targeted delivery approaches represent a promising strategy to reach specific targets and to produce more than one damage mechanism, resulting in increased therapeutic effect [1–3]. Particularly, targeted polymeric nanoparticles in cancer have been demonstrated to produce a synergistic effect when chemotherapy and radiotherapy are used on a

selected target while reducing cytotoxicity on peripheral healthy tissues [1].

Several kinds of moieties have been employed to allow nanoparticles to reach the desired tumoral target by possessing “multitask” properties and improving the selectivity and effectivity of the treatment. Moreover, numerous reports have documented the suitability of nanoparticles to transport and for delivery of genes, proteins, or small molecules to treat cancer. Targeted drug delivery has proven to be an effective approach in this regard. However, the clinical applications of nanoparticles remain limited [4].

To target tumoral cells, membrane markers have been widely studied. Particularly, the chemokine receptor CXCR4 and its primary heterodimeric ligand CXCL12

\*Author to whom correspondence should be addressed.

Email: blanca.ocampo@inin.gob.mx

Received: 22 December 2020

Accepted: 24 December 2020





Trujillo-Nolasco M, Morales-Avila E, Cruz-Nova P, Katti KV, Ocampo-García B. Nanoradiopharmaceuticals Based on Alpha Emitters: Recent Developments for Medical Applications. *Pharmaceutics*. 2021 Jul 23;13(8):1123. doi: 10.3390/pharmaceutics13081123. PMID: 34452084; PMCID: PMC8398190.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8398190/>

Journal List > Pharmaceutics > v.13(8); 2021 Aug > PMC8398190



*Pharmaceutics*. 2021 Aug; 13(8): 1123.

PMCID: PMC8398190

Published online 2021 Jul 23. doi: [10.3390/pharmaceutics13081123](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081123)

PMID: [34452084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34452084/)

## Nanoradiopharmaceuticals Based on Alpha Emitters: Recent Developments for Medical Applications

[Maydelid Trujillo-Nolasco](#),<sup>1,2</sup> [Enrique Morales-Avila](#),<sup>2</sup> [Pedro Cruz-Nova](#),<sup>1</sup> [Kattesh V. Katti](#),<sup>3</sup> and [Blanca Ocampo-García](#)<sup>1,\*</sup>

Edésia Martins Barros De Sousa, Academic Editor and Carolina de Aguiar Ferreira, Academic Editor

Pharmaceutics



Review

# Nanoradiopharmaceuticals Based on Alpha Emitters: Recent Developments for Medical Applications

Maydelid Trujillo-Nolasco<sup>1,2</sup>, Enrique Morales-Avila<sup>2</sup> , Pedro Cruz-Nova<sup>1</sup>, Kattesh V. Katti<sup>3</sup> and Blanca Ocampo-García<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca S/N, Ocoyoacac 52750, Mexico; mayis421@gmail.com (M.T.-N.); pedro.nova1990@gmail.com (P.C.-N.)

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan S/N, Toluca 50120, Mexico; emoralesav@uaemex.mx

<sup>3</sup> Department of Radiology, Institute of Green Nanotechnology, University of Missouri, Columbia, MO 65212, USA; KattiK@health.missouri.edu

\* Correspondence: blanca.ocampo@inin.gob.mx



**Citation:** Trujillo-Nolasco, M.; Morales-Avila, E.; Cruz-Nova, P.; Katti, K.V.; Ocampo-García, B. Nanoradiopharmaceuticals Based on Alpha Emitters: Recent Developments for Medical Applications. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1123. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081123>

Academic Editors: Edésia Martins Barros De Sousa and Carolina de Aguiar Ferreira

Received: 7 June 2021  
Accepted: 29 June 2021  
Published: 23 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The application of nanotechnology in nuclear medicine offers attractive therapeutic opportunities for the treatment of various diseases, including cancer. Indeed, nanoparticles-conjugated targeted alpha-particle therapy (TAT) would be ideal for localized cell killing due to high linear energy transfer and short ranges of alpha emitters. New approaches in radiolabeling are necessary because chemical radiolabeling techniques are rendered sub-optimal due to the presence of recoil energy generated by alpha decay, which causes chemical bonds to break. This review attempts to cover, in a concise fashion, various aspects of physics, radiobiology, and production of alpha emitters, as well as highlight the main problems they present, with possible new approaches to mitigate those problems. Special emphasis is placed on the strategies proposed for managing recoil energy. We will also provide an account of the recent studies in vitro and in vivo preclinical investigations of  $\alpha$ -particle therapy delivered by various nanosystems from different materials, including inorganic nanoparticles, liposomes, and polymersomes, and some carbon-based systems are also summarized.

**Keywords:** targeted alpha-particle therapy (TAT); recoil energy; nanoparticles

## 1. Introduction

Interest in theranostics and targeted therapies has fueled the advancement of new developments for beta and alpha radiation therapy in both the academic medical community and within the pharmaceutical industry. There has been significant recent interest in alpha particles due to their high cytotoxic potential that can be used effectively in cancer therapy. Targeted alpha-particle therapy (TAT) involves the irradiation of cancer cells, micrometastases, or tumors by emitting a single alpha particle or by a cascade of alpha particles within its vicinity.

Alpha particles ( $^4\text{He}^{2+}$ ) are potent therapeutic effectors that have two advantages over beta therapies. First, the high linear energy (LET) of an alpha particle is two or three orders of magnitude greater than the LET of beta particles (100 keV/ $\mu\text{m}$  vs. 0.2 keV/ $\mu\text{m}$ ). This unique characteristic of alpha particles allows a larger fraction of the total energy to be deposited in the cells, thus increasing therapeutic effectiveness. In sharp contrast, for the application of beta radiation, which has limited linear energy transfer, the cell must be hit by many thousands of beta particles before it is successfully killed [1–5]. In addition, the short-range of alpha radiation in human tissue of 50 to 100  $\mu\text{m}$  (2–3 cell diameters), due to the high LET, compared to that of  $\beta$  particles (maximum ranges of 2 to 11 mm), allows the effective killing of targeted cancer cells due to the highly cytotoxic radiation, while limiting damage to surrounding healthy tissue. Therefore, targeted nanomedicine advances in