



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Universidad de la República – Facultad de Ciencias

Centro de Investigaciones Nucleares

Área Radiofarmacia

“Marcación del aptámero sgc8-c con ^{67}Ga para su evaluación como agente de imagen molecular en cáncer”

TESINA DE GRADUACIÓN

Bach. Jessica Báez

Tutores: Dra. Lic. Victoria Calzada, Dr. QF. Manuel Ibarra

Presentada ante CCDBQ el día 05/02/18

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 CÁNCER.....	4
2.2 IMAGENOLOGÍA MOLECULAR.....	5
2.3 AGENTES DE IMAGEN.....	7
2.4 QUÍMICA DEL ⁶⁷ Ga Y SUS USOS.....	9
2.5 APTÁMEROS.....	12
2.6 Sgc8-c.....	13
2.7 PTK7.....	15
2.8 NANOVEHICULIZACIÓN.....	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 CONJUGACIÓN.....	22
4.2 OPTIMIZACIÓN.....	23
4.3 SEGUIMIENTO DE REACCIÓN.....	23
4.4. ESCALADO.....	24
4.5 PURIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO.....	24
4.6 ALMACENAMIENTO.....	24
4.7 ELECTROFORESIS.....	25
4.8 ENSAYO DE ESTABILIDAD DEL CONJUGADO.....	25
4.9 ENSAYO FRENTE A DNASA I.....	26
4.10 RADIOMARCACIÓN.....	26
4.11 FARMACOCINÉTICA.....	26

4.12 VEHICULIZACIÓN	27
5. RESULTADOS	30
5.1 CONJUGACIÓN.....	31
5.2 OPTIMIZACIÓN	31
5.3 SEGUIMIENTO DE REACCIÓN	32
5.4 ESCALADO.....	33
5.5 PURIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO.....	34
5.6 ALMACENAMIENTO	36
5.7 ELECTROFORESIS	37
5.8 ENSAYO DE ESTABILIDAD DEL CONJUGADO	38
5.9 ENSAYO FRENTE A DNASA I	38
5.10 RADIOMARCACIÓN.....	39
5.11 FARMACOCINÉTICA	41
5.12 VEHICULIZACIÓN	42
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	55
9. AGRADECIMIENTOS	66
10. ANEXO.....	68

1. RESUMEN

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla (ADN o ARN) que tienen la característica de reconocer su diana con alta afinidad y especificidad. Tienen propiedades de reconocimiento equiparables a las de los anticuerpos; sin embargo, por la naturaleza de su composición no proteica tienen ventajas significativas en cuanto a su tamaño, producción y modificaciones químicas.

Los aptámeros son muy utilizados en aplicaciones bioquímicas. Sin embargo, en los últimos años su uso se ha expandido a aplicaciones clínicas, entre las cuales se encuentra la imagenología molecular. Utilizando un aptámero como agente de reconocimiento molecular e incorporando una sonda de imagen, es posible visualizar características moleculares en forma no invasiva.

Sgc8-c es un aptámero que posee 41 nucleótidos. Dicho aptámero ha sido extensamente caracterizado y su diana, el receptor de membrana Proteína tirosin quinasa 7 (PTK7), resulta ser un blanco molecular muy interesante en cáncer.

En el presente trabajo, se realizó la obtención y caracterización del aptámero Sgc8-c-DOTA-⁶⁷Ga para su potencial uso como agente de imagenología molecular en cáncer. Para ello, el aptámero Sgc8-c fue modificado en su extremo 5' para incorporar el quelante bifuncional DOTA y con el fin de marcarlo con Galio-67. Al conjugado se le realizaron distintos ensayos fisicoquímicos y de estabilidad en diferentes condiciones.

Se evaluaron condiciones de reacción, purificación, y características fisicoquímicas. Finalmente se analizaron sus parámetros farmacocinéticos y se evaluó su nanovehiculización con el objetivo de evaluar una mejora en dicho perfil.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER

Actualmente el cáncer constituye la principal causa de mortalidad a nivel mundial. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos, y en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones en todo el mundo. Casi una de cada seis muertes en el mundo se debe a esta enfermedad [1].

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas, de etiología multifactorial, con factores genéticos, ambientales, y de estilo de vida que interactúan para producir una malignidad dada [2].

Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, mediante un mecanismo conocido como apoptosis.

Sin embargo, el cáncer surge de una pérdida de control de crecimiento normal de las células. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se denominan tumores (figura 1).

El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. En todos los tipos, se pierde la capacidad de las células de someterse al suicidio celular o apoptosis.

En cáncer los tumores malignos, se pueden extender a tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, las células tumorales también se pueden propagar a distintas partes del cuerpo, proceso denominado metástasis. Existen también tumores benignos, pero estos no tienen la capacidad de invadir tejidos cercanos ni propagarse por el organismo [3,4].

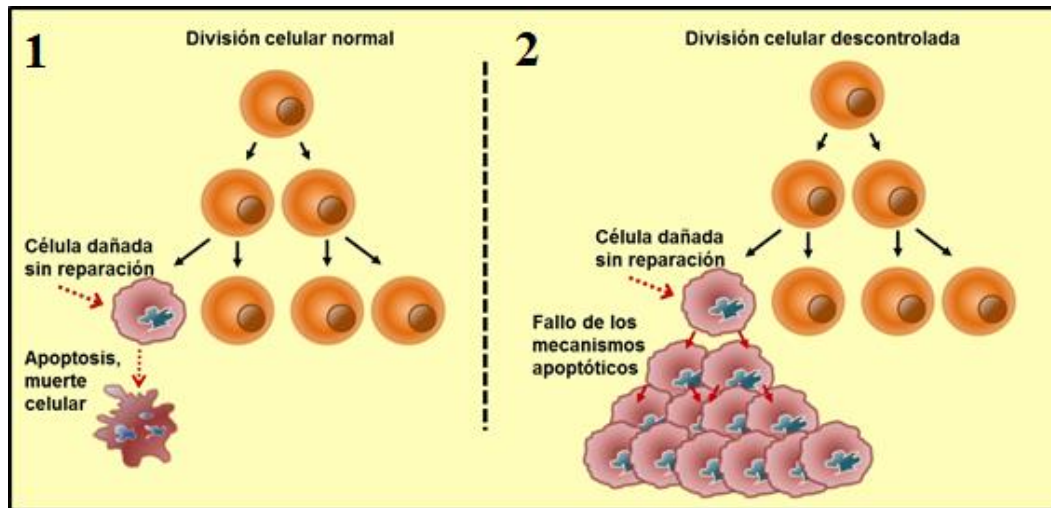


Figura 1. Crecimiento celular en células normales (1) y en cáncer (2). (Imagen tomada de <http://webs.ucm.es/info/quiminorgen/cancer2.html>)

Al cáncer no se le atribuye una causa en particular sino que es multifactorial, es decir que puede ser producto de la interacción de muchos factores.

Existen factores propios de cada persona, como la edad, mutaciones heredadas, hormonas, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo. También factores externos, que tienen lugar a lo largo de la vida de la persona, como el tabaquismo, exposición a agentes infecciosos como virus, exposición a diferentes tipos y fuentes de radiación, una mala alimentación. Estos factores pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer [4,5]

2.2 IMAGENOLOGÍA MOLECULAR

Tradicionalmente, el cáncer ha sido diagnosticado en base a los cambios en el tamaño, ubicación o morfología.

Estas características son difíciles de utilizar para llevar a cabo diagnóstico temprano del cáncer ya que son indicadores tardíos de la enfermedad, es decir, que se manifiestan cuando la enfermedad ya está en curso. Por la misma razón, son difíciles de utilizar para evaluar alteraciones moleculares complejas provocadas por la enfermedad.

Las biopsias, también usadas tradicionalmente proporcionan la información más detallada sobre la patología, pero el monitoreo con biopsias es poco práctico.

Además, las biopsias están sujetas a error de muestreo ya que la carga tumoral entera no puede ser evaluada y a la heterogeneidad de la muestra.

El diagnóstico de cáncer basado en características moleculares puede ser altamente específico y extremadamente sensible cuando se incorpora con mecanismos adecuados de transducción y amplificación de señales. Impulsado por los avances en la biología molecular y la tecnología de imagen, la imagenología molecular ha crecido rápidamente en los últimos años [6,7].

La imagenología molecular es una técnica de imagenología médica que combina biología molecular, química, ciencia, medicina de radiación y ciencias de la computación. Consta de la visualización, la caracterización y la medición *in vivo* de los procesos biológicos a nivel celular o molecular. Implica la visualización no invasiva y la detección cuantitativa de biomoléculas presentes en el organismo mediante sondas específicas para cada objetivo [8, 9, 10]. La visualización no invasiva de características moleculares a través de imágenes permite la evaluación de la patología lo cual es clave para entender la progresión del tumor sin alterar el entorno biológico [11]. La formación de imágenes moleculares proporciona información adicional a la obtenida por métodos de diagnóstico convencionales. La imagen molecular puede proporcionar la lectura de todo el cuerpo en un sistema intacto, que es mucho más relevante y fiable que los estudios *in vitro* o *ex vivo* [12]. Los sistemas de imagen pueden agruparse mediante la energía utilizada para obtener información visual (rayos X, positrones, fotones u ondas sonoras), la resolución espacial alcanzada (macroscópica, mesoscópica o microscópica) o el tipo de información obtenida (anatómica, fisiológica, celular o molecular). Los sistemas de imagen convencionales como la tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (MRI) y ultrasonido, proporcionan información anatómica y fisiológica que dependen de los cambios anatómicos asociados con la enfermedad dados en etapas con cierto grado de avance de la patología. Por el contrario, están los sistemas que obtienen información molecular y funcional de la enfermedad y que permiten realizar un seguimiento de los procesos bioquímicos *in vivo*. Estos últimos incluyen la tomografía de positrones (PET), la tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), la tomografía mediada por fluorescencia (FMT), imágenes de bioluminiscencia, entre otros [13].

2.3 AGENTES DE IMAGEN

Los agentes o sondas de imagen molecular son compuestos utilizados para visualizar, caracterizar y cuantificar los procesos biológicos en sistemas vivos [14]. Estos agentes tienen una larga lista de nombres alternativos, incluyendo sondas, sondas de imagen, agentes, faros moleculares, espías moleculares, productos farmacéuticos de radio, marcadores, radioligandos, sondas radiomarcadas y radiofármacos. Los cinco últimos términos se utilizan para describir agentes que han sido marcados con un radioisótopo [15].

Los agentes de imagen tradicionalmente se han tratado como una clase especial de fármacos. Los fármacos convencionales están diseñados y desarrollados para intervenir y alterar los procesos biológicos de las enfermedades, y al mismo tiempo mostrar una toxicidad mínima en los tejidos normales. A diferencia de estos, las sondas de imágenes moleculares no presentan efecto farmacológico. Están diseñadas para detectar las enfermedades de forma no invasiva y reflejar la información bioquímica de las enfermedades en el formato de las imágenes y, por lo tanto, proporcionar a los profesionales, medios para identificar y comprender mejor las enfermedades [12].

Entre las características deseables de un agente de imagen encontramos: buena relación de unión específica/no específica, alta afinidad para el blanco molecular, una farmacocinética adecuada, excelente estabilidad in vivo (el metabolismo no debe afectar negativamente a la función), buen perfil de seguridad (falta de toxicidad para el sujeto), potencial de traducción clínica, síntesis de tiempo y costo efectivo [16], capacidad de las sondas para superar las barreras biológicas de suministro (vascular, intersticial, membrana celular).

Por ello, el agente de imagenología consta, en general, de dos segmentos diferentes: un agente de reconocimiento y un generador de imagen [17] (figura 2).

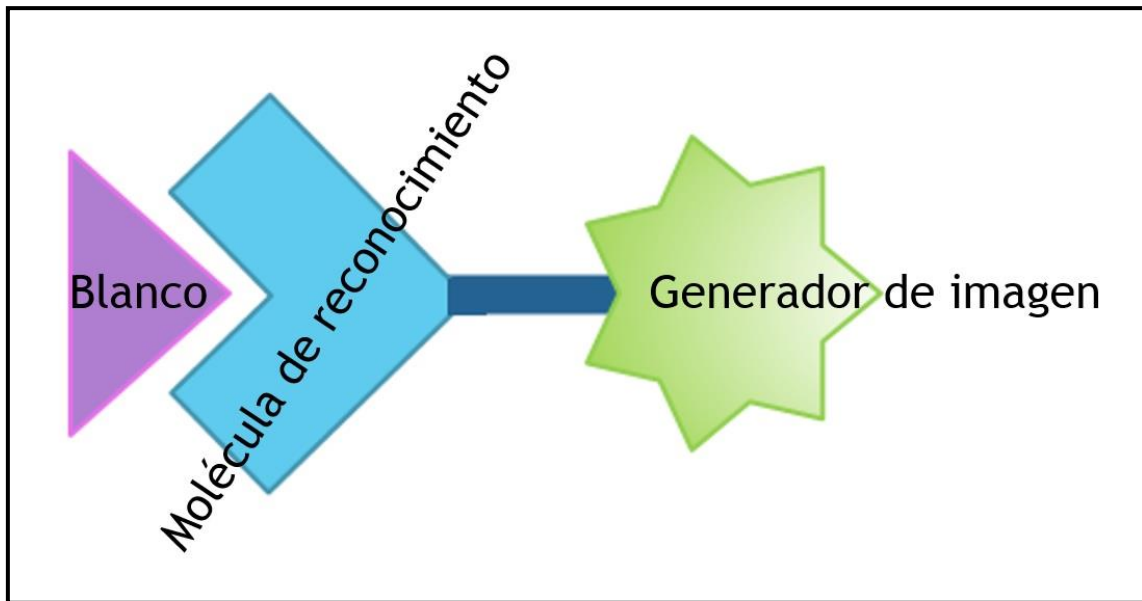


Figura 2. Estructura de un agente de imagen

El componente reconocimiento se trata de una molécula biológicamente activa que reconoce un blanco específico. Dentro de estas moléculas encontramos moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos de alto peso molecular, fragmentos de proteínas manipulados y diversas nanopartículas.

El segmento generador de la imagen permite su detección externa y la valoración del proceso en forma cuali- o cuantitativa.

Entre los posibles generadores de imagen se encuentran los fluoróforos, radionucleidos emisores de positrones o gamma convencionales, entre otros.

Un aspecto fundamental en el diseño es que la incorporación de estructuras foráneas como átomos radiactivos o fluoróforos a moléculas biológicamente activas puede afectar enormemente sus propiedades. Esto puede evitarse tras la incorporación de un espaciador (denominado también conector o enlazador) entre ambas partes, que actúa minimizando interacciones [18]. La utilización del espaciador, puede modificar las propiedades farmacocinéticas teniendo un profundo impacto en la biodistribución del agente de imagen. El espaciador puede ser una cadena hidrocarbonada simple para aumentar la lipofilicidad, una secuencia peptídica (tal como poliglicina, poliserina o ácido poliaspártico) para

mejorar la hidrofiliidad y la depuración renal, o un enlazador de polietilenglicol (PEG) para incrementar la circulación sanguínea [19].

2.4 QUÍMICA DEL ^{67}Ga Y SUS USOS

El galio-67 es un radioisótopo metálico adecuado para su uso en SPECT [20] y gammagrafía [21, 22] con propiedades radiofísicas deseables. Se produce en ciclotrón a partir de zinc-68. El ^{67}Ga decae por captura electrónica a ^{67}Zn estable con un período de semidesintegración de 3,26 días (figura 3) y está comercialmente disponible en su forma de Citrato o Cloruro de Galio. El periodo de semidesintegración del ^{67}Ga hace factible distribuir la dosis luego de la producción [23]. En su decaimiento se emiten varios fotones gamma que se utilizan para la obtención de imágenes gamma. Las principales son 93 keV con 37% de abundancia, 185 keV con 20% de abundancia, 300 keV con 17% de abundancia y 394 keV con 5% de abundancia [24].

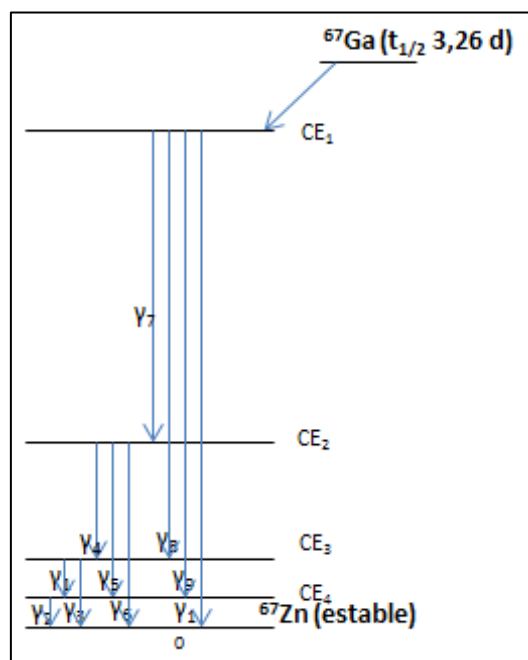


Figura 3. Diagrama de decaimiento del radioisótopo ^{67}Ga

El primer uso del ^{67}Ga en la localización de tumores fue informado por Edwards y Hayes en 1969 [25]. Es así que desde la década de 1970, el ^{67}Ga , en la forma de citrato, se ha utilizado para imágenes de tumores e infecciones, técnica que

ha avanzado mucho hasta la actualidad [26]. La imagen gamma con ^{67}Ga se ha utilizado regularmente en la clínica desde la década de 1980 para imagen de linfoma, donde fue útil en la estadificación de la enfermedad, el seguimiento de la progresión de la enfermedad, la recaída, y la predicción de la respuesta terapéutica. Otros cánceres ávidos de galio incluyen cáncer de pulmón, melanoma y mieloma múltiple, también aplicado como citrato de galio-67. Una característica de ^{67}Ga es que además de sus emisiones gamma para gammagrafías, también emite electrones Auger y por lo tanto tiene potencial como un radionucleido terapéutico [27].

Cuando el agente generador de imagen es un átomo metálico, como en el caso del ^{67}Ga se requiere en general la incorporación de un quelante bifuncional [28]. Dicho quelante se une covalentemente a la molécula de reconocimiento y a la vez, coordina fuertemente con el metal formando un complejo termodinámicamente estable [29]. La selección del quelante bifuncional está determinada en gran medida por la naturaleza y el estado de oxidación del ión metálico [30].

Partiendo de $^{67}\text{GaCl}_3$, encontramos al galio en su estado de oxidación +3. Debido a su alta densidad de carga los quelantes bifuncionales de preferencia para Ga^{3+} son polidentados con átomos donores como aminas y carboxilatos [31].

El ácido 1, 4, 7, 10-teraaazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) es una opción ideal, ya que posee una estructura cíclica con cuatro grupos carboxílicos y coordina a través de los cuatro nitrógenos amínicos y como máximo con tres oxígenos de los grupos carboxílicos dadores [32]. Tiene una notable afinidad para formar complejos con iones metálicos con cargas +2 y +3 [33] uniéndose a un gran número de radiometales con una estabilidad termodinámica y cinética muy altas [34]. Además, tiene muy buenas características comparables con las de otros agentes muy utilizados como EDTA, o DTPA [35], por lo que el ^{67}Ga puede ser quelado con DOTA con una muy buena constante de asociación [23].

Un grupo carboxilo de DOTA puede ser activado con un grupo éster N-hidroxisuccinidilo (NHS) [34, 36] en medio acuoso a un pH óptimo de entre 8,5 y

9 [37] para generar un grupo reactivo (figura 4) que facilite la conjugación a biomoléculas tales como proteínas, péptidos, y oligonucleótidos [38, 39].

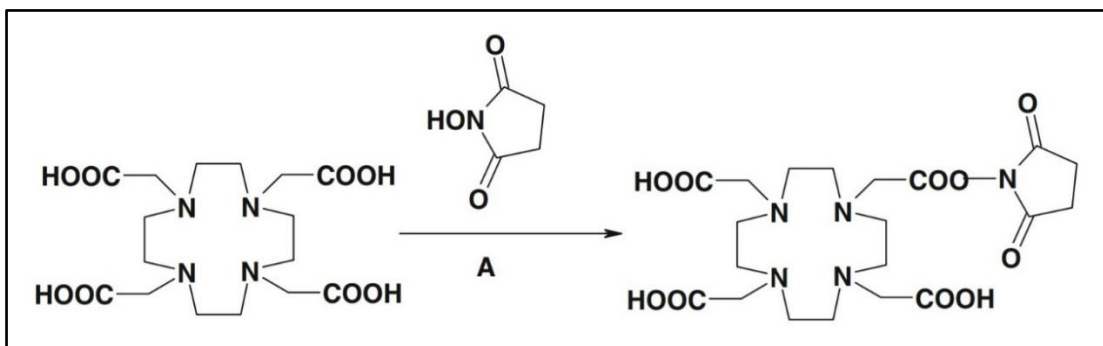


Figura 4. Activación del quelante bifuncional DOTA mediante un grupo NHS para generar el DOTA-NHS reactivo [36].

Las marcaciones realizadas con DOTA son realizadas en condiciones levemente ácidas, la estabilidad en el tiempo de los conjugados con DOTA es elevada [40].

Otro quelante bifuncional que logra formar un complejo estable con el ión metálico ^{67}Ga es el ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) (figura 5) [41].

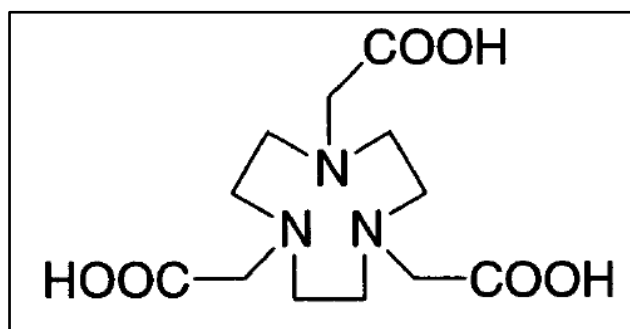


Figura 5. Estructura del quelante bifuncional NOTA

El NOTA, presenta una estructura macrocíclica, con tres grupos carboxílicos, con un núcleo más pequeño que el del quelante bifuncional DOTA [42]

Se utilizan los derivados de NOTA activados con un grupo NHS o con paraisotiocianato-bencil (p-Bn-SCN) (figura 6), entre otros [43].

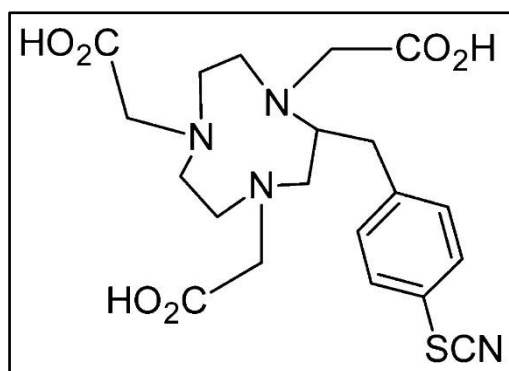


Figura 6. Estructura del p-Bn-SCN-NOTA [42].

2.5 APTÁMEROS

Un agente de reconocimiento molecular debe acumularse en grado significativo en el tejido patológico. Además, la acumulación relativa entre el tejido patológico y el normal debe ser suficientemente alta. Asimismo, para la obtención de buenas imágenes in vivo, el agente de orientación no debe residir mucho tiempo en la sangre o en los órganos que lo metabolizan. Los aptámeros poseen algunas características potencialmente útiles para su aplicación en imagenología molecular [44, 45].

Son oligonucleótidos de ADN o ARN que pueden plegarse en estructuras tridimensionales únicas y estables. Se unen a diversos ligandos con alta afinidad y especificidad a través de interacciones intermoleculares de baja energía [46-48].

Los aptámeros fueron inicialmente descritos a principios de los años noventa [49]. El término "aptámero", derivado de la palabra *aptus* en latín, significa "encajar", y refleja dos propiedades importantes de los aptámeros: la capacidad de plegarse en complejas estructuras tridimensionales y de unirse con alta afinidad y especificidad a su blanco [50, 51].

Los aptámeros se seleccionan mediante un proceso *in vitro* conocido como SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial), en el que los aptámeros se seleccionan de una biblioteca de secuencias

aleatorias de oligonucleótidos mediante ciclos de unión a su diana y posterior amplificación [6].

Finalmente, los aptámeros seleccionados se sintetizan químicamente [51].

Los aptámeros son candidatos muy versátiles con un amplio potencial debido entre otras cosas a su alta especificidad, bajo costo, y fácil manipulación [6].

Con un peso molecular de 8-15 kDa, los aptámeros son de tamaño intermedio entre anticuerpos (150 kDa) y péptidos pequeños (1-5 kDa) y son ligeramente más pequeños que los fragmentos de anticuerpos más utilizados. El tamaño pequeño y la naturaleza polianiónica de los aptámeros pueden conducir a un rápido aclaramiento de la sangre, una más rápida y mayor absorción de tejidos, pueden minimizar la residencia en el hígado y el riñón, y a su vez, pueden penetrar en sitios que son relativamente inaccesibles para los anticuerpos [45, 52]. Los aptámeros son comparables a anticuerpos en especificidad y afinidad para su molécula blanco y no provocan una respuesta inmune significativa [53].

La producción de los aptámeros es fácil, de bajo costo y el tiempo de generación por SELEX es relativamente corto [54].

Posteriormente al proceso SELEX, los aptámeros pueden ser modificados aún más a fin de mejorar algunas de sus propiedades, como por ejemplo la afinidad, la resistencia a nucleasas, la biodisponibilidad y la estabilidad térmica [46].

Es posible incorporar fácilmente grupos funcionales de interés, tales como un carboxilato, amino, sulfhidrilo o aldehído. Esto asegura, y facilita en gran medida, la conjugación específica del sitio con una amplia variedad de biomateriales [52].

La síntesis química facilita también la inclusión de nucleótidos modificados (por ejemplo, bases 2'-fluoro y 2'-O-metil-modificadas), que imparten resistencia a la degradación por nucleasas in vivo; y de grupos químicos reactivos (por ejemplo, aminas terminales) para permitir el acoplamiento a quelantes para aplicaciones de radiomarcaje [38].

2.6 Sgc8-c

Shuangguan y colaboradores desarrollaron un panel de aptámeros de ADN, llamados aptámeros Sgc, para el reconocimiento específico en células T de

leucemia linfoblástica aguda por una variación de la técnica de selección llamada Cell-SELEX (figura 7) [6, 55, 56].

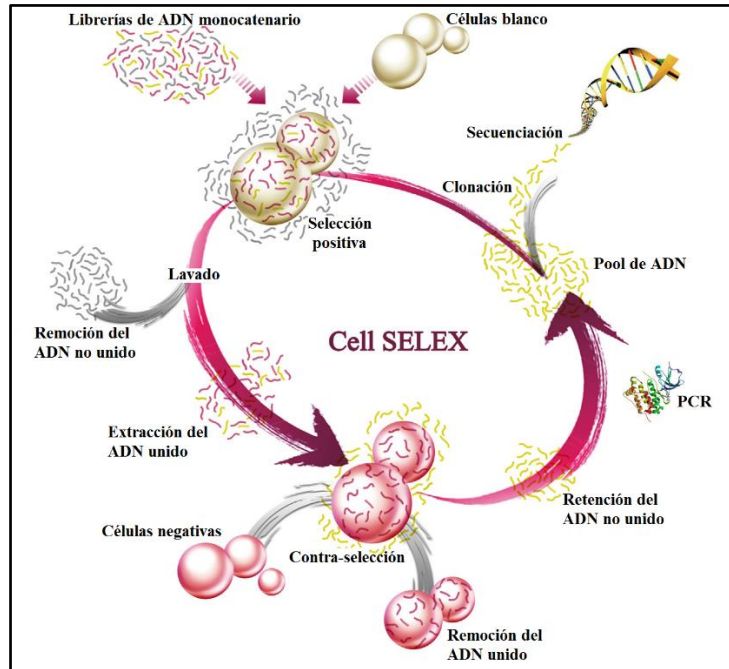


Figura 7. Representación esquemática del proceso CELL-SELEX [56].

Uno de estos aptámeros, Sgc8, mostró una alta especificidad y afinidad por el blanco de superficie en la mayoría de las células T-ALL y las células de leucemia mieloide aguda (AML), así como algunas células B de leucemia linfoblástica aguda (B-ALL). El blanco molecular finalmente identificado corresponde a al receptor transmembrana proteína tirosin quinasa-7 (PTK7), anteriormente descrito en cáncer [55, 57]. Se estudió una secuencia truncada de Sgc8, el aptámero Sgc8-c, el cual está formado por 41 nucleótidos, (47 bases menos que el original), y que presenta solo una estructura de bucle-tronco. Este aptámero presenta una afinidad por el PTK7 muy similar a la del Sgc8 original: 0,78nM (figura 8). Se reporta que Sgc8-c es la mínima secuencia requerida para una buena unión al blanco [58].

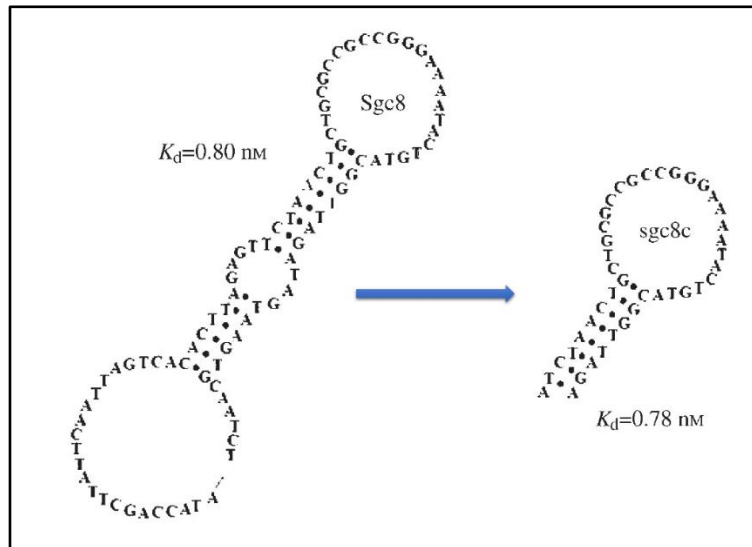


Figura 8. Estructura de Sgc8 y Sgc8-c con sus K_d para PTK7

Sgc8-c parecería ser internalizada a la célula a través de endocitosis mediada por receptor posterior a la unión con el PTK7 [56].

2.7 PTK7

Los receptores tirosinquinasa (RTK) son receptores transmembrana, que juegan un papel vital en diversos procesos biológicos durante el desarrollo y la vida adulta [59]. Desde su descripción en 1978, se ha reportado que estas proteínas regulan procesos tales como el ciclo celular, la migración, el metabolismo, la supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación y la comunicación célula-célula [59-61].

Están compuestas de tres dominios funcionales principales: el dominio N-terminal en la región extracelular, responsable de la especificidad de la unión al ligando (dominio altamente variable), un dominio transmembrana unipaso (o de una sola pasada) y en el extremo C-terminal, un dominio tirosin quinasa intracelular altamente conservado [62- 64]. Estos receptores responden a la unión del ligando modulando la actividad catalítica de su dominio de quinasa intracelular.

La proteína tirosin quinasa 7 (PTK7), también conocida como carcinoma quinasa-4 de colon (CCK-4), es un miembro de la familia de receptores tirosinquinasa (RTK) y es el blanco molecular del aptámero Sgc8-c [65, 66].

PTK7 se identificó por primera vez en los melanocitos humanos normales [66] y sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de colon humano, por ello la denominación CCK4 (Colon Carcinome Kinasa) [67-69].

Aunque no posee ningún ligando conocido pruebas recientes han vinculado a PTK7 con la polaridad de la célula planar (PCP) [67]. También regula el cierre del tubo neural, la motilidad celular polarizada y los movimientos de extensión convergente durante la gastrulación y la neurulación. La evidencia genética, sugiere también que la PTK7 un papel importante en la morfogénesis [70]

La sobreexpresión de PTK7 se ha encontrado en varios tipos de cáncer humanos, incluyendo cáncer de colon, gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de mama y leucemia mieloide aguda. También se asocia con un resultado clínico adverso en el cáncer colorrectal y a la invasividad de las células tumorales, por lo que podría servir como predictor del pronóstico de dichas enfermedades [65, 71].

Se ha observado que la interrupción de la expresión de PTK7 puede reprimir la proliferación celular y puede promover la apoptosis en cáncer de colon e hígado [72, 73].

Otros estudios, indican que la sobreexpresión de PTK7 se correlaciona con la inhibición de la apoptosis en líneas celulares leucémicas. También se ha demostrado que su función no solo se limita a tejidos epiteliales, sino que también se ha encontrado que PTK7 también se expresa en un grupo de células progenitoras mieloides normales y células de médula ósea CD34 y CD38 en humanos [74].

2.8 NANOVEHICULIZACIÓN

Las nanopartículas, moléculas en el rango de 1 a 100nm, presentan propiedades únicas que las hacen muy interesantes, tales como su tamaño ultra pequeño, gran área superficial y alta reactividad. Esto las hace diferentes a los materiales

convencionales, permitiendo superar algunas de las limitaciones encontradas en el uso de agentes terapéuticos y diagnósticos tradicionales [75].

En la actualidad se exploran muchas aplicaciones en biomedicina utilizando nanopartículas como las nanopartículas de oro (AuNP), los nanotubos de carbono, los liposomas, las micelas. Las propiedades de muchos materiales convencionales cambian con el uso de nanopartículas incluidas sus características farmacocinéticas, estabilidad [76] y actualmente son muy exploradas para su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

En el último tiempo se han investigado intensamente aptámeros modificados con nanopartículas [77].

Al combinar ambas tecnologías, de los aptámeros conjugados a nanopartículas surgen nuevas oportunidades para aplicaciones en biomedicina, como por ejemplo la vehiculización para el diagnóstico precoz y la administración de fármacos [75, 78].

Se ha descubierto que la administración de fármacos por nanovehículos es un método útil para mejorar la administración de los mismos al sitio del tumor y mejorar la estabilidad y reducir los efectos secundarios [56, 79, 80].

Existen varias clases de nanopartículas posibles para la vehiculización de aptámeros, incluyendo lípidos (liposomas), polímeros biocompatibles (por ejemplo, nanopartículas poliméricas), surfactantes (micelas), ciclodextrinas, partículas de oro coloidal, entre otras [81].

Las micelas poliméricas (figura 9 A) son nanoestructuras que poseen tamaños de entre 10-200nm, y se forman espontáneamente por el auto-ensamblaje de moléculas poliméricas anfifílicas combinando un bloque hidrofóbico y un bloque hidrofílico (generalmente segmentos hidrofílicos de polietilenglicol) [82]. Los bloques hidrofóbicos forman el núcleo micelar, capaz de albergar moléculas liposolubles, mientras que los bloques hidrofílicos forman una corona que está en contacto directo con el medio externo (generalmente acuoso), proporcionándole estabilidad a la micela [83]. Las micelas poliméricas, no presentan actividad farmacológica, tampoco presenta efectos adversos y poseen otras características que las hacen interesantes para su uso como vehículos [84].

Los liposomas (figura 9 B) son vesículas constituidas por bicapas lipídicas similares a las de las membranas celulares. Poseen un centro y un exterior hidrofílico. La arquitectura tumoral con su estructura anormal que presenta muchas fenestraciones (agujeros) permite el ingreso de estas nanopartículas por efecto EPR (permeabilidad y retención aumentada). Así los liposomas son capaces de acumularse en la masa tumoral, por transporte pasivo, al atravesar las fenestraciones propias de la vasculatura del tumor [85].

Se utiliza en muchos casos su pegilación haciéndolos menos sensibles a la opsonización y prolongando su vida media dentro del organismo [86].

Las ciclodextrinas (figura 9 C) resultan ser nanopartículas muy interesantes. Son oligosacáridos cíclicos formados por varias subunidades de almidón y poseen una forma tridimensional de cono anular truncado [87]. Son muy solubles en agua., ya que los grupos hidróxido de las subunidades de almidón están orientados hacia el exterior de la molécula [88, 89].

No presentan toxicidad, aumentan la estabilidad y evitan la tendencia de autoagregación en algunos fármacos [90].

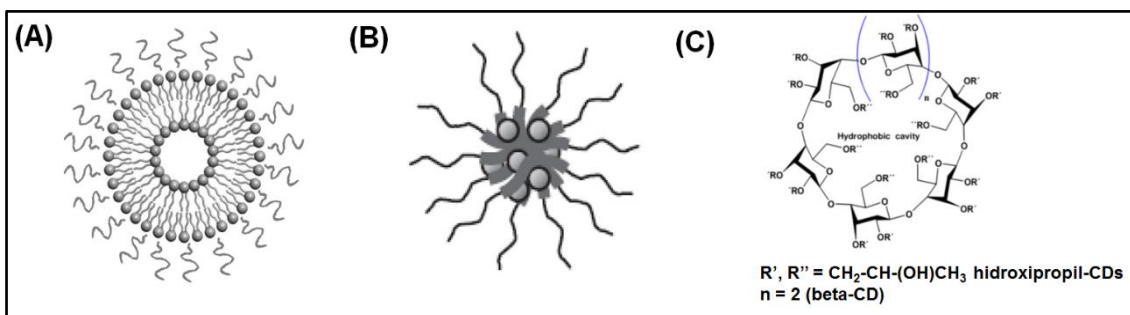


Figura 9. Nanoestructuras utilizadas en el presente trabajo. Liposomas pegilados (A), Micelas poliméricas (B) y Ciclodextrinas (C)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo, es la obtención y caracterización del aptámero Sgc8-c con galio-67 para su potencial uso como agente de imagenología molecular en cáncer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimización del método de derivatización de aptámero Sgc8-c con el quelante bifuncional DOTA
- Derivatización del aptámero Sgc8-c con el quelante bifuncional DOTA, a partir del aptámero con un extensor terminal de 6 carbonos y un grupo amino terminal.
- Evaluación fisicoquímica y de estabilidad del conjugado
- Marcación del conjugado con Galio-67
- Evaluación biológica, *in vivo* del agente desarrollado.
- Vehiculización del aptámero Sgc8-c en diferentes materiales nanoestructurados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El aptámero elegido originalmente para este trabajo fue el Sgc8-c [58]. Dicho aptámero es de ADN, con 41 bases y una MM 12634 Da. Posee la secuencia: 5'- ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'.

Con el fin de conseguir un extremo nucleófilo de partida, se sintetizó el aptámero modificado en el extremo 5' (Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville-USA). Esta modificación comprende un grupo amino libre junto con un espaciador de cadena alifática de 6 carbonos (5AmMC6). Por lo tanto, se trabajó con el aptámero 5'- /5AmMC6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3', de ahora en más Sgc8-c-NH₂. A partir de dichas modificaciones, la nueva masa molecular reportada por los fabricantes es de 12813,4 Da y pureza 60,8% (ver anexo figuras A1 y A2).

4.1 CONJUGACIÓN

El aptámero Sgc8-c-NH₂ se hizo reaccionar con un quelante bifuncional adecuado para el radionucleido ⁶⁷Ga.

Inicialmente el quelante bifuncional utilizado fue éster de mono-N-hidroxisuccinimida del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, NHS-DOTA (Macrocyclics) [11].

Asimismo, a modo comparativo, se utilizó el quelante bifuncional 2- S - (4-isotiocianatobencil) 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (p -SCN-Bn-NOTA) (Macrocyclics) [91].

Previo a la mezcla de reacción se realizó la dilución en agua MiliQ del aptámero sgc8-c-NH₂ liofilizado.

Posteriormente, con el fin de realizar intercambio con el buffer de reacción (i) se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm con agua MiliQ en centrífuga, utilizando filtros microcón 10 kDa cutoff (Microcon® Centrifugal filters). . Luego se agregó al aptámero el buffer de reacción (pH = 8,3) y se volvió a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm; este paso se realizó dos veces. Una vez lavado el aptámero, se reconstituyó en el buffer de reacción y se incorporó el quelante bifuncional (ii) previamente disuelto en una mínima cantidad de DMSO seco (1:10 v/v). La relación aptámero: quelante bifuncional fue 1:2, en un volumen final de 400µl.

Finalmente, se dejaron incubar las muestras durante un tiempo de reacción (iii) a temperatura ambiente, en agitación suave y constante. Las reacciones se detuvieron mediante cambio de buffer con microcón. Primero con el buffer de conjugación y luego una segunda filtración con el agregado de agua MiliQ. En ambos casos se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm.

4.2 OPTIMIZACIÓN

Con el fin de obtener y conocer las mejores condiciones para la conjugación del aptámero Sg8-c-NH₂, se realizó una optimización de la técnica, donde se estudiaron tres diferentes variables. Las variables estudiadas fueron: i) el buffer de reacción, ii) la relación molar de aptámero/quelante bifuncional y iii) el tiempo de reacción.

Los buffers de reacción analizados fueron dos diferentes, el primero fue un buffer de bicarbonato de sodio con una concentración de 0,1M y pH de 8,3. El segundo buffer utilizado fue una mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0.1M, siendo el pH final de 8,3. Las relaciones molares estudiadas fueron: 1:2, 1:50, 1:100 y 1:200 (Sgc8-c-NH₂: quelante bifuncional). Los tiempos de reacción estudiados fueron de 45 minutos, 2 horas y 24 horas. Todas las soluciones y material utilizado fueron previamente preparados con agua MiliQ y esterilizados.

4.3 SEGUIMIENTO DE REACCIÓN

Los avances de las reacciones y los rendimientos de los productos se estudiaron por Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) (Agilent). Se utilizó una columna Clarity® 3um Oligo-RP, 50 x 4,6 mm y como fase móvil 50mM de Amonio de Trietilamina (TEAA) / 5% de Acetonitrilo, pH= 7,5 (disolución A) y MeOH (disolución B). La velocidad de flujo fue de 1mL/min y se utilizó un gradiente A: B (90:10) a A: B (40:60).

Se evaluaron tres condiciones de corrida diferentes, a los que se llamó Método A (utilizado en la conjugación 4.1 y en la optimización 4.2), con un gradiente A: B (90:10) a A: B (40:60) en 30 minutos, Método B con un gradiente A: B (90:10) a A: B (40:60) en 30 minutos (con variaciones de gradiente respecto a A), y

Método C con un gradiente A: B (90:10) a A: B (40:60) en 25 minutos (variaciones de gradiente respecto a A y B).

Las señales se siguieron por detector UV a las longitudes de onda (λ) 260 y 280 nm y detector gamma simultáneamente.

4.4. ESCALADO

Con el fin de obtener una buena cantidad de producto y tras conocer las mejores condiciones de conjugación, se procedió a realizar un escalado de reacción. En este caso, la reacción fue iniciada con una masa de 2,1 mg del aptámero Sgc8-c-NH₂ y un Vf de \approx 2mL para el escalado con el quelante bifuncional DOTA-NHS.

4.5 PURIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO

Con el fin de aislar el aptámero conjugado de las posibles impurezas de la reacción se procedió a realizar su purificación mediante RP-HPLC, como se describe anteriormente en 4.3.

La cuantificación final del producto aislado se realizó por espectrofotometría UV en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 a una longitud de onda (λ) de 260nm, ϵ : 397600L.mol⁻¹.cm⁻¹

Una pequeña fracción del producto aislado y liofilizado se analizó por espectrometría de masas mediante electroespray (ESI-MS, MS-IALTQ-10), para confirmar su identidad (IDT).

4.6 ALMACENAMIENTO

Se estudió la estabilidad de los conjugados en diferentes condiciones de almacenamiento. La primera de las condiciones estudiadas fue el almacenamiento de la muestra liofilizada. Para ello, fracciones de las muestras de los conjugados fueron liofilizadas tras haber sido purificadas. También fue estudiada la estabilidad de cada conjugado almacenado en solución en heladera a 4°C y en freezer a -20°C en agua MiliQ. Se controló la estabilidad de los conjugados a los siguientes 7 días, a los 14 días y por último a los 30 días de almacenamiento. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en agua MiliQ

y la estabilidad se fue controlada mediante control en RP-HPLC según se detalla anteriormente (4.3)

Para el almacenamiento, no se realizó el agregado de ningún otro componente.

4.7 ELECTROFORESIS

Previo a la corrida electroforética y para asegurar una correcta conformación de las muestras, las mismas fueron sometidas a reestructuración, proceso de desnaturalización/renaturalización. Para ello, las muestras fueron resuspendidas en agua MiliQ, se calentaron a 75°C durante 10 minutos y luego se enfriaron en hielo durante 10 minutos.

Los conjugados fueron estudiados mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 15% utilizando una solución comercial de 30% Acrilamida/Bisacrilamida 19:1. Para la siembra de las muestras se utilizó buffer de muestra 6X (0,25% Azul de bromofenol, 40% Sacarosa). La corrida se llevó a cabo en buffer TBE 1X (45Mm Tris-Borato, 1Mm EDTA pH 8,0) a un voltaje constante de 100V.

La tinción de las muestras fue realizada con Nitrato de Plata. En primer lugar el gel fue sumergido durante 30 minutos en una solución fijadora (ácido acético 10%) agitando constantemente. Posteriormente se lavó con agua mili Q durante dos minutos (tres veces). Luego, el gel fue sumergido en la solución de tinción (1,0g/L Nitrato de Plata, 1,5ml/L Formaldehído al 37%, disueltos en agua mili Q) durante 30 minutos con agitación constante y en oscuridad. Posteriormente, con previo lavado durante 10 segundos con agua mili Q, se introdujo el gel en la solución de revelado (30g/L Carbonato de sodio, 1,5ml/L Formaldehído al 37%, Tiosulfato de sodio) en agitación constante hasta que pudieran verse las bandas con la intensidad deseada. Por último se introdujo el gel en la solución de detención (ácido acético al 10%).

Se utilizó un estándar comercial 20bp Molecular Ruler BIO-RAD.

4.8 ENSAYO DE ESTABILIDAD DEL CONJUGADO

Con el fin de evaluar si los conjugados son estables en condiciones fisiológicas y de marcación, se realizaron estudios de incubación en disolución salina y exponiendo los conjugados a cambios de temperatura.

La incubación en disolución salina de conjugado y del aptámero-NH₂ sin conjugar fue realizada durante 30 minutos con NaCl al 0,9% y tras la incubación a temperaturas de 25°C, 37°C, 45°C, 60°C y 75°C. Las estabilidades fueron seguidas mediante RP-HPLC.

4.9 ENSAYO FRENTE A DNASA I

Con el fin de simular degradación en un medio biológico, se estudió la susceptibilidad del Sgc8-c-NH₂ y de los conjugados frente a la endonucleasa DNAsa I.

Se procedió a incubar 0,3µg del Sgc8-c-NH₂, 0,15µg del conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA y 0,03µg del conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA con 0,4 Unidades de DNAsa para el aptámero Sgc8-c-NH₂ y 0,2 Unidades de DNAsa [91]. Los tiempos analizados fueron de 15 minutos y 2 horas de incubación a temperatura ambiente y oscuridad.

Transcurrido el tiempo, las muestras se analizaron por electroforesis según la metodología descrita anteriormente en 4.7.

4.10 RADIOMARCACIÓN

Una fracción del conjugado (1-20ug) fue resuspendida en buffer a pH levemente ácido. Los buffers estudiados fueron acetato de amonio 0.1M y acetato de sodio 0.1M a pH 5 y 6. Posteriormente añadió el radionucleido Galio-67 en su forma de cloruro de galio ⁶⁷GaCl₃ (Tecnonuclear, Buenos Aires-Argentina). El pH final de la mezcla de reacción fue ajustado y se incubó variando el tiempo de incubación y la temperatura de reacción.

El seguimiento de la marcación fue realizado mediante RP-HPLC según se describe anteriormente (4.3).

4.11 FARMACOCINÉTICA

Para realizar estudios farmacocinéticos una única dosis del radiomarcado Sgc8-c-NH₂-NOTA [91] de actividad 50µCi, fue administrada a ratas hembra Wistar (DILAVE, Montevideo, Uruguay) de 8 semanas (jóvenes) con un peso

aproximado de entre 200-250 g (n=2). La dosis fue administrada por vía intravenosa en bolo.

Para el estudio se contó con jaulas metabólicas donde fueron recolectadas muestras de sangre del globo ocular en tubos capilares heparinizados cuyas masas fueron anteriormente estandarizadas. Previamente a la recolección de la muestra de sangre, las ratas fueron anestesiadas con 0.25mL de una mezcla de 0,1mL de Xilacina 10% + 5mL de Ketamina. Se recolectaron también orina y heces. Las recolecciones de las distintas muestras (orina, sangre y heces) se realizaron cada distintos intervalos de tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3.5, 6, 18, 24, y 48 horas post-inyección. Luego de realizada la última recolección, la actividad de las muestras fue medida en un contador gamma, y las muestras de sangre fueron pesadas.

El análisis farmacocinético se realizó mediante Microsoft Excel® en forma no compartimental estimando parámetros de interés a partir de las observaciones de los distintos fluidos muestreados y compartimental, comparando distintos modelos mamilares de ajuste al perfil de observaciones sanguíneas (uno, dos y tres compartimientos). El modelo de mejor ajuste fue seleccionado de acuerdo a gráficos de bondad de ajuste (observaciones versus predicciones, residuales versus tiempo y versus predicciones) y a estimadores métricos, principalmente el Criterio de Información Akaike (AIC).

Protocolo aprobado por la comisión honoraria de experimentación animal.

4.12 VEHICULIZACIÓN

Con el fin de estudiar a futuro optimizaciones en el perfil farmacocinético de las sondas, se realizaron vehiculizaciones preliminares del aptámero Sgc8c-NH₂ (sin conjugar). Para ello, se utilizaron tres tipos de materiales nanoestructurados diferentes: (A) liposomas pegilados (LPS), (B) micelas poliméricas (MPs) a base de copolímeros de bloque T908 (25 kDa), T1307 (18 kDa) y F127 (12,6 kDa) y, (C) ciclodextrinas (CDs), más específicamente 2-hidroxipropil-beta-CD (HP β -CD; 1,4 kDa).

Los liposomas pegilados (LPS) a base de fosfatidilcolina de soja y colesterol, concentrados y preformados fueron otorgados gentilmente por MR-Pharma S.A.

(Buenos Aires, Argentina). Los copolímeros formadores de MPs fueron donados por BASF Corporation (New Milford, CT, EE. UU.). La ciclodextrina de elección para este estudio HP β -CD (Cavasol® W7 HP; MS por unidad de glucosa 0,65; Mw=1400 g/mol), Wacker-Chemie GMBH (Burghausen, Alemania), fue obsequiada gentilmente por SAFER S.A.C.I.F (Buenos Aires, Argentina)

La dispersión de liposomas pegilados se realizó mediante una dilución 1:50 en agua MiliQ, a partir de la muestra concentrada de LPS original entregada por el laboratorio (ver más arriba). Para la preparación de las dispersiones de MPs, se pesó 0,5g del copolímero, en cada caso, se dejó hidratar con un mínimo volumen de agua MiliQ durante toda la noche en frío (4°C) y luego se llevó a volumen final con agua MiliQ, a temperatura ambiente, para obtener las preparaciones al 10% p/v. Por último, las dispersiones de HP β -CD se realizaron al 10% p/v.

La incorporación del aptámero Sgc8c-NH₂ a cada nanosistema (volumen final 1mL en cada caso) fue realizada agregando un volumen de 10 μ L de una solución madre del mismo 1 μ g/ μ L. De esta forma, la concentración final de Sgc8c-NH₂ en cada sistema resultó ser 10 μ g/mL. Las preparaciones conteniendo el aptámero se dejaron incubar durante al menos 30 minutos a 25°C previo al análisis [84, 90, 92]. Los liposomas preformados han sido utilizados previamente para encapsular derivados del tipo aptámero, siendo la base para ajustarlo a nuestras condiciones de trabajo [93].

Luego de obtener el Sgc8-c-NH₂ incorporado en todos los sistemas, se analizó en cada caso el tamaño hidrodinámico de partícula (Dh), índices de polidispersión (PDI) y Zeta-potenciales (Z-Potencial), a 25 y 37°C y se monitoreó su estabilidad en el tiempo, en todos los sistemas vacíos y cargados con el aptámero.

Los parámetros críticos estudiados fueron re-analizados post-proceso de congelación/liofilización y posterior resuspensión en agua MiliQ a los aptámeros vehiculizados en CDs, y F127. Este ensayo se realizó, para observar cómo afecta el proceso de liofilización en cada vehiculización en particular.

También se cuantificó la integridad de Sgc8-NH₂ a distintos pH y a diferentes intervalos de tiempo para Sgc8-c-NH₂ (libre) en agua y todos los demás sistemas.

Por otro lado, se cuantificó Sgc8c-NH₂ ($\lambda=260$ nm, disolvente: agua MiliQ) vehiculizado en LPS, PMs y HPb-CD, antes y después de realizar un paso de clarificación utilizando filtros de nylon y ésteres mixtos de celulosa, ambos con un tamaño de poro de 45 μ m.

5. RESULTADOS

5.1 CONJUGACIÓN

Se partió del aptámero Sgc8-c-NH₂, el grupo amino libre permitió la conjugación de dicho aptámero con los quelantes bifuncionales DOTA y NOTA.

Inicialmente, en una relación molar 1:2 (Sgc8-c-NH₂: quelante bifuncional DOTA) no se evidencian cambios significativos en el cromatograma. Con una relación molar mayor del quelante bifuncional DOTA se comienza a observar una señal a tiempos de retención levemente mayores lo cual es indicativo de la presencia de un nuevo producto (figura 10).

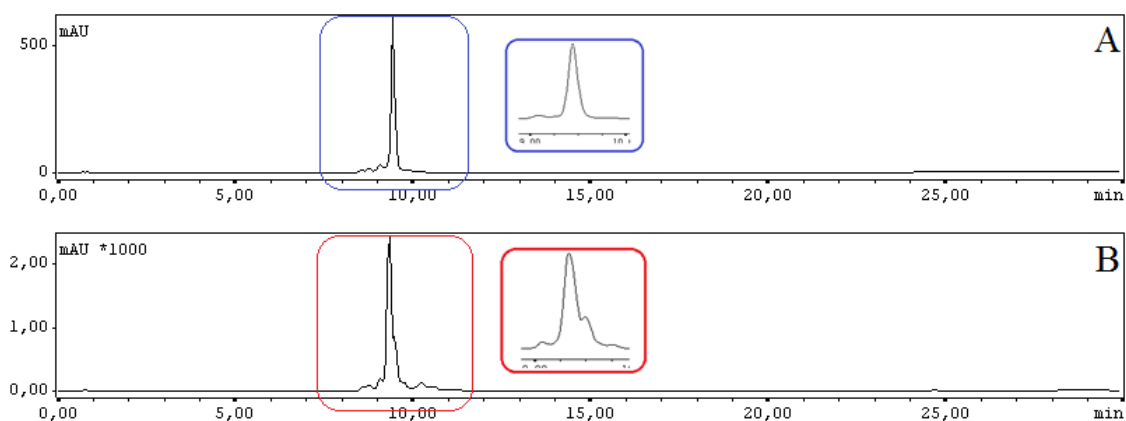


Figura 10. A) Cromatograma control del aptámero Sgc8-c sin derivatizar. B) Cromatograma del aptámero derivatizado donde se observa la aparición de una nueva señal (Sgc8-c-NH₂-DOTA). En los recuadros azul y rojo de la derecha se muestra la imagen aumentada.

5.2 OPTIMIZACIÓN

Para la optimización, se estudiaron tres variables diferentes, las cuales fueron: i) el buffer de reacción, ii) la relación molar de aptámero/quelante bifuncional y iii) el tiempo de reacción.

Tras realizar las conjugaciones en las distintas condiciones antes mencionadas, se procedió a realizar el control de los conjugados obtenidos mediante RP-HPLC, todos los controles mostraron similares tiempos de retención.

Para la conjugación con ambos quelantes bifuncionales, como se muestra en la figura 11, se pudo observar que las reacciones realizadas en buffer mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M pH 8,3 y en una relación molar de aptámero/quelante bifuncional de 1:200, fueron las que arrojaron los mejores rendimientos de las reacciones. En las condiciones anteriores, en ambos casos se llegó a lograr un porcentaje entre 70 y 80% de conjugación a las dos horas de reacción, resultando éste el mejor tiempo de incubación.

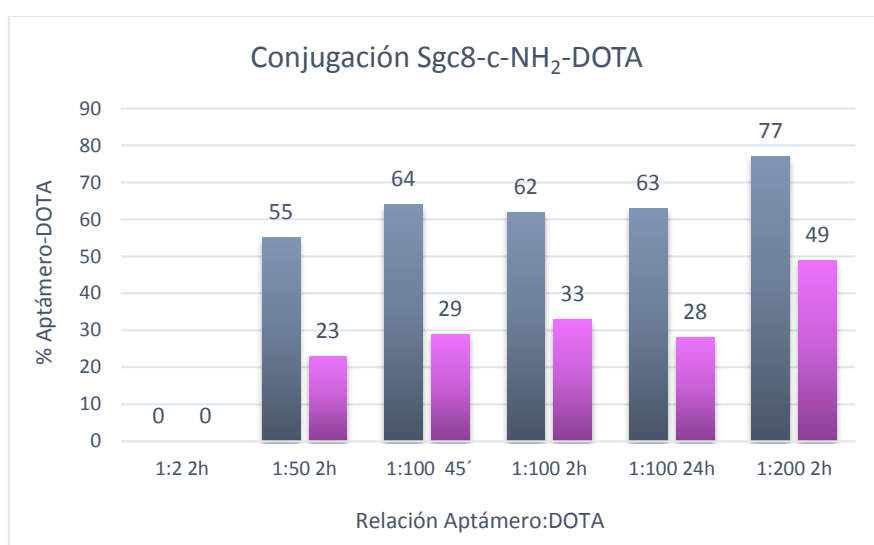


Figura 11. Porcentajes de conjugación obtenidos en las diferentes condiciones de reacción. El color gris representa el buffer de disolución de mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M pH 8,3; el color rosa representa el buffer de disolución de bicarbonato de sodio 0,1M pH 8,3.

5.3 SEGUIMIENTO DE REACCIÓN

Con el fin de obtener una mayor resolución cromatográfica se evaluaron tres condiciones de corrida diferentes. En el primer método estudiado, el Método A (figura 12 A), se visualiza casi imperceptible la separación de los dos picos de derivatización. En el segundo método, Método B (figura 12 B), se observa una mejoría en la resolución de los picos, pero los mismos siguen apareciendo muy cerca uno de otro. El método donde se observa una mayor resolución es el último método utilizado, el Método C (figura 12 C), a partir de estos resultados, todos los ensayos posteriores se realizaron con dicho método.

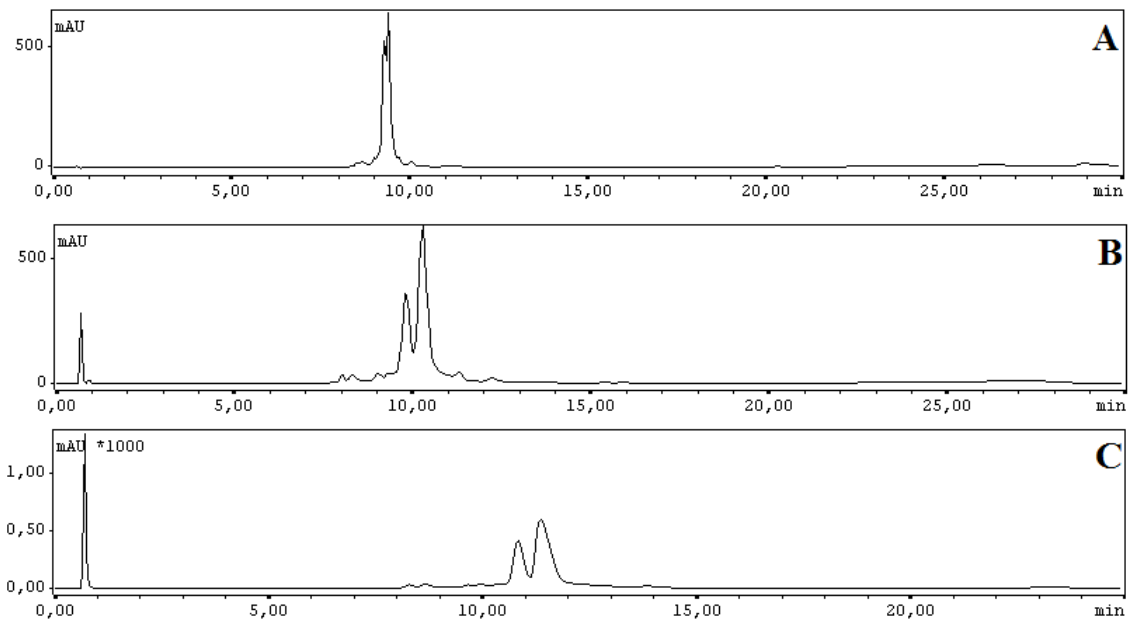


Figura 12. Cromatogramas comparativos de diferentes métodos utilizados.

5.4 ESCALADO

Luego de conocer y elegir las mejores condiciones para realizar la conjugación, las cuales pueden observarse en la tabla 1, se procedió a realizar un escalado de cada conjugado.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para la realización del escalado

	Sgc8-c-NH2-DOTA	Sgc8-c-NH2-NOTA
Relación molar aptámero/quelante bifuncional	1:200	1:200
Tiempo de reacción	2 horas	2 horas
Buffer de reacción	Mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M pH 8,3	Mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M pH 8,3
Porcentaje de conjugado obtenido	77%	70%

Luego de realizar el escalado se obtuvo un Cromatograma con dos picos (figura 13), uno con un tiempo de retención de 10,08 minutos, característico del Sgc8-

c-NH₂ sin derivatizar, y otro, con un tiempo de retención de 10,83 minutos, característico del derivatizado Sgc8-c-NH₂-DOTA. Con estos resultados se dan las condiciones para realizar la purificación caracterización de los picos obtenidos.

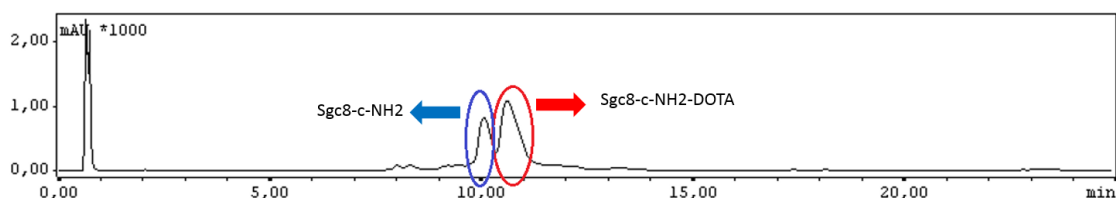


Figura 13. Cromatograma obtenido luego del escalado.

5.5 PURIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO

Tras obtener los conjugados en el escalado, los picos obtenidos en los cromatogramas fueron purificados mediante HPLC por recolección.

Luego del aislamiento de los conjugados, éstos se obtuvieron con purezas mayores al 99%. Se realizó un control por HPLC de los mismos y del aptámero Sgc8-c-NH₂ sin conjugar (figura 14), que presentó un tiempo de retención de 11.4 minutos (figura 14 A). El tiempo de retención para el conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA luego de la purificación fue de 12.5 min (figura 14 B) y el tiempo de retención para el conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA fue de 16.9 min (figura 14 C).

Tras la realización del escalado, se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y se obtuvieron 0,15 mg totales de conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA y 0.1 mg totales del conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA, por lo que luego de la purificación se recuperó un 7% y un 4% del aptámero para el caso de los conjugados con DOTA y NOTA respectivamente.

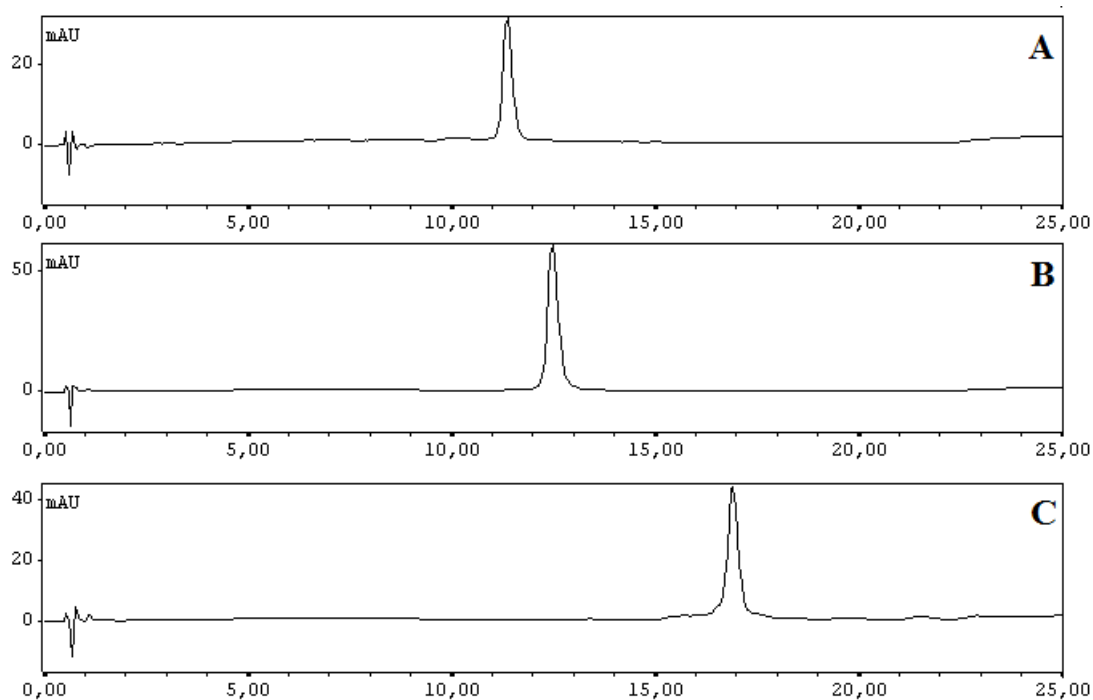


Figura 14. Cromatograma de los productos purificados.

Sgc8-c-NH₂(A), Sgc8-c-NH₂-DOTA (B), Sgc8-c-NH₂-NOTA(C)

Luego de realizada la purificación se confirmó la identidad de los productos determinando las masas molares por espectroscopía de masas.

La masa molar del Sgc8-c-NH₂ de partida reportada por el fabricante según espectrometría de masas (ver anexo figura A1) fue de 12813,4 Da.

El primer pico observado en los cromatogramas de ambas conjugaciones, corresponde al aptámero Sgc8-c-NH₂ sin conjugar, las masas moleculares reportadas por la espectroscopía de masas fueron de 12812,5 Da para el pico obtenido en la conjugación con DOTA y 12812,8 Da para el pico obtenido en la conjugación con NOTA (ver anexo figura A3 y A4).

La masa molecular estimada para el conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA era de 13199 Da. La masa molecular obtenida experimentalmente para el conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA fue de 13238,5 Da (figura 15 A). De esta forma, según los datos reportados por IDT, se confirma la incorporación del quelante bifuncional DOTA.

La masa molecular estimada para el conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA era de 13325.0 Da. La masa molecular obtenida experimentalmente para el conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA fue de 13325.6 Da (figura 15 B). De esta forma, según los

datos reportados por IDT, se confirma la incorporación del quelante bifuncional NOTA [91].

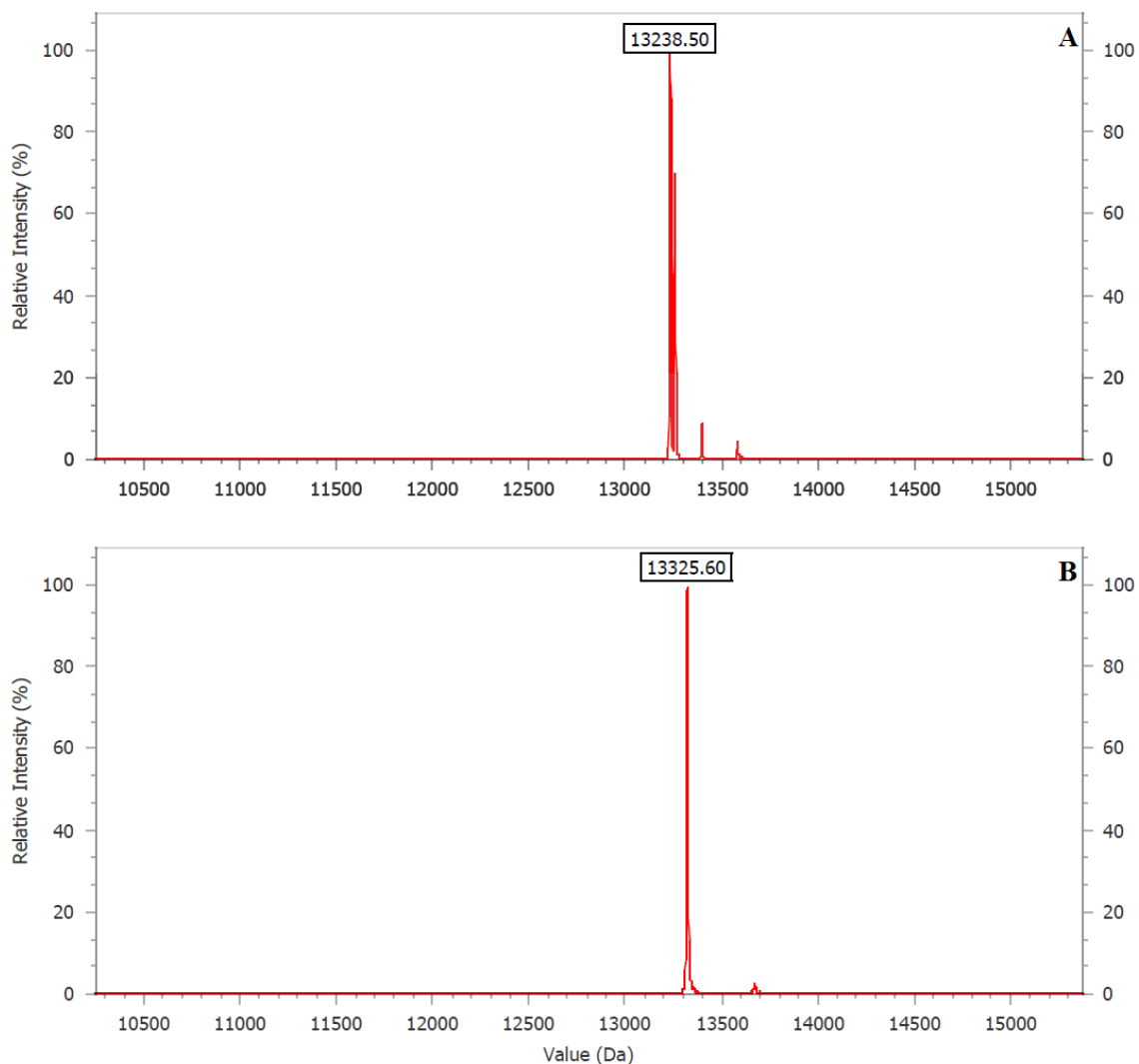


Figura 15. Espectro de masas de los conjugados purificados Sgc8-c-NH₂-DOTA (A), y Sgc8-c-NH₂-NOTA (B)

5.6 ALMACENAMIENTO

Tras el estudio de la estabilidad de los conjugados en diferentes condiciones de almacenamiento, se pudo observar que las muestras almacenadas mediante previa liofilización se mostraron estables en todos los tiempos de control, y para ambos conjugados. No observándose cambios en la señal correspondiente al

Sgc8-c-NH₂-DOTA en los cromatogramas obtenidos en todos los casos (no mostrados)

Los conjugados almacenados en solución, también presentaron el mismo comportamiento que el liofilizado, se mostraron estables tras todos los tiempos de control.

5.7 ELECTROFORESIS

Se analizó cada conjugado mediante electroforesis en gel. Se analizaron el peso molecular y otras características fisicoquímicas.

Se estudiaron muestras de Sgc8-c-NH₂ sin conjugar y muestras de los conjugados Sgc8-c-NH₂-DOTA y Sgc8-c-NOTA.

Comparando las migraciones de las muestras sembradas, se puede observar claramente la diferencia de pesos moleculares entre los conjugados y el aptámero sin conjugar, donde Sgc8-c-NH₂ posee una masa de 12813 Da, Sgc8-c-NH₂-DOTA 13238 Da, y Sgc8c-NH₂-NOTA 13325 Da (figura 16) [91]. Los resultados de dicha electroforesis coinciden con los obtenidos mediante espectroscopía de masas.

Comparando la migración de cada muestra con el estándar de peso molecular, podemos observar las diferencias en el tamaño de nuestros conjugados, también se observa que no hay presencia de agregados de las muestras de mayor peso molecular ni se observan señales que correspondan a otras estructuras (no reestructuradas por ejemplo).

También se confirma que el previo proceso de desnaturalización/renaturalización es exitoso, ya que garantiza que las muestras estén en su conformación adecuada.

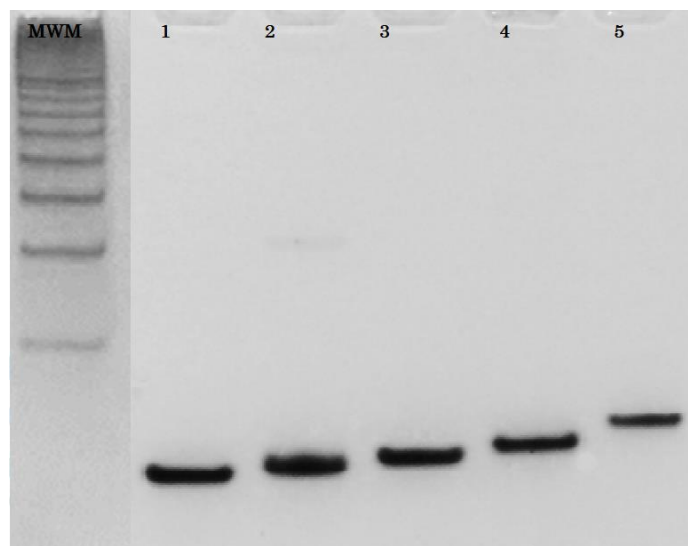


Figura 16. Perfiles electroforéticos en gel de poliacrilamida al 15%. En el carril 1 se observa el Sgc8-c-NH₂, en el carril 3 se observa el Sgc8-c-NH₂-DOTA y en el carril 4 Sgc8-c-NOTA. MPM: 20pb Molecular Ruler.

En los carriles 2 y 5 se observan otros conjugados (Sgc8-c-NH₂-HYNIC y Sgc8-c-NH₂-Alexa647) estudiados por el equipo de trabajo. [91]

5.8 ENSAYO DE ESTABILIDAD DEL CONJUGADO

La estabilidad de los conjugados en condiciones fisiológicas y de marcación fueron analizadas en NaCl al 0,9%. Luego de la incubación durante 30 minutos en diferentes temperaturas (25°C (temperatura ambiente), 37°C, 45°C, 60°C y 75°C) se siguieron mediante HPLC.

Luego de realizar este ensayo, no se observan cambios significativos en la señal correspondiente al aptámero derivatizado con DOTA para ninguna de las condiciones estudiadas.

5.9 ENSAYO FRENTE A DNASA I

Se realizó un estudio comparativo del Sgc8-c-NH₂ y de los conjugados frente a la endonucleasa DNAsa I.

Como puede observarse en la figura 17, a los 15 minutos de reacción (A), el aptámero Sgc8-c-NH₂ y ambos conjugados sufrieron una degradación bastante significativa, aunque se observa gran cantidad de aptámero y conjugados sin degradar.

A las dos horas (B), la degradación fue casi completa aunque siguen observándose en pequeña cantidad el aptámero Sgc8-c-NH₂ y de los conjugados aún sin degradar.

Ambos conjugados y el aptámero sin conjugar presentaron susceptibilidades similares frente a la degradación. Los resultados se expresan en términos cualitativos ya que no se determinaron valores.

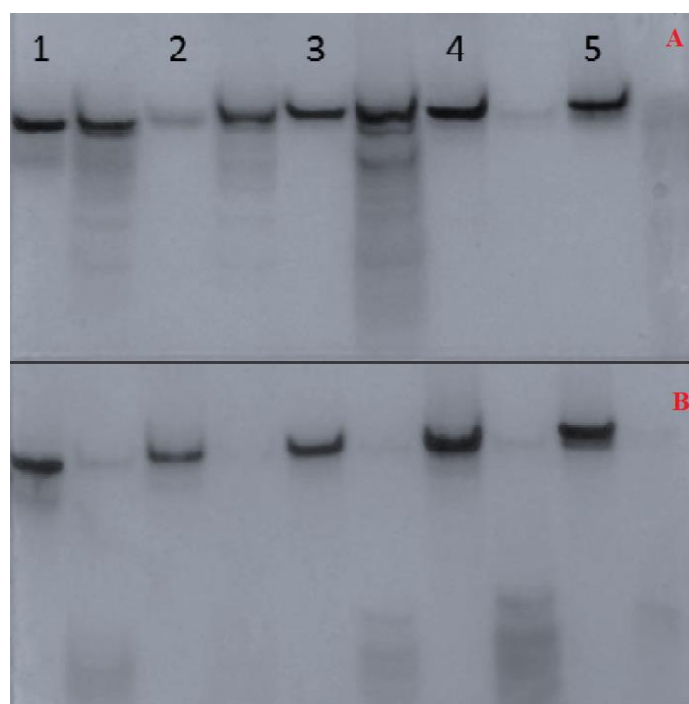


Figura 17. Perfiles electroforéticos en gel de poliacrilamida al 15%. 1 izquierda: Sgc8-c-NH₂; 3 izquierda: Sgc8-c-DOTA; 4 izquierda: Sgc8-c-NOTA. Derecha: luego de incubación con DNasa I
En los carriles En los carriles 2 y 5 se observan otros conjugados (Sgc8-c-NH₂-HYNIC y Sgc8-c-NH₂-Alexa647) estudiados por el equipo de trabajo. [91]

5.10 RADIOMARCACIÓN

En el caso del conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA, aunque se probaron distintas condiciones (temperatura, tiempos de reacción, buffers de marcación, volúmenes finales y cantidad de actividad utilizada), la marcación no fue efectiva (figura 18). En todos los casos se observa un pico a los 0.83 minutos, correspondiente al cloruro de galio no unido al conjugado (figura 19).

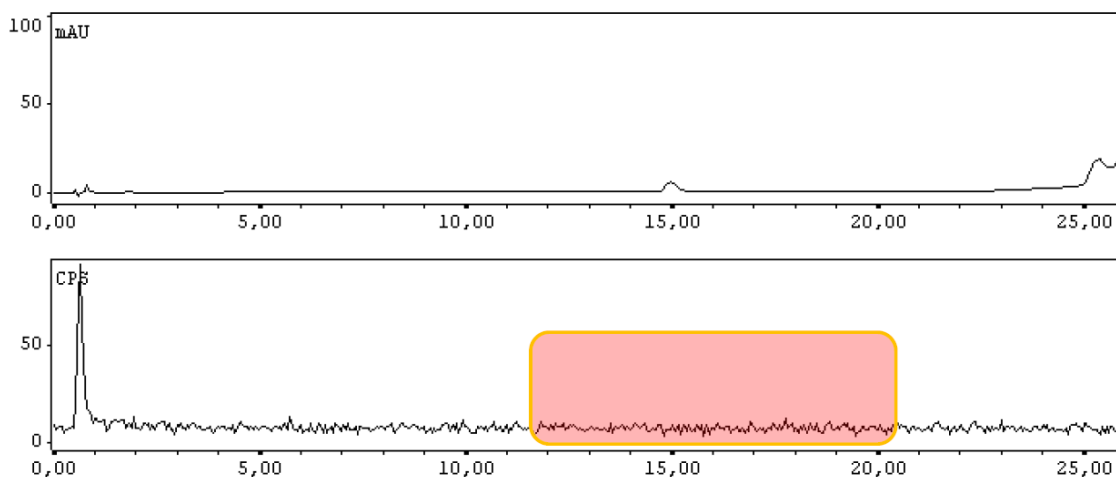


Figura 18. Marcación del Sgc8-c-NH₂-DOTA. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y en la parte inferior el cromatograma con detector gamma. Se marca en la parte inferior donde debería verse la señal del conjugado marcado.

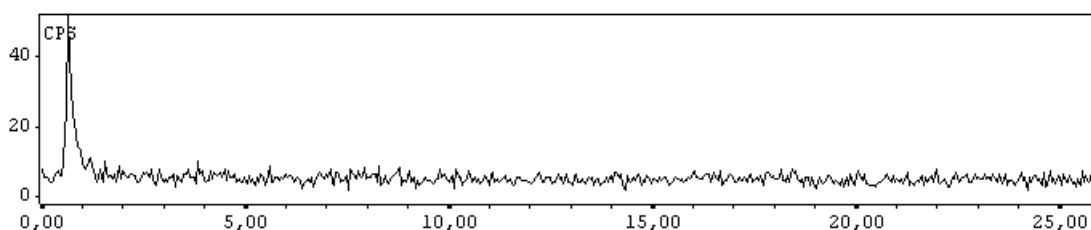


Figura 19. Cromatograma con detector gamma de GaCl₃

A modo comparativo, se realizó la marcación del conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA, en este caso, la marcación fue efectiva [91]. Las mejores condiciones observadas para dicha marcación de este conjugado fueron: buffer acetato de amonio pH 6, 30 minutos de reacción, temperatura de reacción de 60°C, 1001 μ Ci de actividad, 5 μ g del conjugado y un volumen final de 1 mL.

En estas condiciones se obtuvo un 86% de rendimiento en la marcación (figura 20).

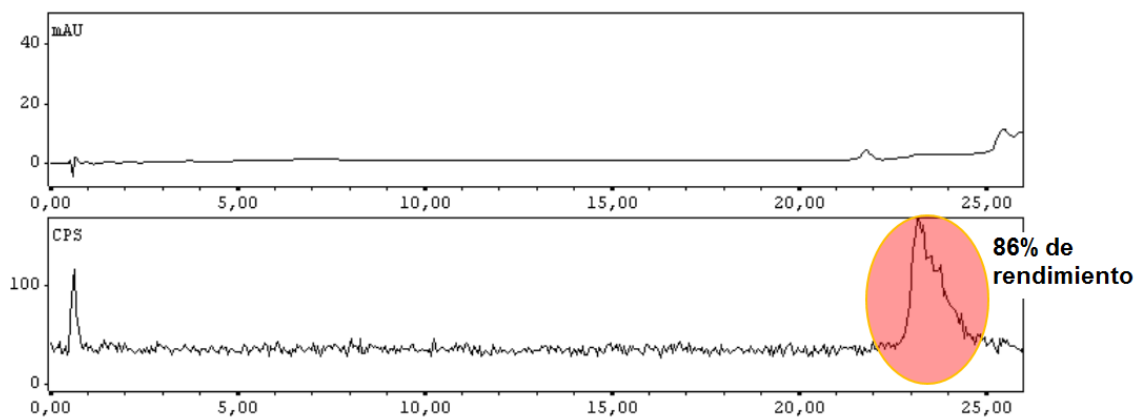


Figura 20. Marcación del Sgc8-c-NH₂-NOTA. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y en la parte inferior el cromatograma con detector gamma. Se observa claramente en la parte inferior el pico obtenido de la marcación del conjugado [91].

5.11 FARMACOCINÉTICA

El estudio farmacocinético fue realizado con el conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA [91] marcado ya que la marcación de Sgc8-c-NH₂-DOTA no fue efectiva.

En dicho estudio se pudieron estimar los parámetros del comportamiento in vivo del conjugado. Se observa una depuración sanguínea muy rápida en la fase inicial, con una fase final muy lenta, con una semivida de eliminación de 33,75 horas (figura 21)

Inicialmente se realizó un análisis no-compartimental, en el cual se obtuvieron valores de Vd (volumen de distribución), CLt (clearance total) y de la fracción eliminada por orina.

El modelo bi-compartimental obtuvo el mejor ajuste a las observaciones en sangre. A partir de dicho modelo se estimaron nuevamente los parámetros farmacocinéticos mencionados, obteniendo que los resultados fueron similares a los anteriores. El Vd fue de 63.3mL, el CLt fue de 1.3mL/hora y la fracción de dosis eliminada por orina fue de 0.218. El valor resultante de AIC para el modelo bi-compartimental fue de 6,12 mientras que el AIC para el modelo tri-compartimental fue de 10,3.

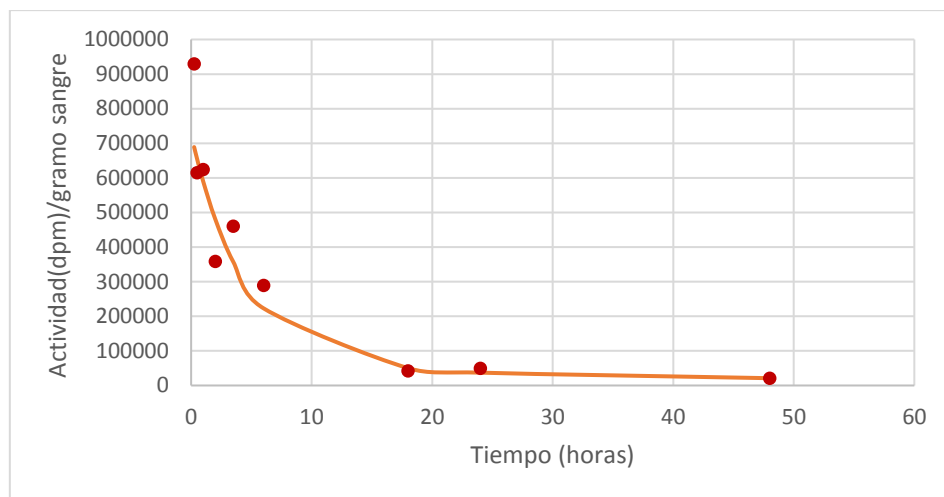


Figura 21. Farmacocinética del Sgc8-c-NH₂-DOTA. Inyección iv. en bolo. Modelo bicompartimental. Las muestras fueron colectadas hasta 48 horas post-inyección. Gráfico realizado con datos de rata 1

5.12 VEHICULIZACIÓN

Luego de la vehiculización con todos los sistemas, puede observarse (se muestran los datos a 37°C) que el tamaño medio de partícula de los nanosistemas estudiados y cargados con Sgc8-c-NH₂ fue similar al de los sistemas vacíos en todos los casos. No se evidenciaron poblaciones con tamaños significativamente diferentes (tabla 2).

El Z-potencial del aptámero Sgc8-c-NH₂-libre en medio acuoso resultó ser de aproximadamente -14 Mv, mientras que el de los sistemas cargados resultó en todos los casos negativo y en concordancia a los vehículos sin carga (tabla 2).

Tanto para los sistemas PMs y HPb-CD cargados con Sgc8-c-NH₂ no se observaron alteraciones en el proceso de liofilización y posterior resuspensión en medio acuoso, conservándose los tamaños de partícula, PDI y Z-potencial, en todos los casos (tabla 3). Los sistemas LPS/Sgc8-c-NH₂ no se sometieron a procesos de congelación/ por estar estabilizados estéricamente mediante pegilación. Los mismos fueron conservados a 4°C.

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico (D_h), distribución de tamaños, índice de polidispersión (PDI) y Z-potenciales de sistemas libres y cargados con Sgc8-c-NH₂ a 37°C, determinados por DLS.

^a Pico 1: pico de menor tamaño de partícula. ^b Pico 2: pico de mayor tamaño de partícula.

Sistemas libres y cargados (37°C)		Pico 1 ^a		Pico 2 ^b		PDI (±S.D.)	Z-Potencial (mV) (±S.D.)
		D_h (nm) (±S.D.)	% Intensidad (±S.D.)	D_h (nm) (±S.D.)	% Intensidad (±S.D.)		
Sgc8cm-libre (10mg/mL)		5,2 (1,6)	32,4 (11,3)	148,0 (50,7)	67,6 (11,3)	0,858 (0,16)	-14,0 (4,0)
LPS (1:50)	LPS-libre	100,8 (2,0)	100,0 (0,0)	-	-	0,123 (0,01)	-37,2 (1,2)
	LPS/Sgc8-c	118,1 (7,3)	100,0 (0,0)	-	-	0,185 (0,01)	-26,8 (0,4)
PMs (10% p/v)	T908-libre	6,1 (0,2)	43,3 (0,3)	86,1 (11,2)	56,7 (0,3)	0,576 (0,03)	-3,5 (1,9)
	T908/Sgc8-c	6,1 (0,2)	58,6 (2,2)	69,6 (3,4)	41,4 (2,2)	0,510 (0,03)	-2,5 (1,4)
	T1307-libre	7,4 (0,5)	38,9 (1,4)	26,7 (1,7)	61,1 (1,4)	0,557 (0,04)	-3,0 (1,2)
	T1307/Sgc8-c	9,1 (0,3)	58,4 (1,4)	38,9 (3,0)	41,6 (1,4)	0,374 (0,01)	-4,3 (0,4)
	F127-libre	20,7 (0,3)	100,0 (0,0)	-	-	0,349 (0,02)	-2,3 (1,5)
	F127/Sgc8-c	20,8 (0,4)	100,0 (0,0)	-	-	0,326 (0,02)	-1,8 (1,1)
CD (10% p/v)	Hpb-CD-libre	1,8 (0,1)	56,4 (2,2)	267,5 (36,1)	43,6 (2,2)	0,300 (0,02)	-18,5 (2,5)
	HpbCD/Sgc8-c	1,5 (0,1)	16,2 (2,7)	153,7 (12,9)	83,8 (2,7)	0,332 (0,01)	-22,1 (1,8)

Tabla 3. Diámetro hidrodinámico de partícula de aptámero encapsulado (en MPs (F 127), y CDs, liofilizados y resuspendidos) a 37°C, por DLS

Muestra	Temp (°C)	Pico 1		Pico 2		PDI (±S.D.)
		D_h (nm) (±S.D.)	% Intensidad (±S.D.)	D_h (nm) (±S.D.)	% Intensidad (±S.D.)	
F 127	37	44.84	90.5	5.8	9.5	0.354
		(1.2)	(0.6)	(0.6)	(0.6)	(0.06)
HPβCD	37	1.8	33.1	378	66.9	0.827
		(0.02)	(1.9)	(38.3)	(1.9)	(0.3)

En cuanto a la estabilidad de Sgc8-c-NH₂ libre en agua y en los demás sistemas, se observó que Sgc8-c-NH₂ resultó estable en función del tiempo, no evidenciándose procesos de degradación aparentes una vez expuesto a distintos pH de estudio (pH = 4, 7 y 10).

Por último, para el proceso de clarificación con los dos tipos de filtro diferentes (nylon y celulosa) se observó que no existe pérdida significativa luego de dicho proceso para todos los sistemas del Sgc8-c-NH₂ vehiculizado, se observa una mayor pérdida en el caso de los filtros de nylon.

6. DISCUSIÓN

La imagenología molecular consiste en un área multidisciplinaria que permite la caracterización in vivo y la medida de los procesos biológicos a nivel celular y molecular. Posee la ventaja de tener una naturaleza no invasiva que permite la visualización de características moleculares a través de imágenes, permitiendo la evaluación de la patología en su contexto, sin perturbar el ambiente [8-11].

En este contexto, es fundamental desarrollar agentes de imagen molecular capaces de ser específicos por un blanco molecular.

En la actualidad, debido al estudio y desarrollo de los aptámeros, se los ha postulado como agentes de reconocimiento muy prometedores para la imagenología molecular.

En el presente trabajo se utilizó el aptámero Sgc8-c. Como describe en la bibliografía, presenta 41 nb y 12813,4 Da, tamaño óptimo para el desarrollo de un agente de imagenología molecular. Presenta afinidad por el receptor de membrana llamado proteína tirosin quinasa 7 (PTK7) sobreexpresado en cáncer y ha sido muy bien caracterizado por el grupo del Prof. Tan [58].

Anteriormente, en el año 2012 bajo el título “Nuevas Estrategias de Imagenología Molecular en Cáncer” la Prof. Calzada realizó el primer trabajo con aptámeros en el país [94]. Basados en estos previos resultados se optó por ampliar este trabajo, optimizar la metodología, purificación y radiomarcación con ^{67}Ga , entre otros.

En este trabajo el aptámero Sgc8-c se obtuvo de IDT modificado en su extremo 5' con el fin de contar con un extremo nucleófilo de partida. Dicha modificación posteriormente permitió la conjugación con los grupos NHS y p-Bn-SCN de los quelantes bifuncionales DOTA y NOTA respectivamente para su radiomarcación.

El control de las conjugaciones se realizó mediante RP-HPLC y la incorporación de modificaciones al Sgc8-c-NH₂ puede verse reflejada en la aparición de nuevas señales obtenidas en los cromatogramas,

En el inicio, para la conjugación de partida se utilizó una relación molar de Sgc8-c-NH₂: quelante bifuncional de 1:2, en la cual no se observó conjugación. Dicha

relación fue aumentada y comenzó a observarse una nueva señal a tiempos levemente mayores en el cromatograma, lo cual daba un indicio de que se estaba en presencia de un nuevo producto, el conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA y Sgc8-c-NH₂-NOTA en cada caso.

Con dicho resultado, se observa que la relación molar utilizada inicialmente (1:2) es demasiado baja para generar el conjugado, por lo que se decide realizar una optimización de dicha técnica para determinar cuáles son las condiciones ideales de reacción y así obtener los mejores rendimientos de reacción en el menor tiempo posible.

Se estudiaron tres variables diferentes para realizar dicha optimización: disolvente de reacción, relación molar aptámero: quelante bifuncional, y tiempos de reacción. Los estudios de optimización siempre se realizaron a temperatura ambiente. Todas las soluciones y material utilizado fueron previamente preparados con agua MiliQ y esterilizados.

Los disolventes de reacción que fueron analizados, fueron dos buffer diferentes, ya que la naturaleza y la fuerza iónica del buffer en la que se produce la interacción aptámero-ligando, podrían influir significativamente en la unión biológica [91]. El primero fue un buffer de bicarbonato de sodio con una concentración de 0,1M. El segundo fue una mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M, siendo el pH final de 8,3 en ambos casos. Se observó que cuando el buffer utilizado era el de la mezcla de volúmenes iguales de fosfato de sodio 0,1M y bicarbonato de sodio 0,1M se obtenían rendimientos de reacción significativamente mayores a cuando se utilizó el buffer bicarbonato de sodio 0,1M.

Las relaciones molares estudiadas fueron: 1:2, 1:50, 1:100 y 1:200 (Sgc8-c-NH₂: quelante bifuncional). Los resultados mostraron que los rendimientos aumentaron con la cantidad de los electrófilos resultando las mejores condiciones donde la relación era 1: 200.

Los tiempos de reacción estudiados fueron de 45 minutos, 2 horas y 24 horas. Los resultados mostraron que el incremento en el tiempo de reacción no conducía a cambios significativos en el rendimiento, en general, el mejor tiempo de incubación fue el de dos horas.

Luego de conjugar las mejores condiciones de reacción se consiguieron rendimientos de casi 80% para el conjugado Sgc8-c-NH₂- DOTA y de 70% para Sgc8-c-NH₂- NOTA [91].

Con el objetivo de obtener una mayor resolución de picos en el estudio por RP-HPLC se evaluaron tres tiempos de corrida y gradientes diferentes. Se buscaba un perfil en el cual los picos del cromatograma estuvieran lo suficientemente separados como para observar bien las diferencias en los tiempos de retención y para que facilite la posterior purificación de dichos picos. El mejor método utilizado fue el C, en el cual el gradiente iba desde A: B (90:10) hasta A: B (40:60) en 25 minutos.

Luego de obtener el mejor método de detección por RP-HPLC, se pasó a realizar un escalado. Para la realización del mismo, se utilizaron las condiciones obtenidas en la optimización y la reacción se siguió mediante RP-HPLC con el método elegido. Se observaron en el cromatograma dos picos bien diferenciados, a tiempos de retención diferentes, los que a priori, coinciden con el Sgc8-c-NH₂ y los conjugados Sgc8-c-NH₂-DOTA y Sgc8-c-NH₂-NOTA en cada caso.

A partir del escalado, el próximo paso a realizar fue la purificación de los picos del cromatograma obtenido y la caracterización de los mismos mediante espectroscopía de masas. Tras la purificación para el conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA, se recuperó un 7% del aptámero utilizado inicialmente. En el caso del conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA se recuperó aproximadamente un 4% [91]. En ambos casos, se obtuvieron productos con una pureza mayor al 99%. En los cromatogramas de cada conjugado se obtuvieron dos picos, el primer producto eluído, correspondiente al Sgc8-c-NH₂ sin reaccionar y el segundo producto correspondiente al conjugado. La caracterización mediante ESI-MS, que brindó el valor de peso molecular de cada producto, confirmó en ambos casos dichos resultados. El estudio también confirmó la incorporación de solo una unidad del quelante bifuncional al Sgc8-c-NH₂. En el caso de Sgc8-c-NH₂-DOTA, el peso molecular obtenido de 13238,5 Da coincide con lo esperado con un potasio coordinado. Para el caso de Sgc8-c-NH₂-NOTA, el peso molecular obtenido mediante ESI-MS de 13325.6 Da también coincide con lo esperado como sal de sodio y con un potasio coordinado.

Al obtenerse una buena cantidad del producto conjugado, fue necesario realizar un estudio de almacenamiento del mismo, se estudió el almacenamiento mediante liofilización, en el cual los conjugados mostraron una muy buena estabilidad en el tiempo, y de esa manera fue como se almacenó el conjugado durante todo el trabajo. También se observó que los conjugados son estables también almacenados en solución.

El análisis del peso molecular y de algunas características fisicoquímicas de los conjugados se realizó mediante electroforesis en gel. En cuanto al peso molecular, los resultados de este ensayo concuerdan completamente con los obtenidos mediante ESI-MS en el cual se confirma los pesos moleculares del Sgc8-c-NH₂ y de cada conjugado. Se observa claramente que los diferentes productos migraron según su peso molecular. Aquí también se confirma la eficacia del proceso de purificación, ya que en el gel no se observan señales que puedan corresponderse con otras estructuras inesperadas.

Se puede afirmar también que el proceso realizado de desnaturalización/renaturalización fue exitoso, ya que no se observan cambios en el patrón electroforético, lo que indica que están en la conformación adecuada.

Se estudió la estabilidad de los conjugados en condiciones fisiológicas y de marcación, realizando estudios de incubación en solución salina y exponiendo a los conjugados a cambios de temperatura. En este caso, los conjugados mostraron conservar la estabilidad en todas las condiciones estudiadas, no se observan cambios significativos en la señal correspondiente a los conjugados, lo que permitirá realizar la radiomarcación sin que el conjugado pierda estabilidad.

Luego de realizar un ensayo comparativo frente a la endonucleasa DNasa I, y simulando la degradación en un medio biológico, se observa que a los 15 minutos la degradación fue apreciable, siendo evidente en el gel de electroforesis la presencia de productos de menor peso molecular. A las dos horas del ensayo, no se observan diferencias. El Sgc8-c-NH₂ y ambos conjugados presentan una sensibilidad similar a la degradación. Estos resultados dan un indicio de que los conjugados pueden ser sensibles a la degradación una vez ingresado al medio biológico.

Una vez realizados los ensayos de caracterización, estabilidad y fisicoquímicos, se procedió a realizar la radiomarcación de cada conjugado.

Para el caso del conjugado Sgc8-c-NH₂-NOTA, la radiomarcación fue sencilla, luego de variar algunas condiciones, se logró una radiomarcación con un rendimiento del 86%.

Para el caso del conjugado Sgc8-c-NH₂-DOTA, dicha la radiomarcación no fue evidenciada. Las condiciones de reacción se realizaron siguiendo los procedimientos reportados previamente en los cuales la radiomarcación de dicho compuesto había resultado exitosa [11]. Utilizando dichas condiciones, en este caso, la marcación no fue efectiva. Se variaron varias condiciones según la bibliografía estudiada, se probaron diferentes buffers: acetato de amonio y acetato de sodio que fueron los reportados, diferentes pH (entre 5 y 6), diferentes temperaturas entre (35°C y 60°C), diferentes cantidades de actividad y diferentes tiempos de reacción [23, 95-97]. Aunque se realizaron la mayor cantidad de intentos para realizar la radiomarcación, variando la mayor cantidad de condiciones, ésta no tuvo éxito. La cantidad limitada de reactivos y sobre todo de cloruro de galio con la que se contaba, no permitió profundizar en los intentos de realizar la reacción. Se encontraron datos interesantes donde la marcación de ⁶⁷Ga con el quelante bifuncional DOTA se realizaba a muy altas temperaturas desde 75°C hasta más de 100°C [95, 96, 98]. Dichas temperaturas no fueron estudiadas en este caso por lo que deja una puerta abierta a seguir probando con estas temperaturas de reacción. Existe la posibilidad de que las altas temperaturas puedan llegar a provocar una degradación de nuestros conjugados, lo que podría representar una desventaja que deberá ser evaluada a futuro.

En todo caso, los resultados de las radiomarcaciones del Sgc8-c-NH₂-DOTA y Sgc8-c-NH₂-NOTA, coinciden con datos bibliográficos en los cuales presentan que la radiomarcación del ⁶⁷Ga con NOTA es efectiva a temperaturas menores que la radiomarcación del ⁶⁷Ga con DOTA [98, 99].

Luego de no obtener resultados positivos en la radiomarcación del Sgc8-c-NH₂-DOTA, se procedió a realizar un estudio de farmacocinética con el conjugado radiomarcado Sgc8-c-NH₂-NOTA [91]. En dicho estudio se obtuvo que el modelo

que mejor ajustó en este caso fue el modelo bicompartimental. Fue posible observar una fase inicial de depuración sanguínea muy rápida con una fase final de depuración lenta. Según el valor del porcentaje de eliminación por orina, podemos afirmar que ésta no sería la única vía de eliminación del Sgc8-c-NH₂-NOTA. Este estudio no asegura que la señal observada se deba solamente al Sgc8-c-NH₂-NOTA original, podría deberse a la señal de dicho conjugado sumado a la presencia de metabolitos que se podrían haber formado en el proceso dentro del organismo. Se intentó cuantificar la cantidad de Sgc8-c-NH₂-NOTA en orina mediante RP-HPLC pero la baja concentración de dicho conjugado en el volumen relativamente grande de orina obtenido y los componentes propios de la orina, hicieron imposible la obtención del pico característico del Sgc8-c-NH₂-NOTA.

En cuanto a la vehiculización, en el estudio de los tamaños de partículas y potenciales Z, en todos los casos se observan tamaños de partículas similares a los de los vehículos solos. No se encuentran poblaciones con tamaños diferentes (similares a los tamaños de partícula del Sgc8-c-NH₂ sin vehiculizar), por lo que se puede pensar que la encapsulación del aptámero fue exitosa con los respectivos vehículos utilizados.

Observando los potenciales Z, se observa que el del Sgc8-c-NH₂ es bastante negativo, y al estudiar el Sgc8-c-NH₂ vehiculizado, no se ve gran diferencia en los potenciales comparados con los de los vehículos sin aptámero, otro indicio que indicaría que el Sgc8-c-NH₂ está ocluido dentro de los vehículos.

Sin embargo, estos datos no son suficientes para comprobar el éxito en la vehiculización del aptámero, quedan pendientes a futuro, realizar estudios como espectrofotometría RMN, microscopia MET, que podrían aportar datos interesantes al estudio.

En la prueba de liofilización-resuspensión, se observa claramente que las CDs y las MPs, no presentan problemas a la hora de ser liofilizadas y conservadas de esta forma. Con respecto a la estabilidad del aptámero a distintos pH, no se observa la degradación del Sgc8-c-NH₂ en ninguno de los pH con el correr del tiempo. Con respecto al tipo de filtro, se evidencia que el filtro de mixtos de celulosa es el más adecuado para la filtración del Sgc8-c-NH₂, ya que se observa

menos pérdida del mismo posteriormente a las filtraciones. Sin embargo, el filtro de nylon también se puede utilizar ya que la pérdida de Sgc8-c-NH₂, si bien es mayor a la del filtro de mix de celulosa, es mínima.

El estudio de vehiculización del Sgc8-c-NH₂ brinda una muy buena aproximación a lo que podría llegar a ser la vehiculización de los conjugados. Dicha vehiculización podría modificar los parámetros farmacocinéticos de los mismos, y a su vez, podrían llegar a protegerlos de la degradación por nucleasas una vez en el interior biológico, por lo que aún queda mucho trabajo para profundizar en estos temas.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró realizar la derivatización, caracterización y purificación del aptámero Sgc8-c con DOTA para ser evaluado como un potencial agente de imagenología molecular.

Si bien no se logró realizar la radiomarcación, se lograron optimizar las mejores condiciones de derivatización así como obtener buenas cantidades del conjugado.

Los estudios complementarios en ratas muestran parámetros farmacocinéticos interesantes en los que se deberá profundizar.

Se logró vehiculizar eficientemente Sgc8-c-NH₂ en todos los nanosistemas. Debido a los resultados satisfactorios de encapsulación de Sgc8-c-NH₂ en distintas nanoestructuras y la buena estabilidad de los sistemas en función del tiempo, se presentan las condiciones de avanzar hacia los ensayos con los conjugados, y probar en ensayos de biodistribución y farmacocinética.

A futuro, se deberá trabajar en la técnica de radiomarcación del conjugado, para conocer cuáles son las mejores condiciones de reacción.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Cancer Genetics Overview (PDQ®). Health Professional Version. PDQ Cancer Genetics Editorial Board. May 26, 2017.
3. www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es
4. AMERICAN CANCER SOCIETY, www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html
5. American Cancer Society. Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2012-2014. Atlanta: Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2012.
6. Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. PNAS, Vol. 103(32):11838-43
7. Alford, R.; Ogawa, M.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. (2009) Molecular probes for the in vivo imaging of cancer. Mol. Biosyst., Vol. 5(11):1279-91.
8. Chen Chen, Chang Qiang Wu, Tian Wu Chen, Meng Yue Tang, and Xiao Ming Zhang. (2015). Molecular Imaging with MRI: Potential Application in Pancreatic Cancer. BioMed Research International, 2015, 1-10.
9. Weissleder R, Mahmood U. (2001). Molecular imaging. Radiology, Vol. 219(2): 316-33.
10. Gang Liua, Magdalena Swierczewska, Seulki Lee, Xiaoyuan Chen. (2010). Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery. Nano Today, Vol. 5: 524—539.
11. Calzada V, María Moreno M, Newton J, González J, Fernández M, Gambini JP, Ibarra M, Chabalgoity A, Deutscher S, Quinn T, Cabral P, Cerecetto H. (2017) Development of new PTK7-targeting aptamer-fluorescent and - radiolabelled probes for evaluation as molecular imaging agents: Lymphoma and melanoma in vivo proof of concept. Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 25: 1163—1171.
12. Chen K, Chen X. (2010). Design and development of molecular imaging probes. Curr Top Med Chem, Vol. 10(12): 1227-36.
13. Ralph Weissleder y Mikael J. Pittet. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. NATURE, Vol. 452(3): 580-589
14. Thakur M, Lentle BC. (2005). Report of a summit on molecular imaging. Radiology. Vol. 236(3): 753—755.

15. James ML, Gambhir SS. (2012). A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*, Vol. 92(2): 897-965.
16. Marybeth A. Pysz, Sanjiv S. Gambhir, Jürgen K. Willmann. (2011). Molecular Imaging: Current Status and Emerging Strategies. *Clin Radiol.*, Vol. 65(7): 500–516
17. Zhi-Yi Chen, Yi-Xiang Wang, Yan Lin, Jin-Shan Zhang, Feng Yang, Qiu-Lan Zhou, and Yang-Ying Liao. (2014). Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy. *Biomed Res Int*. 819324
18. C.F. Meares', M.K. Moil,* H. Diril', D.L. Kukis', M.J. McCall', S.V. Deshpande², S.J. DeNardo², D. Snook³ & A.A. Epenetos³. (1990) Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br. J. Cancer. Suppl.*, Vol. (10): 21-6.
19. Shuang Liu y D. Scott Edwards. (2001). Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem*, Vol. (12): 7-34.
20. Cristina Müller, Iontcho R. Vlahov, Hari Krishna R. Santhapuram, Christopher P. Leamon, Roger Schiblia. (2011). Tumor targeting using 67Ga-DOTA-Bz-folate — investigations of methods to improve the tissue distribution of radiofolates. *Nuclear Medicine and Biology*, Vol. 38: 715–723.
21. Rachel Bar-Shalom, Nikolai Yefremov, Nissim Haim, Eldad J. Dann, Ron Epelbaum, Zohar Keidar, Diana Gaitini, Alex Frenkel, DSc Ora Israel. (2003). Camera-based FDG PET and 67Ga SPECT in Evaluation of Lymphoma: Comparative Study¹ *Radiology*, Vol. 227: 353–360.
22. Shih-Chuan Tsai, Tsu-Yi Hsieh, Ping-Wun Huang, y Wan-Yu Lin. (2016). Absolute Quantitative Evaluation of 67Ga Scintigraphy in Lupus Nephritis. *Clin Nucl Med*, Vol. 41: 442–446
23. Haixun Guo, Jianquan Yang, Nalini Shenoy, and Yubin Miao. (2009). Gallium-67-Labeled Lactam Bridge-Cyclized Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide for Primary and Metastatic Melanoma Imaging. *Bioconjug Chem*, Vol. 20(12): 2356–2363

24. Chengcheng Zhang, Kuo-Shyan Lin, and François Bénard, MD. (2017). Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor. *Mol Imaging*, Vol 16: 1536012117737919.
25. Hussein M. Abdel-Dayem, Andrew Scott, Homer Macapinlac, Steven Larson. (1994). Tracer imaging in lung cancer. *Eur J Nucl Med*, Vol. 21: 57-81
26. Buscombe JR, Bombardieri E. (2005). Imaging cancer using single photon techniques. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, Vol. 49(2): 121-31.
27. Muhamad F. bin Othman, Nabil R. Mitry, Valerie J. Lewington, Philip J. Blower, Samantha Y.A. Terry. (2017) Re-assessing gallium-67 as a therapeutic radionuclide. *Nuclear Medicine and Biology*, Vol. 46: 12–18.
28. Anderson, C. J., and Welch, M. J. (1999) Radiometal labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. *Chem. Rev.*, Vol. 99: 2219-2234.
29. Blower, P., J., Lewis, J. S., and Zweit, J. (1996) Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nucl. Med. Biol.* Vol. 23: 957-980
30. Quadri, S. M. y Vriesendorp, H. M. (1998) Effects of linker chemistry on pharmacokinetics of radioimmunoconjugates. *Q. J. Nucl. Med.* Vol. 42: 250-261
31. Shuang Liu. (2004). The role of coordination chemistry in the development of targetspecific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 33: 445-461
32. Marques, M.P.; Garakdes, C.F; Sherry, A.D.; Merbach, A.E.; Powell, H.; Pubanz, D.; Aime, S.; Botta, M. (1995) NMR conformational study of the lanthanide(III) complexes of DOTA in aqueous solution. *J. Alloy Compd.*, Vol(1-2)303-307
33. Kovacs L, Tassano M, Cabrera M, Zamboni CB, Fernández M, Anjos RM, Cabral P. (2015). Development of ¹⁷⁷Lu-DOTA-Dendrimer and Determination of Its Effect on Metal and Ion Levels in Tumor Tissue. *Cancer Biother Radiopharm.*, Vol. 30(10): 405-409
34. Lewis MR, Kao JY, Anderson AL, Shively JE, Raubitschek A. (2001). An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjug Chem.* Vol. 12(2): 320-324.

35. Byegård G J, Skarnemark M G, Skålberg M. (1999). The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol.241(2): 281-290
36. Hassan Y, Edalat R, Reza J, Ali B-S, Simindokht S-A, Azim A, Mohammad G-M. (2011). Development of ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 for radioimmunotherapy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 287(1): 199-209
37. Banerjee S, Das T, Chakraborty S, Samuel G, Korde A, Srivastava S, Venkatesh M, Pillai MR. (2004). ¹⁷⁷Lu-DOTA-Ianreotide: a novel tracer as a targeted agent for tumor therapy. *Nucl Med Biol.*, Vol. 31(6): 753-759
38. Rockey WM, Huang L, Kloepping KC, Baumhover NJ, Giangrande PH, Schultz MK. (2011). Synthesis and radiolabeling of chelator-RNA aptamer bioconjugates with copper-64 for targeted molecular imaging. *Bioorg Med Chem.* Vol. 19(13): 4080-4090
39. Li J, Zheng H, Bates PJ, Malik T, Li XF, Trent J2, Ng CK. (2014). Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: preliminary assessment in lung cancer. *Nucl Med Biol.* Vol.41(2): 179-185
40. Ramogida CF, Cawthray JF, Boros E, Ferreira CL, Patrick BO, Adam MJ, Orvig C. (2015). H₂CHXdedpa and H₄CHXoctapa-chiral acyclic chelating ligands for (^{67/68}Ga and (¹¹¹In radiopharmaceuticals. *Inorg Chem*, Vol. 54(4): 2017-2031
41. Ray Banerjee S, Chen Z, Pullambhatla M, Lisok A, Chen J, Mease RC, Pomper MG. (2016). Preclinical Comparative Study of ⁶⁸Ga-Labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC Chelated Radiotracers for Targeting PSMA. *Bioconjug Chem.*, Vol. 27(6): 1447-1455
42. Ferreira CL, Yapp DT, Mandel D, Gill RK, Boros E, Wong MQ, Jurek P, Kiefer GE. (2012). (⁶⁸Ga small peptide imaging: comparison of NOTA and PCTA. *Bioconjug Chem.*, Vol. 23(11): 2239-2246
43. Valdovinos HF, Hernandez R, Graves S, Ellison PA, Barnhart TE, Theuer CP, Engle JW, Cai W, Nickles RJ. (2017). Cyclotron production and radiochemical separation of ⁵⁵Co and ^{58m}Co from ⁵⁴Fe, ⁵⁸Ni and ⁵⁷Fe targets. *Appl Radiat Isot.*, Vol. 130: 90-101

44. Lyu Y, Chen G, Shangguan D, Zhang L, Wan S, Wu Y, Zhang H, Duan L, Liu C, You M, Wang J, Tan W. (2016). Generating Cell Targeting Aptamers for Nanotheranostics Using Cell-SELEX. *Theranostics*, Vol. 6(9): 1440-1452
45. Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, Schmidt PG. (2006). Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med.*, Vol. 47(4): 668-678
46. Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. (2016). Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem.*, Vol. 408(17): 4567-4573
47. Juntao Tan, Nuo Yang, Zixi Hu, Jing Su, Jianhong Zhong, Yang Yang, Yating Yu, Jianmeng Zhu, Dabin Xue, Yingying Huang, Zongqiang Lai, Yong Huang, Xiaoling Lu y Yongxiang Zhao. (2016). Aptamer-Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells. *Nanoscale Res Lett.* Vol. 11: 298
48. Famulok M, Mayer G. (1999). Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol.*, Vol.243: 123-136
49. Tuerk C., Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage t4 DNA polymerase. *Science*, Vol. 249: 505–510
50. Thiel KW, Giangrande PH. (2009). Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*, Vol. 19(3): 209-222
51. Víctor M. González, M. Elena Martín, Gerónimo Fernández y Ana García-Sacristán. (2016). Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. *Pharmaceuticals (Basel)*, Vol. 9(4): 78
52. Friedman AD, Kim D, Liu R. (2015). Highly stable aptamers selected from a 2'-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials. *Biomaterials*. Vol. 36: 110-123
53. García-Recio EM, Pinto-Díez C, Pérez-Morgado MI, García-Hernández M, Fernández G, Martín ME, González VM. (2016). Characterization of MNK1b DNA Aptamers That Inhibit Proliferation in MDA-MB231 Breast Cancer Cells. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, Vol. 5: e275
54. Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. (2010). Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc*, Vol. 5(6): 1169-1185

55. Shangguan D, Cao Z, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, Li Y, Tan W. (2008). Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *Proteome Res.*, Vol. 7(5): 2133-2139
56. Yazdian-Robati R, Arab A, Ramezani M, Abnous K, Taghdisi SM. (2017). Application of aptamers in treatment and diagnosis of leukemia. *Int J Pharm.*, Vol. 529(1-2): 44-54
57. Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, Chen Y, Tan W. (2009). Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem*, Vol.10(5): 862-868
58. Shangguan D, Tang Z, Mallikaratchy P, Xiao Z, Tan W. (2007). Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *Chembiochem*, Vol. 8(6): 603-606
59. Grassot J, Gouy M, Perrière G, Mouchiroud G. (2006). Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. *Mol Biol Evol.*, Vol. 23(6): 1232-1241
60. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, Vol. 298(5600): 1912-1934.
61. Sun C, Bernards R. (2014). Feedback and redundancy in receptor tyrosine kinase signaling: relevance to cancer therapies. *Trends Biochem Sci.*, Vol. 39(10): 465-474.
62. Hubbard SR, Till JH. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.*, Vol. 69: 373-398.
63. Mitch Kostich, Jessie English, Vincent Madison, Ferdous Gheyas, Luquan Wang, Ping Qiu, Jonathan Greene, Thomas M Laz. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol.* Vol. 3(9): 0043.1–0043.12.
64. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, Vol. 411(6835):355-65
65. Dong Y, Chen X, Li H, Ni Y, Han W, Wang J. (2017). PTK7 is a molecular marker for metastasis, TNM stage, and prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol.* Vol. 68(1): 49-54
66. Jiang G, Zhang M, Yue B, Yang M, Carter C, Al-Quran SZ, Li B, Li Y. (2012). PTK7: a new biomarker for immunophenotypic characterization of

- maturing T cells and T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, Vol.36(11): 1347-1353
67. Lhoumeau AC, Martinez S, Boher JM, Monges G, Castellano R, Goubard A, Doremus M, Poizat F, Lelong B, de Chaisemartin C, Bardin F, Viens P, Raoul JL, Prebet T, Aurrand-Lions M, Borg JP, Gonçalves A. (2015). Overexpression of the Promigratory and Prometastatic PTK7 Receptor Is Associated with an Adverse Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *PLoS One*, Vol. 10(5): e0123768
68. Shin WS, Na HW, Lee ST. (2015). Biphasic effect of PTK7 on KDR activity in endothelial cells and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1853: 2251-2260
69. Kang Liu, Guiqin Song, Xuqian Zhang, Qiujiang Li, Yunxia Zhao, Yuchuan Zhou, Rong Xiong, Xin Hu, Zhirong Tang, and Gang Feng. (2017). PTK7 is a novel oncogenic target for esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol.*, Vol. 15: 105.
70. Xu B, Washington AM, Domeniconi RF, Ferreira Souza AC, Lu X, Sutherland A, Hinton BT. (2016). Protein tyrosine kinase 7 is essential for tubular morphogenesis of the Wolffian duct. *Dev Biol.*, Vol. 412(2):219-33.
71. Gärtner S, Gunesch A, Knyazeva T, Wolf P, Högel B, Eiermann W, Ullrich A, Knyazev P, Ataseven B.(2014). PTK 7 is a transforming gene and prognostic marker for breast cancer and nodal metastasis involvement. *PLoS One*, Vol. 9(1): e84472
72. Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, Chen Y, Zhou L, Tan W. (2010). Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. *PLoS One*, Vol. 5(11):e14018
73. Jing Jin, Han Suk Ryu, Kyoung Bun Lee, and Ja-June Jang. (2014). High Expression of Protein Tyrosine Kinase 7 Significantly Associates with Invasiveness and Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *PLoS One*, Vol. 9(2): e90247
74. Prebet T, Lhoumeau AC, Arnoulet C, Aulas A, Marchetto S, Audebert S, Puppo F, Chabannon C, Sainty D, Santoni MJ, Sebbagh M, Summerour V, Huon Y, Shin WS, Lee ST, Esterni B, Vey N, Borg JP. (2010). The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic

- response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood*, Vol. 116(13): 2315-2323
75. Liu B, Zhang J, Liao J, Liu J, Chen K, Tong G, Yuan P, Liu Z, Pu Y, Liu H. (2014). Aptamer-functionalized nanoparticles for drug delivery. *J Biomed Nanotechnol*, Vol. 10(11): 3189-3203
76. Zhang J, Liu B, Liu H, Zhang X, Tan W. (2013). Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. *Nanomedicine (Lond)*, Vol.8(6): 983-993
77. Lönne M, Zhu G, Stahl F, Walter JG. (2014). Aptamer-modified nanoparticles as biosensors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Vol. 140: 121-154
78. Reinemann C, Strehlitz B. (2014). Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med Wkly*, Vol. 144: w13908
79. Yüce M, Ullah N, Budak H. (2015). Trends in aptamer selection methods and applications. *Analyst*, Vol. 140(16): 5379-5399
80. Xiao Z, Farokhzad OC. (2012). Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS Nano.*, Vol. 6(5):3670-3676
81. Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. (2010). Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol*, Vol.27(7): 286-298
82. Croy SR, Kwon GS. (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm Des*, Vol.12(36): 4669-4684
83. Hyunah Cho, Tsz Chung Lai, Keishiro Tomoda, Glen S. Kwon. (2015). Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer. *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16(1): 10–20
84. Glisoni RJ, Sosnik A. (2014) Encapsulation of the Antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Vol. 14, 4670-4682
85. Baek SE¹, Lee KH¹, Park YS², Oh DK¹, Oh S³, Kim KS⁴, Kim DE⁵. (2014). RNA aptamer-conjugated liposome as an efficient anticancer drug delivery vehicle targeting cancer cells in vivo. *J Control Release*, Vol. 196: 234-242

86. Yu B1, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. (2010). Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol.*, Vol. 27(7): 286-298
87. Zerkoune L, Angelova A, Lesieur S. (2014). Nano-Assemblies of Modified Cyclodextrins and Their Complexes with Guest Molecules: Incorporation in Nanostructured Membranes and Amphiphile Nanoarchitectonics Design. *Nanomaterials (Basel)*, Vol. 4(3): 741-765
88. Kurkov SV, Loftsson T. (2013). Cyclodextrins. *Int J Pharm*, Vol. 453(1): 167-80
89. Abdalla H. Karoyo, Lee D. Wilson. (2015). Nano-Sized Cyclodextrin-Based Molecularly Imprinted Polymer Adsorbents for Perfluorinated Compounds—A Mini-Review. *Nanomaterials (Basel)*, Vol 5(2): 981–1003
90. Glisoni RJ, Chiappetta DA, Moglioni AG, Sosnik. (2012) A. Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: Aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharmaceutical Research*, Vol. 29: 739-755.
91. Estefanía Sicco, Jessica Báez, Jimena Margenat, Fernanda García, Manuel Ibarra, Pablo Cabral, María Moreno, Hugo Cerecetto, Victoria Calzada. (2017). “Derivatizations of Sgc8-c aptamer to prepare metallic radiopharmaceuticals as imaging diagnostic agents: Syntheses, isolations and physicochemical characterizations”. *Chemical Biology & Drug Design*.
92. Glisoni RJ, Sosnik A. (2014). Novel Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. *Macromolecular Bioscience*. Vol.14: 1639-1651
93. Walhan Alshaera, Hervé Hillaireau, Juliette Vergnaud, Simona Mura, Claudine Deloménie, Félix Sauvage, Said Ismail, Elias Fattal. (2017). Aptamer-guided siRNA-loaded nanomedicines for systemic gene silencing in CD-44 expressing murine triple-negative breast cancer model. *Journal of Controlled Release*. Vol.271: 98-106
94. Calzada V. (2015). Nuevas Estrategias de Imagenología Molecular en Cáncer. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

95. Karl Plössl, Rajesh Chandra, Wenchao Qu, Brian P. Lieberman, Mei-Ping Kung, Rong Zhou, Bin Huang, Hank F. Kung. (2008). A novel gallium bisaminothiolate complex as a myocardial perfusion imaging agent. *Nucl Med Biol.*, Vol. 35(1): 83–90
96. Anu Autio, Antti Saraste, Nobuyuki Kudomi, Tiina Saanijoki, Jarkko Johansson, Heidi Liljenbäck, Miikka Tarkia, Vesa Oikonen, Hannu T Sipilä, Anne Roivainen. (2014). Assessment of blood flow with ⁶⁸Ga-DOTA PET in experimental inflammation: a validation study using ¹⁵O-water. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, Vol. 4(6): 571-579
97. Behrooz Alirezapour, Amir R. Jalilian, Fatemeh Bolourinovin, Sedigheh Moradkhani. (2012). Production and Quality Control of [⁶⁷Ga]-DOTA-trastuzumab for Radioimmunoscinigraphy. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 12(2): 355-366
98. J W Engle, V Lopez-Rodriguez, R E Gaspar-Carcamo, H F Valdovinos, M Valle- Gonzalez, F Trejo-Ballado, G W Severin, T E Barnhart, R J Nickles, M A Avila-Rodriguez. Very high specific activity ^{66/68}Ga from zinc targets for PET. *Appl Radiat Isot.*, Vol. 70(8): 1792–1796
99. Krzysztof Kilian. (2014). ⁶⁸Ga-DOTA and analogs: Current status and future perspectives. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, Vol.19(2014): S13–S21

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primeramente al Dr. Hugo Cerecetto, quien me abrió las puertas de su laboratorio haciendo posible la realización de mi tesis, por su apoyo y confianza.

A mis tutores, la Dra. Victoria Calzada y el Dr. Manuel Ibarra por guiarme en este camino, por su confianza, conocimiento, por su gran paciencia y por todo el apoyo y dedicación que me brindaron.

A la Dra. Romina Glisoni, por haberme recibido tan gratamente y con tanto cariño en su laboratorio en Buenos Aires y por siempre brindarme su ayuda cuando la necesito.

A mi familia, muy especialmente a mi madre, por todo su esfuerzo para que pueda realizar mi carrera, por su apoyo y amor incondicional de siempre.

A Luis, por su amor, por ser mi gran compañero, quien siempre tiene lindas palabras y me ha acompañado durante este proceso haciendo que todo sea más fácil.

A la familia de Luis, en especial a Ana, por su cariño, por ayudarme a no bajar los brazos y enseñarme a mirar siempre hacia adelante.

A mis amigos, que me acompañaron en todo momento.

A todos mis compañeros de laboratorio sobre todo a Estefanía, Jimena, Carolina, Carina y Belén por hacer todo esto mucho más ameno y divertido.

10. ANEXO

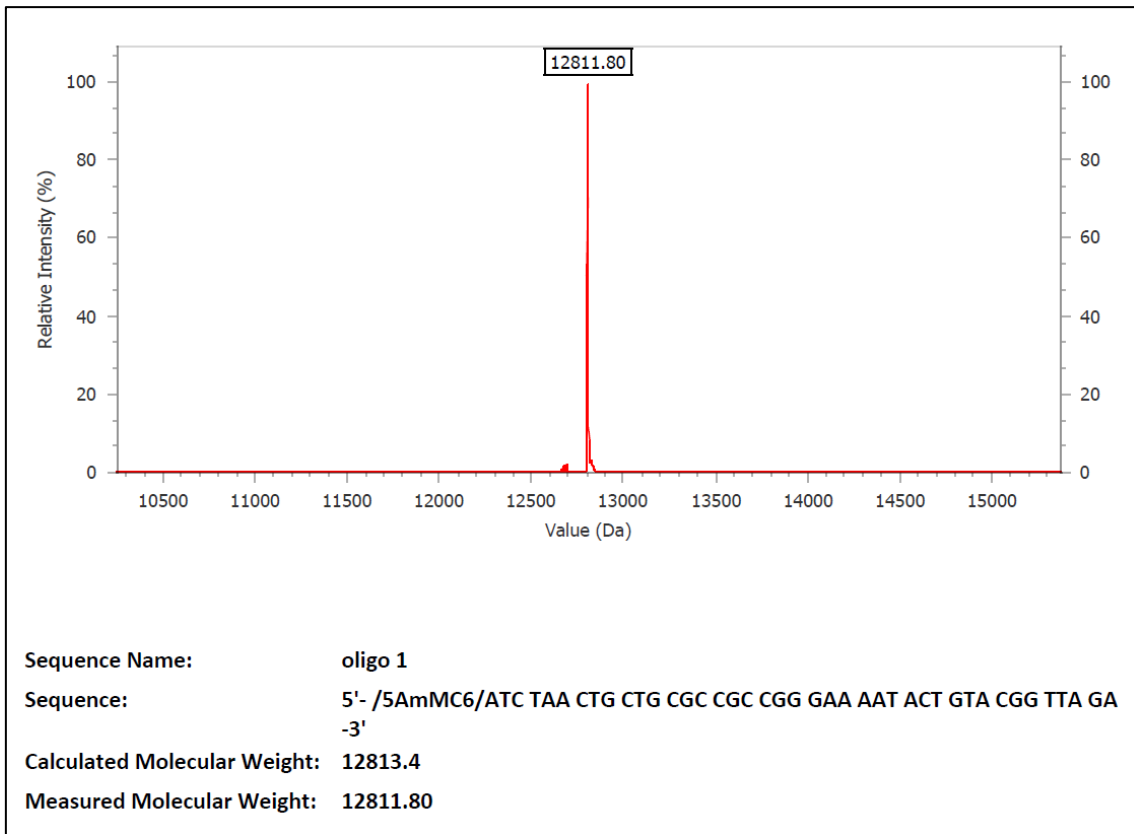


Figura A1. Espectro de masas del Sgc8-c-NH₂ suministrado por IDT.

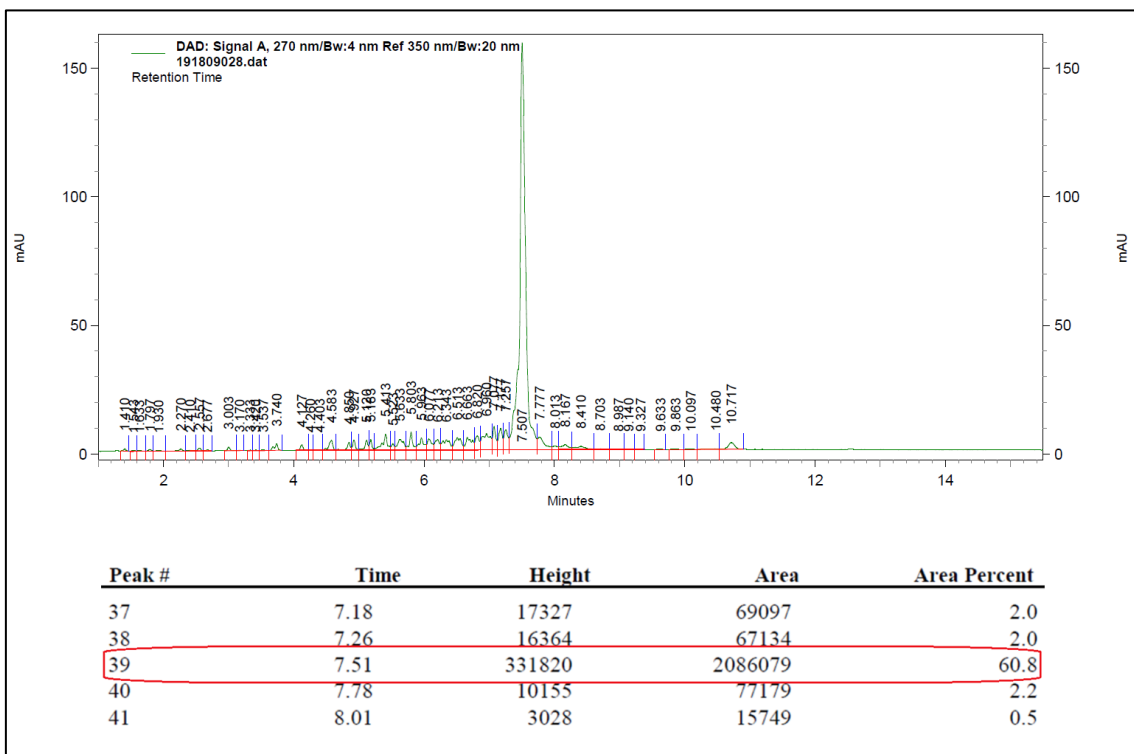


Figura A2. Pureza del Sgc8-c-NH₂ reportada por el fabricante.

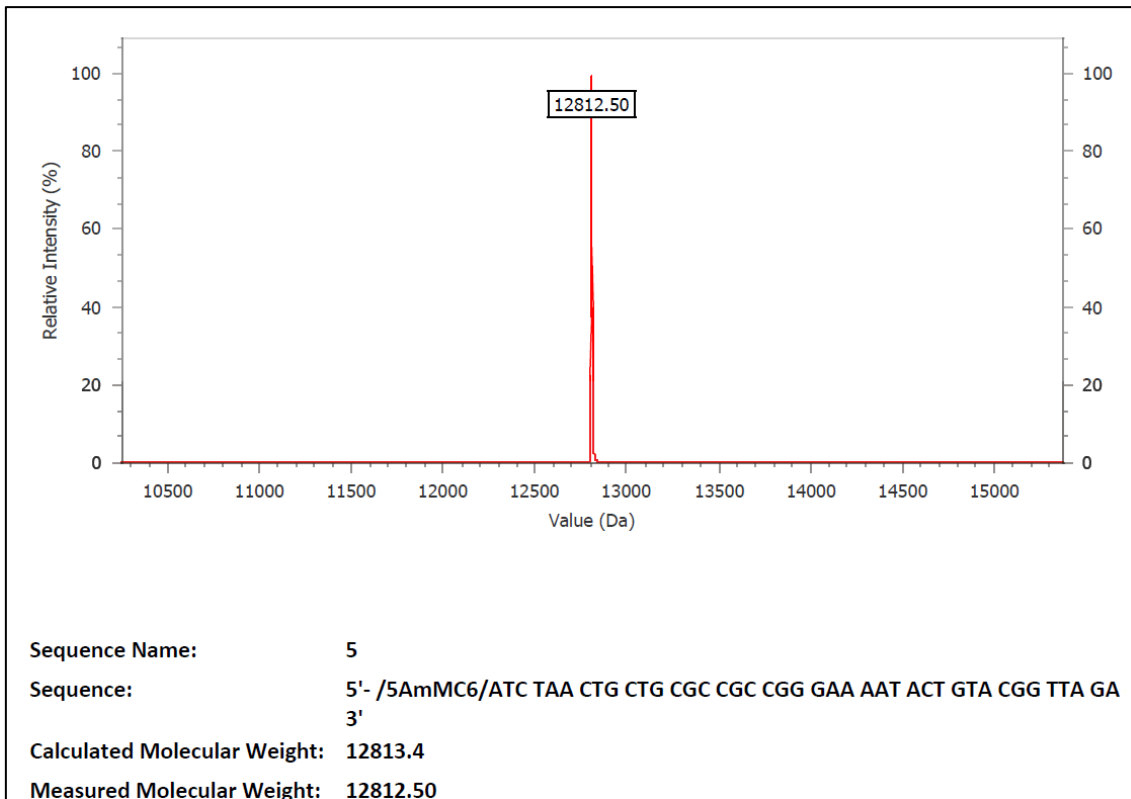


Figura A3. Espectro de masas de Sgc8c-NH₂ sin conjugar en la reacción de derivatización con DOTA.

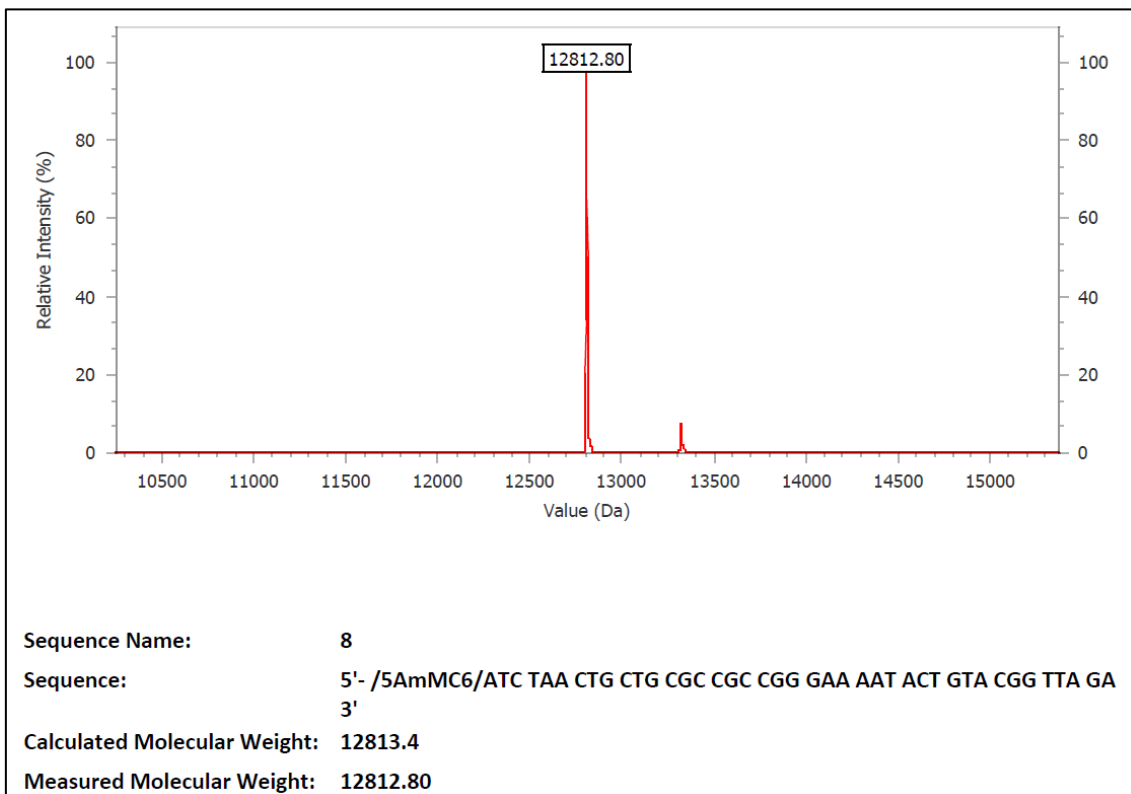


Figura A4. Espectro de masas de Sgc8c-NH₂ sin conjugar en la reacción de derivatización con NOTA.