



**IOSUD-UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ “CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR”**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

*Dezvoltarea de nanoparticule structurate marcate cu radionuclizi și caracterizarea biologică a acestora pentru aplicații în medicina nucleară*

**Autor:**

**Fiz. Med. CHILUG Elena Livia**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Dr. Ing. LAVRIC Vasile**

## **COMISIA DE DOCTORAT**

Președinte	Prof. Dr. Ing. Ioan Călinescu	de la	Universitatea “Politehnica” din București
Conducător de doctorat	Prof. Dr. Ing. Vasile Lavric	de la	Universitatea “Politehnica” din București
Referent	Prof. Dr. Doina Drăgănescu	de la	Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila”
Referent	CS I, Dr. Gina Manda	de la	Institutul Național de C-D în domeniul Patologiei și a Științelor Biomedicale “Victor Babeș”
Referent	Prof. Dr. Ing. Costin Sorin Bîldea	de la	Universitatea “Politehnica” din București

**BUCUREȘTI**  
**2020**



## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> .....	<b>7</b>
<b>CAPITOLUL 1 RADIOFARMACEUTICELE</b> .....	<b>9</b>
1.1 RADIOIZOTOPI .....	9
1.1.1 <b>Timpul de înjumătățire</b> .....	10
1.1.2 <b>Emisie</b> .....	10
1.1.2.1 <i>Dezintegrarea <math>\alpha</math></i> .....	10
1.1.2.2 <i>Dezintegrarea <math>\beta^-</math></i> .....	10Error! Bookmark not defined.
1.1.2.3 <i>Dezintegrarea <math>\beta^+</math></i> .....	11
1.1.2.4 <i>Captura de electroni</i> .....	11
1.1.2.5 <i>Dezintegrarea gama și conversia de electroni</i> .....	11
1.1.3 <b>Modalități de producere</b> .....	12
1.1.3.1 <i>Radioizotopi produși în reactorul nuclear</i> .....	12
1.1.3.2 <i>Radioizotopi produși la acceleratoarele de particule</i> .....	12
1.1.3.3 <i>Generatorul de radioizotopi</i> .....	13
1.1.3.4 <i>Generatorul de <math>^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}</math></i> .....	14
1.2 CERINȚE PENTRU PREPARAREA ȘI CONTROLUL DE CALITATE AL RADIOFARMACEUTICELOR..	16
1.2.1 <b>Prepararea radiofarmaceuticelor</b> .....	16
1.2.1.1 <i>Personalul</i> .....	16
1.2.1.2 <i>Parametri de mediu și echipamente</i> .....	17
1.2.1.3 <i>Procesul</i> .....	17
1.2.2 <b>Controlul de calitate al radiofarmaceuticelor</b> .....	17
1.3 APLICAȚIILE RADIOFARMACEUTICELOR: TOMOGRAFIA PRIN EMISIE DE POZITRONI (PET).....	18
<b>CAPITOLUL 2 NANOPARTICULELE DIN AUR</b> .....	<b>21</b>
2.1 METODE DE PRODUCERE .....	21
2.2 CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR DIN AUR .....	25
2.2.1 <b>Caracteristicile principale ale nanoparticulelor din aur</b> .....	25
2.2.1.1 <i>Rezonanța plasmonică de suprafață localizată</i> .....	25
2.2.1.2 <i>Conductivitatea fototermică</i> .....	26
2.2.1.3 <i>Fotosensibilizarea</i> .....	26
2.2.1.4 <i>Fluorescența de suprafață amplificată</i> .....	26
2.2.1.5 <i>Împrăștiere Raman de suprafață amplificată</i> .....	26
2.2.2 <b>Metoda de împrăștiere dinamică a luminii (DLS)</b> .....	28
2.2.3 <b>Microscopia electronică prin transmisie (TEM)</b> .....	29
2.2.4 <b>Stabilitatea coloidală - Potențialul zeta <math>\zeta</math></b> .....	31
2.2.5 <b>Spectroscopia prin atenuarea reflexiei totale (ATR)</b> .....	33
2.3 APLICAȚII ALE NANOPARTICULELOR DIN AUR ÎN MEDICINA NUCLEARĂ.....	34
2.3.1 <b>Metode de marcarea cu radioizotopi</b> .....	34
2.3.2 <b>Aplicații ale AuNP în imagistica PET</b> .....	36
2.3.3 <b>Aplicații ale AuNP în imagistica SPET</b> .....	38
2.3.4 <b>Aplicații ale AuNP în radioterapie</b> .....	39
<b>CAPITOLUL 3 BIODISTRIBUȚIA NANOPARTICULELOR DIN AUR</b> .....	<b>42</b>
3.1 INTERACȚIA NANOPARTICULELOR DIN AUR CU COMPONENTELE SÂNGELUI ....	42
3.1.1 <b>Interacția AuNP cu eritrocitele</b> .....	42

3.1.2	<b>Interacția AuNP cu leucocitele</b> .....	43
3.1.3	<b>Interacția AuNP cu trombocitele</b> .....	43
3.1.4	<b>Interacția AuNP cu proteinele serice</b> .....	43
3.2	<b>DISTRIBUȚIA NANOPARTICULELOR DIN AUR ÎN ORGANE</b> .....	44
3.2.1	<b>Efectul de permeabilitate și retenție crescută</b> .....	44
3.2.2	<b>Eliminarea prin rinichi</b> .....	45
3.2.3	<b>Eliminarea prin ficat</b> .....	46
3.2.4	<b>Eliminarea prin splină</b> .....	47
3.3	<b>OPTIMIZAREA STRUCTURII NANOPARTICULELOR DIN AUR</b> .....	47
3.3.1	<b>Dimensiunea nanoparticulelor</b> .....	47
3.3.2	<b>Proprietățile chimice</b> .....	48
3.3.3	<b>Forma</b> .....	48
<b>CHAPTER 4 STUDIILE PRECLINICE ALE RADIOFARMACEUTICELOR CARE UTILIZEAZĂ NANOPARTICULE DIN AUR</b> .....		<b>49</b>
4.1	<b>STUDIUL <i>IN VITRO</i> AL CINETICII DE LEGARE A NANOPARTICULELOR DIN AUR FUNCȚIONALIZATE CU PEPTIDE CONJUGATE CU <sup>68</sup>GA-DOTA</b> .....	49
4.1.1	<b>Introducere</b> .....	49
4.1.2	<b>Experimental</b> .....	50
4.1.2.1	<i>Sinteza nanoparticulelor din aur</i> .....	50
4.1.2.2	<i>Caracterizarea nanoparticulelor</i> .....	51
4.1.2.3	<i>Marcarea peptidelor cu radioizotopul <sup>68</sup>Ga și controlul de calitate</i> .....	51
4.1.2.4	<i>Conjugarea <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-NT și <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC la AuNP</i> .....	51
4.1.2.5	<i>Cultivarea celulelor</i> .....	52
4.1.2.6	<i>Studiul in vitro al cineticii de legare</i> .....	52
4.1.3	<b>Rezultate și discuții</b> .....	53
4.1.3.1	<i>Nanoparticles characterization</i> .....	53
4.1.3.2	<i>Synthesis and quality control</i> .....	53
4.1.3.3	<i>Gold nanoparticles functionalization evaluation</i> .....	54
4.1.3.4	<i>Uptake and retention assay</i> .....	55
4.1.4	<b>Concluzii</b> .....	57
4.2	<b>EVALUAREA PRECLINICĂ A NANOPARTICULELOR DIN AUR ACTIVATE CU GRUPĂRI -NHS ȘI FUNCȚIONALIZATE CU PEPTIDE TIP BOMBEZINĂ ȘI NEUROTENSINĂ PENTRU ȚINTIREA TUMORILOR DE COLON ȘI PROSTATĂ</b> .....	58
4.2.1	<b>Introducere</b> .....	58
4.2.2	<b>Rezultate</b> .....	59
4.2.2.1	<i>Marcarea peptidelor</i> .....	59
4.2.2.2	<i>Controlul de calitate al peptidelor marcate cu <sup>68</sup>Ga</i> .....	60
4.2.2.3	<i>Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor din aur funcționalizate cu peptide</i> ....	60
4.2.2.4	<i>Evaluarea citotoxicității</i> .....	62
4.2.2.5	<i>Evaluarea legării in vitro</i> .....	62
4.2.2.6	<i>Biodistribuția ex vivo</i> .....	65
4.2.3	<b>Discuții</b> .....	68
4.2.4	<b>Materiale și Metode</b> .....	69
4.2.4.1	<i>Marcarea peptidelor</i> .....	70
4.2.4.2	<i>Controlul de calitate al peptidelor marcate cu <sup>68</sup>Ga</i> .....	70
4.2.4.3	<i>Funcționalizarea Nanoparticulelor</i> .....	70
4.2.4.4	<i>Caracterizarea fizico-chimică</i> .....	71
4.2.4.5	<i>Cultivarea celulelor tumorale și pregătirea vaselor Petri</i> .....	72
4.2.4.6	<i>Investigarea citotoxicității</i> .....	72

4.2.4.7	<i>Studiile de legare in vitro la celule tumorale</i> .....	73
4.2.4.8	<i>Biodistribuția ex vivo</i> .....	74
4.2.4.9	<i>Analiza statistică</i> .....	74
4.2.5	<b>Concluzii</b> .....	74
<b>CAPITOLUL 5 MODELAREA MATEMATICĂ A BIODISTRIBUȚIEI NANOPARTICULELOR DIN AUR</b> .....		<b>79</b>
5.1	<b>IPOTEZE PRINCIPALE ȘI MODELUL FIZIC</b> .....	80
5.1.1	<b>Inima</b> .....	82
5.1.2	<b>Artera dintre inimă și plămâni</b> .....	87
5.1.3	<b>Artera dintre inimă și ficat</b> .....	88
5.1.4	<b>Artera dintre inimă și stomac</b> .....	88
5.1.5	<b>Artera dintre inimă și splină</b> .....	89
5.1.6	<b>Artera dintre inimă și tumoare</b> .....	89
5.1.7	<b>Artera dintre inimă și rinichi</b> .....	90
5.1.8	<b>Plămâni</b> .....	90
5.1.9	<b>Plămâni la vena colectoare</b> .....	91
5.1.10	<b>Ficat</b> .....	92
5.1.11	<b>Ficat la vena colectoare</b> .....	93
5.1.12	<b>Stomac</b> .....	94
5.1.13	<b>Arteră stomac-ficat</b> .....	95
5.1.14	<b>Splină</b> .....	95
5.1.15	<b>Arteră splină-ficat</b> .....	96
5.1.16	<b>Tumoare</b> .....	97
5.1.17	<b>Tumoare la vena colectoare</b> .....	98
5.1.18	<b>Rinichi</b> .....	98
5.1.19	<b>Rinichi la vena colectoare</b> .....	99
5.1.20	<b>Vena colectoare</b> .....	100
5.2	<b>PARAMETRII DE INTRARE</b> .....	100
5.3	<b>REZULTATE ȘI DISCUȚII</b> .....	102
5.4	<b>CONCLUZII</b> .....	112
<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....		<b>113</b>
<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ</b> .....		<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....		<b>116</b>

## LISTA DE ABREVIERI ȘI ACRONIME

<b>AFM</b>	microscopia de forță atomică
<b>ALARA</b>	cel mai scăzut nivel rezonabil posibil (din engleză „ <i>As Low As Reasonably Achievable</i> ”)
<b>ANOVA</b>	analiza varianței unifactorială
<b>ATR</b>	atenuarea reflexiei totale
<b>BBRS</b>	receptori de bombezină subtip
<b>CT</b>	tomografie computerizată
<b>DMEM</b>	mediu de creștere celulară Eagle modificat de Dulbecco
<b>DOTA</b>	acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic
<b>EANM</b>	Asociația Europeană de Medicină Nucleară (din engleză „ <i>European Association of Nuclear Medicine</i> ”)
<b>EC</b>	captură de electroni
<b>EMA</b>	Agenția Europeană a Medicamentului (din engleză „ <i>European Medicines Agency</i> ”)
<b>EU</b>	Uniunea Europeană
<b>FDA</b>	Administrația Alimentelor și a Medicamentelor din Statele Unite (din engleză „ <i>U.S. Food and Drug Administration</i> ”)
<b>FDG</b>	fluorodezoxiglucoză
<b>FT-IR</b>	spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier
<b>GC</b>	cromatografie de gaze
<b>GMP</b>	Buna Practică de Fabricație
<b>HPLC</b>	cromatografie lichidă de înaltă performanță
<b>IAEA</b>	Agenția Internațională pentru Energie Atomică (din engleză „ <i>International Atomic Energy Agency</i> ”)
<b>ICH</b>	Conferința Internațională de Armonizare (din engleză „ <i>International Conference on Harmonization</i> ”)
<b>ICRP</b>	Comisia Internațională pentru Protecția Împotriva Radiațiilor (din engleză „ <i>International Commission on Radiological Protection</i> ”)
<b>ICRU</b>	Comisia Internațională de Unități pentru Radiație (din engleză „ <i>International Commission on Radiation Units and Measurements</i> ”)
<b>IFIN-HH</b>	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei
<b>LAL</b>	lizat amebocitar limulus utilizat în testele de determinare a endotoxinelor bacteriene
<b>LET</b>	transfer liniar de energie
<b>LSPR</b>	rezonanța plasmonică de suprafață localizată
<b>NOC</b>	NaI <sup>3</sup> -octreotidă
<b>NODAGA</b>	acid 1,4,7-triazaciclononan,1-glutaric-4,7-acetic
<b>NOTA</b>	acid 1,4,7-triazaciclononan-N,N',N"-triacetic
<b>NTRS</b>	Receptor de neurotensină subtipul
<b>p.i.</b>	post-injectare
<b>PDT</b>	terapie fotodinamică
<b>PEG</b>	polietilen glicol
<b>PET</b>	tomoscintigrafie cu emisie pozitronică (din engleză „ <i>Positron Emission Tomography</i> ”)
<b>PTI</b>	imagistică fototermică
<b>PTT</b>	terapie fototermică
<b>SCX</b>	schimbător de cationi
<b>SEF</b>	fluorescență de suprafață îmbunătățită
<b>SEM</b>	microscopia electronică de baleiaj
<b>SES</b>	spectru de îmbunătățire a suprafeței

<b>SI</b>	sistemul internațional de unități (din franceză „ <i>Système international d'unités</i> ”)
<b>SOP</b>	proceduri standard de operare
<b>SPECT</b>	tomoscentigrafia cu emisie de fotoni individuali (din engleză „ <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i> ”)
<b>T<sub>1/2</sub></b>	timp de înjumătățire
<b>TAT</b>	terapie alfa țintită
<b>TLC</b>	cromatografie în strat subțire
<b>TOC</b>	Tyr <sup>3</sup> -octreotidă
<b>WBC</b>	celule albe sangvine

## MULȚUMIRI

Sunt deosebit de recunoscătoare conducătorului meu de doctorat Prof. Dr. Vasile Lavric, care m-a susținut îmi îndrumat în timpul studiilor doctorale. Acesta a fost foarte determinat să utilizez studiile experimentale efectuate pentru a modela matematic procesele fizico-chimice din organisme vii.

De asemenea, doresc să îi mulțumesc doamnei Dr. Dana Niculae din cadrul Centrului de Cercetări Radiofarmaceutice care m-a susținut în studiile de cercetare prezentare în teză, experimentele fiind efectuate sub atenta îndrumare a acesteia. Experiențele realizate pe parcursul studiilor doctorale s-au desfășurat în Centrul de Cercetare Radiofarmaceutică din cadrul Institutului Național de C-D pentru Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei (IFIN-HH). Îi mulțumesc doamnei Dr. Gina Manda pentru sfaturile constructive pe care mi le-a acordat în studiile *in vivo* efectuate. Nu în ultimul rând doresc să le mulțumesc colegilor din cadrul Departamentului de Știința Vieții și a Mediului din cadrul IFIN-HH care m-au ajutat să desfășor studii biologice pe modele animale.

## INTRODUCERE

Studiile care stau la baza acestei teze de doctorat se concentrează pe aplicarea nanoparticulelor din aur în medicina nucleară ca mijloc de distribuție pasivă și mediată de receptori a produselor radiofarmaceutice. În ultimul deceniu, necesitatea îmbunătățirii informațiilor obținute prin metode imagistice, împreună cu o mai bună țintire a tumorilor și un tratament mai eficient a dus la integrarea nanoparticulelor de aur în diagnosticul, imagistica și tratamentul cancerului. Proprietățile fizico-chimice ale nanoparticulelor de aur, cum ar fi: rezonanța plasmonică de suprafață localizată, conductivitatea fototermică, toxicitatea scăzută și suprafața mare disponibilă pentru funcționalizarea cu biomolecule, le fac foarte versatile pentru aplicații medicale. Distribuția în tumori a radiofarmaceuticelor care utilizează nanoparticule de aur se bazează pe două mecanisme: țintirea pasivă prin efectul de permeabilitate și retenție crescută al edoteliului vascular din jurul tumorii și distribuția activă utilizând molecule funcționalizate pe suprafața nanoparticulelor, care se leagă de receptori specifici supraexprimați de membranele celulelor tumorale. În plus, nanoparticulele metalice, cum ar fi nanoparticulele din aur, pot îmbunătăți contrastul în imagistica duală PET-CT.

Dezvoltarea produselor radiofarmaceutice care includ nanoparticulele în structurile lor este un proces laborios în care sunt luate în considerare nu numai cerințele Farmacopeei Europene (cum ar fi puritatea sau stabilitatea radiochimică), dar și obținerea nanostructurilor polidispersate, cu o acoperire care permite timpuri lungi de circulație în sânge, fără a fi recunoscute de sistemul imunitar, cu toxicitate scăzută și fără acumulare în țesuturile nevazate. Pornind de la aceste premise, prezenta teză descrie noi produse radiofarmaceutice pe bază de nanoparticule din aur funcționalizate cu peptide marcate cu izotopul emițător de pozitroni <sup>68</sup>Ga. Nanostructurile sintetizate au fost ulterior testate *in vitro* și *in vivo* pentru a evalua specificitatea

lor pentru receptorii de neurotensină și bombesină și capacitatea lor de a viza în mod specific cancerule de colon și de prostată. Posibilitatea de a utiliza date experimentale pentru a dezvolta în continuare un model matematic care poate prezice distribuția nanotrasorilor este deosebit de utilă. Aceasta este menită să optimizeze nanostructurile pentru a maximiza absorbția în tumoare, dar contribuie, de asemenea, la o evaluare mai precisă a procesului de direcționare în sânge a nanotrasorilor transportați către țesuturi.

Teza este structurată pe cinci capitole. Primele trei capitole sunt dedicate prezentării bazelor teoretice și a studiului de literatură. Ultimele două capitole sunt dedicate contribuțiilor personale la dezvoltarea nanostructurilor și aplicabilității în imagistica nucleară.

**Primul capitol** prezintă elementele fundamentale care stau la baza utilizării radioizotopilor corespunzători în medicina nucleară, împreună cu proprietățile acestora, pregătirea radiofarmaceuticelor și tehnica tomografiei cu emisie pozitronică (PET).

**Al doilea capitol** descrie metodele de sinteză utilizate până în prezent pentru prepararea și marcarea nanoparticulelor de aur cu radioizotopi, prezentarea proprietăților nanoparticulelor de aur și a principalelor tehnici de caracterizare. De asemenea, am inclus un studiu al literaturii cu privire la aplicarea acestor nanoparticule în medicina nucleară. Capitolul doi conține materiale din articolul propriu: „Gold nanoparticles-based radiopharmaceuticals for nuclear molecular imaging and therapy applications”, acceptat spre publicare în Buletinul Științific al UPB, Seria B.

**Al treilea capitol** se concentrează pe descrierea modalității de interacțiune a nanoparticulelor de aur cu celulele și organele, principalele căi de distribuție *in vivo*, eliminare și mijloacele prin care caracteristicile lor pot fi optimizate pentru o mai bună direcționare și un timp de înjumătățire biologic prelungit.

**Al patrulea capitol** prezintă două metode pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu peptide radiomarcate, aplicarea nanostructurilor sintetizate pe celulele tumorale de pancreas, colon și prostată și studii preclinice pe modele animale (șoareci imunosupresați). Capitolul patru conține materiale din următoarele publicații:

- “Preclinical evaluation of NHS-activated gold nanoparticles functionalized with bombesin or neurotensin-like peptides for targeting colon and prostate tumours”, *Molecules* (2020), vol. 25, 3363;
- “*In vitro* binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (2017), vol. 311, nr. 2, pp. 1485–1493.

**Ultimul capitol** tratează un model matematic nou, dezvoltat folosind datele experimentale obținute anterior, care se bazează pe echilibrul de masă al nanotrasorului în șapte organe importante: inimă, rinichi, plămâni, tumoare, ficat, splină și stomac. De asemenea, modelul matematic calculează profilul de distribuție a trasorului în sângele care curge prin țesutul acestor organe.

Teza se încheie cu concluziile generale ale experimentelor efectuate și cu prezentarea perspectivelor pentru dezvoltarea ulterioară.

Rezultatele cercetării prezentate în această teză au fost publicate în articole științifice în reviste indexate în sistemul ISI-Clarivate Analytics și/sau comunicate la conferințe internaționale, după cum urmează:

1. “Preclinical evaluation of NHS-activated gold nanoparticles functionalized with bombesin or neurotensin-like peptides for targeting colon and prostate tumours”, *Molecules* (2020), vol. 25, 3363;
2. “*In vitro* binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (2017), vol. 311, nr. 2, pp. 1485–1493
3. “Gold nanoparticles-based radiopharmaceuticals for nuclear molecular imaging and therapy applications”, Buletinul Științific al UPB, Seria B (acceptat pentru publicare).



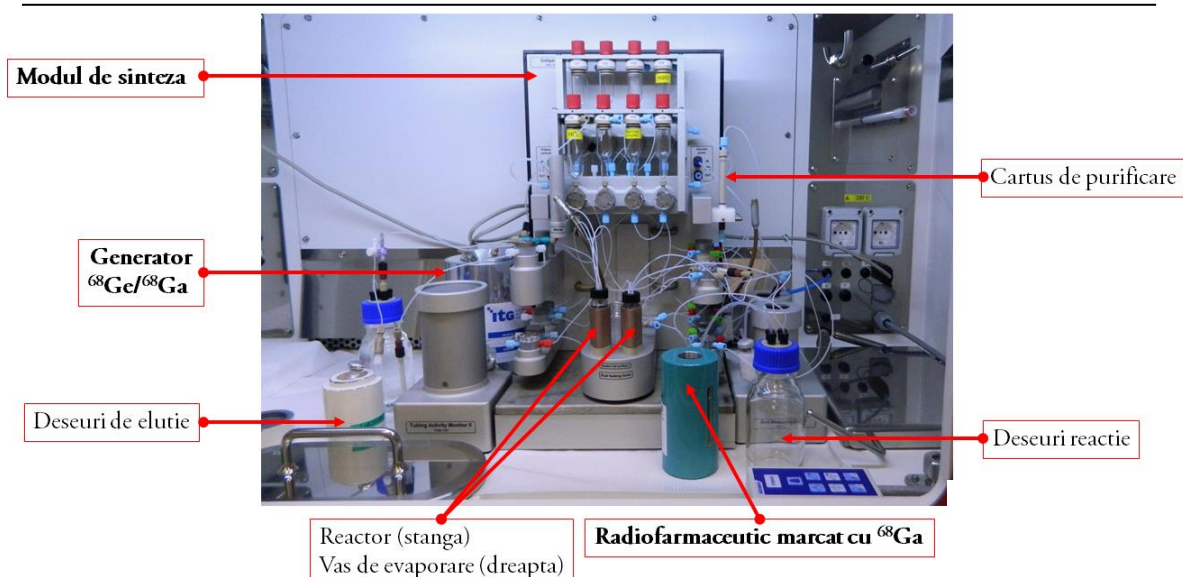
## CHAPTER 1 RADIOFARMACEUTICELE

**Radiofarmaceuticele** sunt compuși radioactivi utilizați în medicina nucleară, alcătuiți dintr-un radioizotop legat la un vector biologic, acesta din urmă fiind o moleculă biologică activă organică sau anorganică. Rolul principal al vectorului este de a viza de preferință anumite organe sau de a participa la procesele fiziologice ale organelor, oferind specificitate radiofarmaceuticului. În plus, radiofarmaceuticele trebuie să aibă o bună stabilitate pe toată perioada de stocare, dar și *in vivo*, toxicitate scăzută și farmacocinetică bună. Astfel, scopul proiectării unui nou produs radiofarmaceutic este de a alege cea mai eficientă pereche radioizotop-vector. Radionuclizii sunt definiți ca izotopi instabili care se degradează prin emisia de particule (particule  $\alpha$ , electroni sau pozitroni), emisie de raze  $\gamma$  sau prin captură de electroni, pentru a obține raportul dintre numărul de neutroni și protoni (N/Z) al celui mai apropiat nuclid stabil. Rata de dezintegrare ( $-dN / dt$ ) a unui radionuclid este proporțională cu numărul de atomi radioactivi (N) și probabilitatea de dezintegrare pe unitate de timp, denumită și constantă de dezintegrare ( $\lambda$ ). Radionuclizii utilizați în medicina nucleară sunt produși artificial fie în acceleratori de particule (prin bombardarea cu protoni [1], deuteroni, particule  $\alpha$  sau cu ioni grei), în reactoare nucleare (prin iradiere cu neutroni) sau pot fi eluate din generatori de radioizotopi.

- **Generatorul de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$**

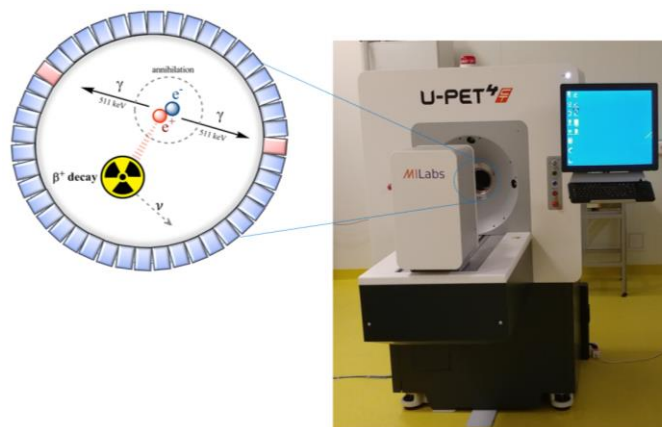
Un **generator de radioizotopi** este un dispozitiv format dintr-o coloană umplută cu un material absorbant special (de exemplu, alumină, rășină schimbătoare de ioni, etc.), pe care radionuclidul care dezintegrează (numit radionuclid „părinte”) este absorbit. Radionuclidul părinte absorbit în interiorul coloanei dezintegrează într-un alt radionuclid numit „fiică”. Unul dintre cei mai studiați și utilizați generatori în ultimul deceniu este generatorul de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . Principalele motive pentru care este preferat față de alte tipuri de generatoare sunt caracteristicile fizice și chimice ale ambilor radionuclizi:  $^{68}\text{Ge}$  care permite o durată de valabilitate lungă (aproximativ 6 luni) datorată timpului său de înjumătățire lung ( $T_{1/2} = 271$  zile), dar și a radionuclidului fiică  $^{68}\text{Ga}$ , a cărei stare de oxidare  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  permite marcarea rapidă a biomoleculelor (Exemplu: peptide sau proteine) prin intermediul a diferite structuri de chelatori (Exemplu: DOTA: acid 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetic, NOTA: acid 1,4,7-triazaciclononan-N,N',N''-triacetic sau NODAGA: acid 1,4,7-triazaciclononan,1-glutaric-4,7-acetic).

Configurația experimentală a generatorului de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  și a modului de sinteză utilizat pentru experimentele de marcarea cu  $^{68}\text{Ga}$  din cadrul acestei teze de doctorat sunt prezentate în Fig. 1.1. Generatorul este conectat la modulul de marcarea și întregul ansamblu este instalat într-o celulă fierbinte ecranată. Toate etapele de pregătire, inclusiv umplerea cu reactivi, instalarea cartușului de purificare de unică folosință, a filtrului steril de unică folosință și a fiolei sterile pentru produsul final sunt efectuate înainte de începerea procesului de marcarea. Odată realizate etapele de pregătire, celula fierbinte este închisă și întregul proces este controlat de la distanță, fără a expune operatorii la radiații.



**Fig. 1.1** Setup-ul experimental și componentele principale ale modului de sinteza GAL-102 utilizat pentru marcarea moleculelor cu  $^{68}\text{Ga}$ .

O aplicație majoră a produselor radiofarmaceutice este **tomografia cu emisie pozitronică (PET)**, care este utilizată în prezent cu succes pentru localizarea tumorilor, detectarea bolilor Alzheimer, Parkinson sau pentru studierea efectelor accidentului vascular cerebral și epilepsiei. Scannerul PET se bazează pe detectarea în coincidență a fotonilor gamma cu energia de 0,511 MeV emiși după procesul de anihilare a pozitronului emis de radioizotop, urmat de reconstrucția traseului parcurs prin materie pentru a determina exact unde au fost produși (locația radioizotopului care s-a dezintegrat).



**Fig. 1.2** Principiul de detecție al scanner-ului PET (stânga) și prezentarea echipamentului de imagistică prin emisie pozitronică  $\mu\text{PET-CT}$  pentru modele animale instalat în Centrul de Cercetare Radiofarmaceutice-IFIN-HH (dreapta)

Sistemele PET actuale dedicate oamenilor permit vizualizarea unui pacient cu o rezoluție de până la 4,4 mm, comparativ cu acestea, scanerile PET dedicate studiilor preclinice cu animale mici (Exemplu: șoareci sau șobolani) pot ajunge până la 0,5 mm (Fig. 1.2). Această tehnică de tomografie poate oferi doar o imagine funcțională a țesuturilor, localizarea precisă în interiorul corpului este redată printr-o tehnică de imagistică structurală, cum ar fi tomografia computerizată (CT) sau imagistica prin rezonanță magnetică (RMN), la care este conectat sistemul PET.

## CAPITOLUL 2 NANOPARTICULELE DIN AUR

**Nanoparticulele (NP)** sunt definite ca materiale, particule sau structuri cu o dimensiune mai mică de 100 nm, ale căror proprietăți fizice și chimice suferă unele modificări comparativ

cu forma lor uzuală. Dintre acestea, nanoparticulele de aur (AuNPs) sunt studiate intens datorită avantajelor lor, cum ar fi: suprafața specifică mare disponibilă pentru funcționalizarea cu molecule; proprietăți fizice și chimice unice care permit utilizarea lor atât în imagistică, cât și în terapie; compatibilitate biologică; posibilitatea de a viza țesuturile tumorale atât prin mecanisme mediate de receptori, cât și pasive prin efectul de permeabilitate și retenție îmbunătățită al endoteliului vascular. În funcție de aplicabilitatea nanoparticulelor din aur și de caracteristicile dorite pentru compusul final, sunt disponibile două tipuri de metode de sinteză: *metode prin dispersie* (sau metode „de sus în jos”) și *metode de condensare* (numite și metode „de jos în sus”). Cea mai simplă și frecvent utilizată metodă de sinteză prin condensare este metoda Turkevich [2], cunoscută și sub numele de „*metodă de reducere cu citrat*”, care necesită dizolvarea acidului tetraclororuric ( $\text{HAuCl}_4$ ) într-o soluție apoasă, rezultând acid tetracloroauric trihidratat ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Soluția este încălzită în continuare la 100 °C și se adaugă 1 mL de soluție de citrat trisodic 0,5%. După aproximativ 5 minute de agitare, se obține o soluție roșu închis care indică formarea nanoparticulelor de aur coloidal, prin această metodă obținându-se cu ușurință nanoparticule cu dimensiunea cuprinsă între 10-100 nm, monodispersate și cu o bună stabilitate în condiții optime de depozitare.

Datorită varietății compozițiilor și a pH-ului mediilor biologice, nanotrasorii pot interacționa cu constituenții mediilor biologice prin interacții sterice, electrostatice sau hidrofobe. Prin urmare, pot forma agregate, pot fi degradate sau pot fi recunoscute de sistemul reticuloendotelial. Astfel, încorporarea stabilă a radionuclidului este esențială, iar nanocompozitul sintetizat trebuie să rămână intact în mediile biologice. Până în prezent, au fost dezvoltate patru **metode pentru marcarea nanoparticulelor de aur cu radioizotopi**: a) prin chemisorbție directă pe suprafața nanoparticulelor; b) complexarea ionilor radiometalici (de ex.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) cu chelatori prin legături coordonative; c) marcarea intrinsecă prin activarea nanoparticulelor de aur în urma bombardării directe cu neutroni termici; d) marcarea intrinsecă prin dopaj radiochimic utilizând un amestec de precursori radioactivi („fierbinți”) și neradioactivi („rece”) în timpul procesului de sinteză. Metoda prin complexare utilizează molecule mici, numite chelatori bifuncționali (BFC), care captează prin legături coordinative ionul radiometalic, acest chelator fiind la rândul său legat de o biomoleculă sau nanoparticulă. Principalul dezavantaj al metodei de marcarea prin intermediul chelatorilor este posibilitatea transchelării ionului radiometalic datorită concurenței cu alți chelatori naturali din corp (Exemplu: feritină, lactoferină sau transferină) care pot duce la absorbția radioizotopului în țesuturile critice. Pentru a evita această situație, stabilitatea termodinamică și cinetică *in vivo* a diferitelor perechi metal-chelator a fost evaluată anterior. Mai mulți chelatori bifuncționali au fost folosiți pentru marcarea cu radioizotopi a nanoparticulelor din aur, precum: DOTA, NOTA sau NODAGA. Metoda de marcarea BFC a fost utilizată în timpul experimentelor descrise în această teză de doctorat.

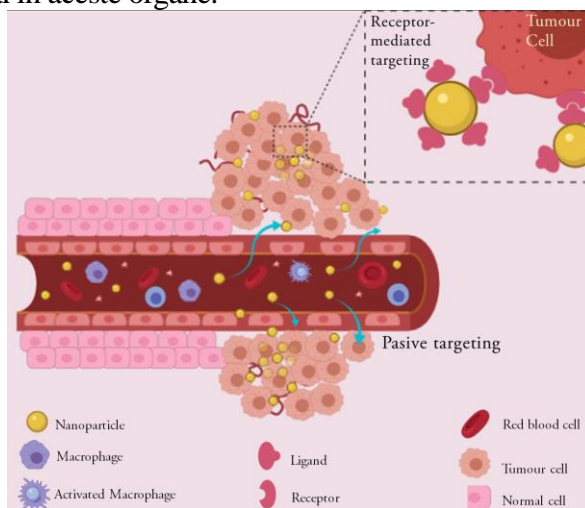
### CAPITOLUL 3 BIODISTRIBUȚIA NANOPARTICULELOR DIN AUR

Caracteristicile nanoparticulelor, cum ar fi: diametrul hidrodinamic, sarcina de la suprafață, stabilitatea și forma, influențează farmacocinetica, distribuția și excreția lor din organismul viu. Pentru a putea fi utilizate în medicina nucleară, nanoparticulele trebuie să aibă mai multe proprietăți și funcții, cum ar fi: efect EPR puternic; timp biologic îndelungat, predominant în circulația sângelui; acumularea minimă în țesuturile nevazate; stabilitate *in vivo* bună, cel puțin în timpul aplicării; distribuție rapidă în țesutul țintă; toxicitate scăzută; să nu perturbe sau să influențeze activitatea biologică a moleculelor funcționalizate la suprafața lor.

#### • Dimensiunea nanoparticulelor în organe

Nanoparticulele care reușesc să scape de recunoașterea de către sistemul imunitar circulă prin sânge în tot corpul, dar absorbția lor va fi predominantă în anumite organe. Țintirea tumorilor folosind nanoparticule se realizează în două moduri: țintire pasivă și țintire mediată de receptori.

*Țintirea pasivă* este termenul utilizat pentru distribuția nanoparticulelor în tumori datorită *efectului de permeabilitate și retenție (EPR) crescută* a endoteliului vascular. În timpul dezvoltării tumorii, vasculatura care alimentează celulele invazive se formează haotic și rapid, ceea ce nu permite formarea completă și ordonată a celulelor endoteliale vasculare în acea regiune. Astfel, generează unele „fenestrații” în vasele de sânge, datorită distanței mari dintre celulele endoteliale, ceea ce va conduce la trecerea nanoparticulelor din sânge în la sistemul limfatic [3]. Un spațiu mai mare între celulele endoteliale se găsește și în organele cu rol de filtrare sau care fac parte din sistemul reticuloendotelial (RES), cum ar fi: splina, ficatul sau rinichii. Acest lucru justifică distribuția pasivă a nanoparticulelor în principal în aceste organe.



**Fig. 3.1** Reprezentarea țintirii pasive și mediate de receptori

Pentru *țintirea mediată de receptori*, nanoparticulele sunt funcționalizate cu liganzi (proteine, peptide, anticorpi, etc.), care se vor lega de receptorii supraexpresați pe suprafața membranei celulelor țesuturilor țintă, ceea ce va duce la acumularea și internalizarea în țesut.

Calea preferabilă pentru eliminarea nanoparticulelor din sistem este prin rinichi. Această cale de eliminare se realizează în trei etape: filtrare glomerulară, secreție tubulară și excreție în urină. Odată ajuns la locul rinichilor, nanoparticulele cu un diametru mai mic de 90 nm trec din sânge prin fenestrările endoteliului vascular către membranele bazale glomerulare, ai căror pori de 2-8 nm vor permite doar trecerea NP de această dimensiune către prelungirile podocitelor. Mai departe, nanoparticulele vor trece în spațiul lui Bowman prin pori de 4-11 nm. Această limitare fizică a filtrării glomerulare prin aceste trei membrane care cuprind bariera de filtrare glomerulară limitează eliminarea nanoparticulelor de o anumită dimensiune, în timp ce acelea care nu reușesc să treacă de fenestrările vasculaturii vor fi filtrate prin splină și ficat. Nanoparticulele care reușesc să treacă de prin fenestrări, dar nu și de următoarele două membrane vor fi acumulate, reprezentând un potențial risc de inflamație și toxicitate dacă nu sunt biodegradabile. Mai mult, bariera capilară glomerulară este încărcată negativ, astfel, este facilitată trecerea nanoparticulelor încărcate pozitiv, iar trecerea AuNPs încărcată negativ este îngreunată. Nanoparticulele care nu pot fi filtrate și eliminate prin rinichi sunt de obicei eliminate prin sistemul hepatobiliar. Nanoparticulele pot ajunge la ficat în principal prin două mecanisme: a) fiind recunoscute de monocitele circulante care aderă în continuare la celulele Kupffer din ficat (macrofage); b) nanoparticulele care scapă de recunoașterea imună, ajung transportate de fluxul sanguin în artera hepatică sau vena portă care se amestecă în sinusoidale hepatice, unde celulele endoteliale sinusoidale situate de-a lungul vasculaturii au fenestrații de 100-150 nm. Prin aceste cavități vor trece în spațiul Disse, unde hepatocitele le vor interioriza (prin endocitoză), putând fi mai departe metabolizate prin degradare enzimatică. Eliminarea ulterioară a bilei va duce la excreția fecală. Din studiile anterioare din literatură [4], între cele două căi de eliminare hepatobiliară, este de preferat ca nanoparticulele să treacă prin celulele endoteliale sinusoidale și apoi să fie degradate direct de către hepatocite, deoarece acest proces are loc în ore sau săptămâni. În schimb, macrofagele stochează nanoparticulele pentru perioade

lungi de timp (luni sau ani). Comparativ cu acestea, numai eliminarea prin rinichi este mai rapidă (în câteva ore sau zile).

Nanoparticulele recunoscute de macrofagele și limfocitele splenice, nanoparticulele excluse din rinichi și ficat datorită dimensiunii mari sau a sarcinii lor, dar și nanoparticulele care au scăpat de recunoașterea macrofagelor și circulă în fluxul sanguin, toate vor ajunge la sinusoidale marginale, o joncțiune care separa pulpa albă și pulpa roșie a splinei. Aici, nanoparticulele mai mici de 150 nm pot trece prin fenestrațiile endoteliului sinusoidelor splenice în pulpa albă. Nanoparticulele care nu pot trece de aceste fenestrări vor fi degradate de macrofagele din zona marginală și stocate în pulpa roșie a splinei. Nanoparticulele cu diametrul hidrodinamic mai mic de 4 nm pot trece mai ușor neobservate de proteinele serice, având o dimensiune aproximativ egală cu a lor, iar probabilitatea de interacție cu acestea în sânge scade. Nanoparticulele mai mici de 6 nm sunt eliminate rapid prin rinichi, dar există și posibilitatea acumulării lor în mușchi, inimă sau plămâni, deoarece joncțiunile dintre celulele endoteliale ale acestor organe ating această dimensiune. S-a demonstrat că nanoparticulele de 10-100 nm sunt mai greu internalizate de celule, iar cele mai mari de 40 nm se acumulează în ficat sau splină pentru perioade lungi de timp (mai mult de 6 luni). Nanoparticulele mai mari de 100 nm sunt eliminate de ficat, iar cele care depășesc 200 nm se elimină numai prin splină. Acoperirea nanoparticulelor cu diverși polimeri biocompatibili, cum ar fi polietilen glicolul (PEG), mărește timpul de circulație în sânge și, dacă sunt captate de celulele RES (cum ar fi macrofagele), permit o degradare mai rapidă. În practică, s-a observat că o creștere a lanțului polimeric și a densității pe suprafața nanoparticulelor reduce foarte mult probabilitatea de adsorbție a proteinelor serice la nanoparticule, datorită împiedicărilor sterice..

## **CAPITOLUL 4 STUDIILE PRECLINICE ALE RADIOFARMACEUTICELOR CARE UTILIZEAZĂ NANOPARTICULE DIN AUR**

### **4.1 STUDIUL *IN VITRO* AL CINETICII DE LEGARE A NANOPARTICULELOR DIN AUR FUNCȚIONALIZATE CU PEPTIDE CONJUGATE CU <sup>68</sup>Ga-DOTA**

Nanoparticulele de aur funcționalizate cu peptide radiomarcate au cunoscut o creștere extraordinară a aplicațiilor din domeniul farmaceutic, datorită capacității nanoparticulelor de a trece de membrana celulelor prin endocitoză mediată de receptori. Legarea nanoparticulelor de biomolecule depinde de gruparea prin care se efectuează legarea, care poate conține grupări amino, carboxil sau tiol. Metodele de legare pot duce adesea la degradarea sau inactivarea secvenței de aminoacizi activi biologic a moleculelor atașate. În acest scop, grupurile menționate mai sus ar trebui poziționate la capătul moleculei [5]. Deși pentru aplicarea *in vivo* a nanoparticulelor de aur, grupările tiol sunt cele mai stabile (au cea mai mare afinitate pentru suprafețele metalelor nobile), grupările amino pot fi de asemenea folosite pentru funcționalizarea nanoparticulelor cu peptide, dar pentru un timp limitat. Analogul somatostatinei Tyr<sup>3</sup>-octreotidă (TOC) este una dintre cele mai recente peptide marcate cu <sup>68</sup>Ga inclusă în Monografia Farmacopeei Europene, sub formă de soluție injectabilă <sup>68</sup>Ga-edotreotidă. Această peptidă utilizată clinic, se leagă cu o mare afinitate de receptorii de somatostatina SSTR2 exprimați pe membrana celulelor tumorilor neuroendocrine. Deoarece majoritatea tumorilor umane exprimă mai mult de un subtip de receptori, până în prezent au fost sintetizați analogi de somatostatina, cum ar fi 1-NaI<sup>3</sup>-octreotidă (NOC) care se leagă cu afinitate mare la SSTR2, SSTR3 și SSTR5.

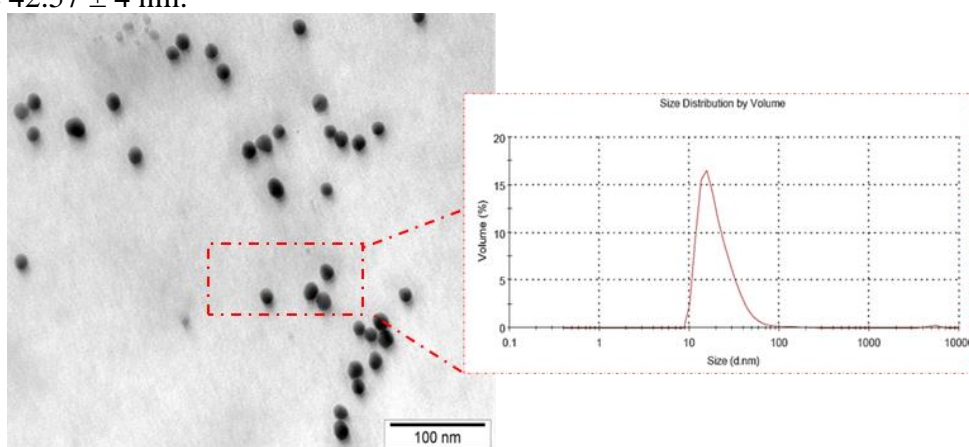
Pentru a evalua dacă nanoparticulele de aur pot îmbunătăți retenția celulară a produselor radiofarmaceutice, am sintetizat și funcționalizat nanoparticule de aur cu trei peptide conjugate cu chelatorul DOTA, respectiv peptidele: neurotensină, 1-NaI<sup>3</sup>-octreotidă și Tyr<sup>3</sup>-octreotidă. Toate peptidele au fost marcate anterior cu radioizotopul <sup>68</sup>Ga cu timp de înjumătățire scurt obținut de la un generator <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga. Compușii marcați au fost analizați din punct de vedere a purității și stabilității radiochimice. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor a fost



efectuată pentru determinarea diametrului hidrodinamic, a stabilității coloidale și lungimea de undă corespunzătoare absorbției maxime. De asemenea, funcționalizarea nanoparticulelor a fost pusă în evidențiată prin investigarea deviației la lungimi de undă mai mari a maximumului de absorbție a nanoparticulelor. Ulterior, nanostructurile marcate au fost incubate pe celulele tumorale de colon din linia HT-29 și celulele tumorale de pancreas AR42J. Scopul acestui studiu [7] a fost de a evalua efectul biologic al AuNP asupra absorbției și retenției radioizotopilor la nivel celular, prin analiza radioimună rotativă.

- **Sinteza nanoparticulelor din aur și caracterizarea acestora**

Prepararea nanoparticulelor s-a realizat prin metoda Turkevich. Formularea nanoparticulelor a fost analizată din punct de vedere a morfologiei, distribuția de dimensiuni a nanoparticulelor din soluție și diametrul hidrodinamic. Pentru realizarea acestora am folosit metoda de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) și microscopia prin transmisie de electroni (TEM). Pentru determinarea stabilității nanostructurilor sintetizate, am determinat potențialul zeta ( $\zeta$ ), obținându-se  $-41.5 \pm 6$  mV, ceea ce indică o bună stabilitate, nanoparticulele având diametrul de  $42.57 \pm 4$  nm.



**Fig. 4.1** Diametrul hidrodinamic al nanoaprticulelor din aur determinat prin tehnicile DLS și microscopia TEM.

- **Marcarea peptidelor cu radioizotopul  $^{68}\text{Ga}$  și controlul de calitate**

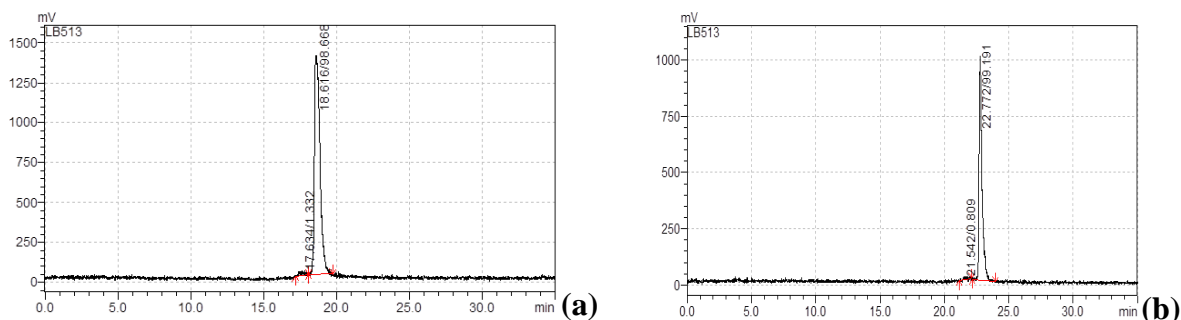
Peptidele DOTA-1- $\text{NaI}^3$ -octreotida (DOTA-NOC), DOTA-Tyr $^3$ -Octreotida (DOTA-TOC) și DOTA-Neurotensina (DOTA-NT) au fost marcate cu emițătorul de pozitroni  $^{68}\text{Ga}$  provenit de la generatorul de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , marcarea realizându-se cu ajutorul modului de sinteză Galigand GAL-102. În procesul de radiomarcare, generatorul  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  a fost eluat cu o soluție de 0.05 M HCl. Activitatea  $^{68}\text{Ga}$  utilizată pentru marcarea peptidei DOTA-NOC a fost de 630 MBq și 410-430 MBq pentru peptidele DOTA-NT și DOTA-TOC. În funcție de biomolecula marcată, am utilizat între 22 nmol- 35 nmol peptidă, tamponată anterior cu soluție de acetat de amoniu pentru a preveni degradarea chimică a acesteia. Pentru a facilita legarea radioizotopului  $^{68}\text{Ga}$  la chelatorul DOTA, s-a utilizat temperatura de 95 °C [8]. După un timp de reacție de 5 minute, amestecul este trecut printr-un cartuș de purificare cu fază inversă care separă peptida radiomarcată de alte impurități. aceasta fiind recuperată ulterior de pe cartuș cu etanol și transferată într-un vas de evaporare a etanolului. Reconstituirea peptidei radiomarcate se efectuează cu ser fiziologic. Tabelul 4.1 sumarizează randamentul de radiomarcare obținut după procesul de sinteză, de asemenea puritatea radiochimică evaluată prin radio-HPLC.

**Tabelul 4.1 Parametrii de marcarea și puritate chimică**

Peptide marcate	Cantitate de peptidă marcată (nmol)	Activitate specifică (MBq/nmol)	Randament de marcarea (%)	Puritate radiochimică (%)
DOTA-Thr $^3$ -Octreotidă (TOC)	35	6.9±22%	62 ± 3	>98
DOTA-1- $\text{NaI}^3$ -Octreotidă (NOC)	22	12±27%	86 ± 2	>99

DOTA-Neurotensină (NT)	24	14±13%	80 ± 6	100
------------------------	----	--------	--------	-----

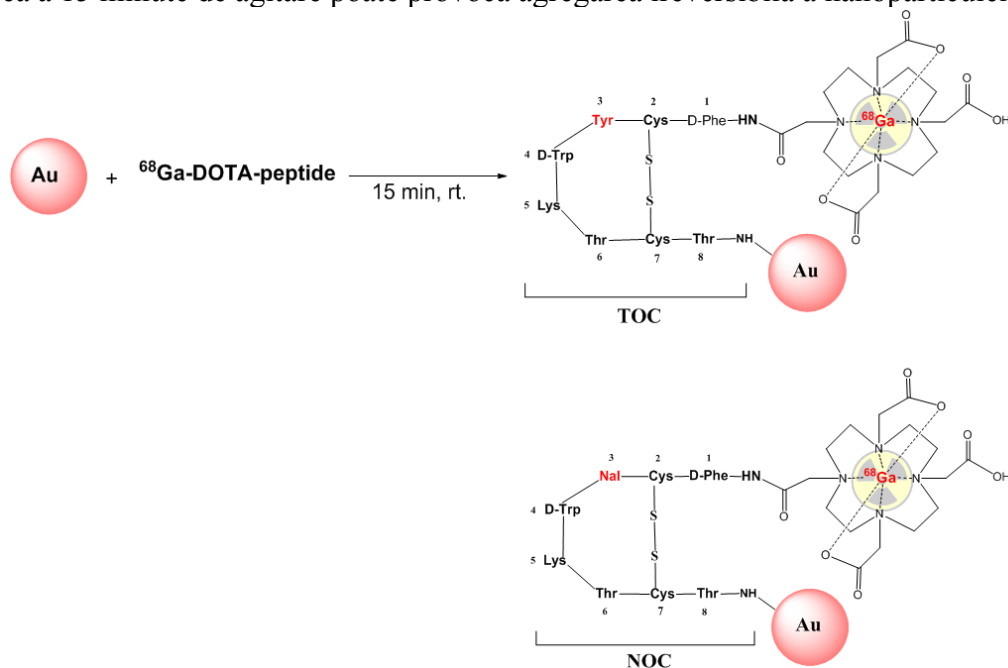
Analiza prin metoda cromatografică HPLC a purității radiochimice a peptidelor marcate a indicat peste 98% puritate chimică. Precum este ilustrat în Fig. 4.2, peak-ul de eluție al  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC regăsindu-se la un timp de retenție  $t_R = 18.61$  min,  $t_R = 18.37$  min pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT și  $t_R = 22.77$  min pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC. La 4 ore după sfârșitul sintezei, puritatea radiochimică se menține peste 98% ceea ce indică stabilitatea acestor radiofarmaceutice după trecerea a patru perioade de înjumătățire a radioizotopului  $^{68}\text{Ga}$ , rezultate care sunt conforme cu standardele Farmacopeei Europene pentru preparatele radiofarmaceutice.



**Fig. 4.2** Cromatograma radio-HPLC a: (a)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC; (b)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC

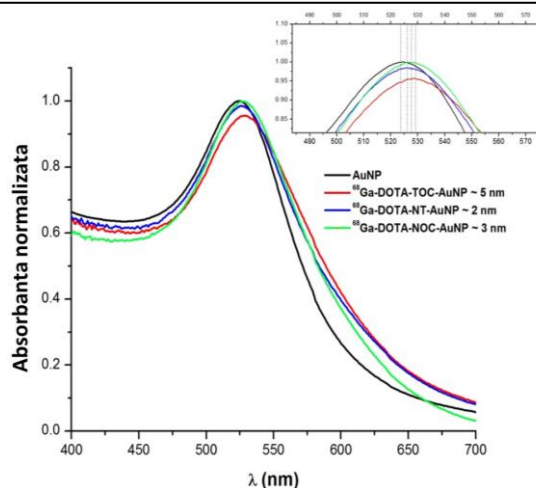
• **Conjugarea  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT și a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC la AuNP**

Pentru prepararea nanotrasorului  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidă-AuNP (Fig. 4.3), suspensia de nanoparticule a fost amestecată cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC/TOC/NT amestecul fiind agitat timp de 15 minute la temperatura camerei. După cum am observat din experimentele anterioare, depășirea a 15 minute de agitare poate provoca agregarea ireversibilă a nanoparticulelor.



**Fig. 4.3** Procesul de funcționalizare a suprafețelor nanoparticulelor de aur cu analogi de somatostatină Tyr<sup>3</sup>-octreotidă (TOC) și 1-Nal<sup>3</sup>-octreotidă (NOC) radiomarcați

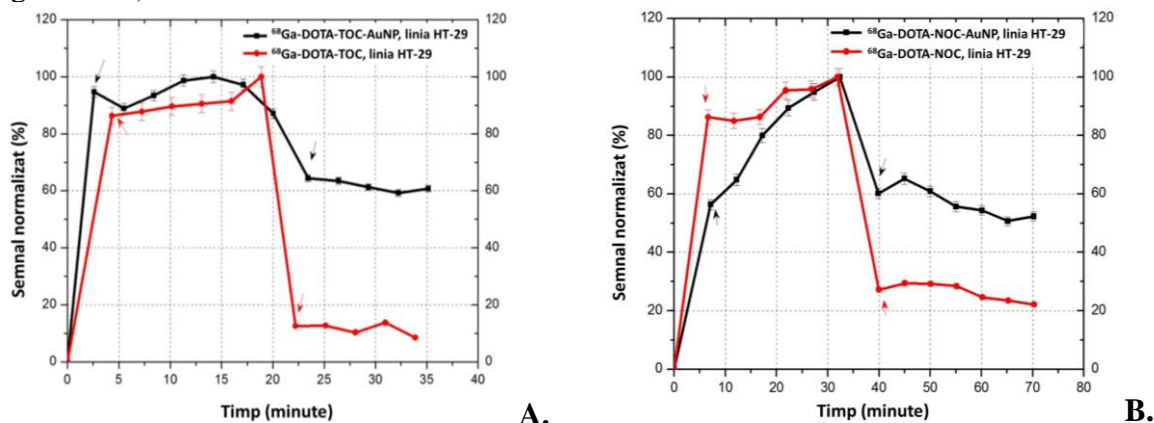
Schimbarea lungimii de undă indusă de modificările indicelui de refracție și a fenomenului de rezonanță plasmonică de suprafață a nanoparticulelor din aur, după interacțiunea dintre peptidă și suprafața AuNP, a fost evaluată prin spectre de absorbție optică UV-Vis (Fig. 4.4) S-a măsurat deplasarea cu 2 nm spre lungimi de undă mai mari pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP, o deplasare de 3 nm pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC-AuNP și 5 nm pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC-AuNP.



**Fig. 4.4** Spectrul de absorbție optică pentru AuNPs funcționalizate cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT

- **Studiul *in vitro* al cineticii de legare**

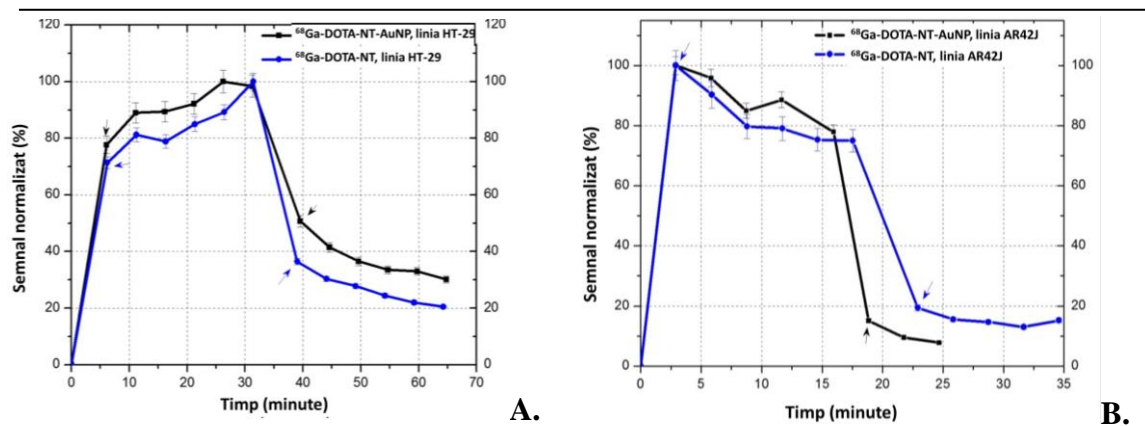
Liniile de celule utilizate în experimente includ linia de cancer de pancreatis AR42J și linia de cancer de colon HT-29. Testul *in vitro* a vizat studierea a două caracteristici ale procesului de interacțiune peptidă-celulă: captarea radiotrasorului și retenția acestuia. Prima parte a profilului de legare constă în măsurarea captării celulare, care corespunde timpului de incubare a peptidelor marcate. A doua parte a curbei de legare constă în evaluarea retenției prin îndepărtarea mediului radioactiv de la celule, spălarea celulelor și a vasului Petri cu mediu proaspăt și reluarea măsurătorii pentru a evalua cantitatea de activitate detectată datorită atașării peptidei la receptorii săi specifici de pe suprafața celulelor. În toate studiile am utilizat 3,5 nmol de peptidă marcată, fiind necesare volume diferite de radioligand pentru a asigura această cantitate. Așa cum se poate observa din Fig. 4.5, diferența de activitate reținută dintre cei doi trăsori pe celulele de cancer de colon HT-29 este în jur de 50%, de la  $10 \pm 3\%$  în cazul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC, până la  $60 \pm 2\%$  pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC-AuNP. La fel ca în cazul Tyr(3)-octreotidă, NaI(3)-octreotida are același profil de captare celulară, dar nanoparticulele de aur funcționalizate cresc cu 35% din activitatea maximă captată, comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC (Fig. 4.5 – B).



**Fig. 4.5** Curba de legare la celule tumorale înainte și după incularea radiotrasorilor: **A.**  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC-AuNP comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC; **B.**  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC-AuNP comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC. Momentul incubării și a extragerii mediului radioactiv este marcat cu săgeată.

Neurotensina radiomarcată și funcționalizată pe nanoparticule din aur a fost testată atât pe linia de cancer de colon HT-29, cât și pe cancer de pancreas AR42J. Rezultatele pun în evidență creșterea cu 10 % a activității prin utilizarea nanoparticulelor, retenția maximă măsurată pe celulele de cancer de colon fiind de 40 % (Fig. 4.6).





**Fig. 4.6A.** Curba de legare la celule tumorale înainte și după incubarea radiotrasorilor: **A.**  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT, pe linia HT-29 de cancer de colon cell line. **B.**  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT, pe linia celulară AR42J pentru cancer de pancreas.

## Concluzii

Acest studiu al cineticii de legare *in vitro* a evaluat capacitatea nanoparticulelor de aur de a crește cantitatea de radioizotop emițător de pozitroni  $^{68}\text{Ga}$  disponibil în interiorul celulelor tumorale, folosind proprietățile AuNP pentru a trece de membrana celulelor prin endocitoză și proprietățile specifice de țintire ale peptidelor marcate. Nanoparticulele de aur funcționalizate cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC au o retenție de peste 60% după extragerea mediului radioactiv, aducând o îmbunătățită de 35%, respectiv 50% în comparație cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC. În schimb, AuNPs funcționalizate cu neurotensină au prezentat o retenție ușor crescută cu 10% în comparație cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT. Aceste rezultate sunt atribuite absorbției mediate de receptori a nanoparticulelor din interiorul tumorii și posibilitatea lor de a lega mai multe peptide pe suprafață, crescând radioizotopul disponibil în interiorul celulelor tumorale.

## 4.2 EVALUAREA PRECLINICĂ A NANOPARTICULELOR DIN AUR ACTIVATE CU GRUPĂRI -NHS ȘI FUNCȚIONALIZATE CU PEPTIDE TIP BOMBESINĂ ȘI NEUROTENSINĂ PENTRU ȚINTIREA TUMORILOR DE COLON ȘI PROSTATĂ

Studiul actual se concentrează pe evaluarea preclinică *in vitro* și *ex vivo* pe celule de carcinom de colon și prostată a patru peptide diferite marcate cu  $^{68}\text{Ga}$  și funcționalizate pe nanoparticule de aur, acestea având potențial de a fi utilizate în aplicații ale imagisticii multimodale. Am marcat două grupuri de peptide omoloage: PEG(4)-bombesin (7–14) (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) și analogul său neuromedin B (Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH<sub>2</sub>), neurotensina (Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) și neuromedin N (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu). Familia de receptori pentru bombesină este formată din trei subtipuri de receptori: receptorul neuromedinei B (NMB) (receptor BBRS1), receptorul peptidei care eliberează gastrina (GRP) (receptor BBRS2) și receptorul bombesinei subtipul 3 (BBRS3). Aceștia sunt frecvent supraexpresați de tumori de sân, tumori de prostată, cancer de ovări sau cancer pulmonar. Neuromedina B (NMB) este prezentă în sistemul nervos central și în tractul gastrointestinal al mamiferelor, stimulează contractia mușchilor netezi și este un factor de creștere autocrină în cancerul pulmonar cu celule mici. Neurotensina (NT) și analogul acesteia neuromedina N (NMN) sunt derivate din același precursor polipeptidic, receptorii neurotensinei (NTRS1, NTRS2 și NTRS3) fiind supraexpresați de cancerul pulmonar, de sân, colon sau prostată. Pentru a demonstra capacitatea nanoparticulelor de aur de a îmbunătăți absorbția *in vivo* a trasorilor, am selectat secvența stabilizată 7-14 a peptidei bombesină, cu farmacocinetică îmbunătățită prin intermediul introducerii unui lanț scurt de polietilen glicol PEG<sub>4</sub> cu rol de spacer, dar și a analogul său denumit neuromedin B. Astfel, am selectat o peptidă cu farmacocinetică deja îmbunătățită (și analogul său), dar și o peptidă cu un timp biologic mai scurt pentru a demonstra

că, în toate cazurile, NP-urile de aur pot fi capabile să îmbunătățească țintirea tumorii. Pentru acest studiu am folosit nanoparticule de aur conjugate anterior cu PEG și activate cu grupuri -NHS care vizează o mai bună stabilitate a legării cu peptidele selectate.

- **Marcarea peptidelor**

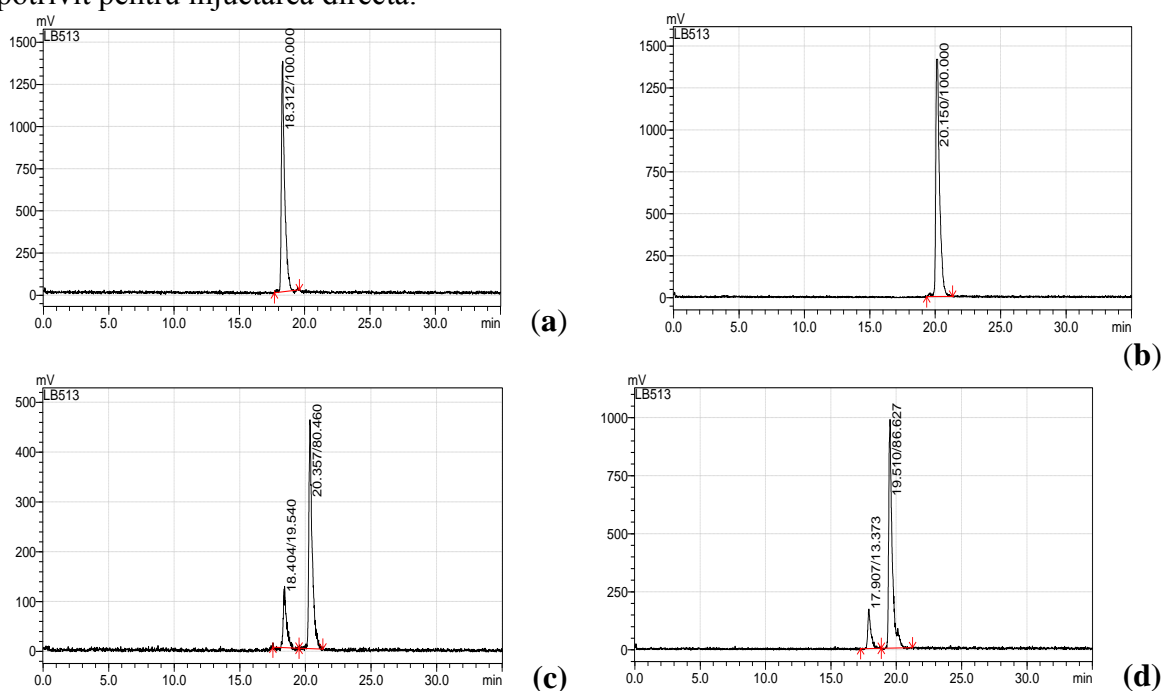
Întregul proces de preparare a peptidelor marcate cu  $^{68}\text{Ga}$ , incluzând procesul de eluare, marcarea și purificare, a durat mai puțin de 25 de minute până la obținerea produsului final. Indiferent de peptidă, în procesele de radiomarcare au fost utilizați parametri similari (temperatură, pH, timp de reacție, raporturi molare) și etape de purificare. Acest lucru a condus la rezultate ușor diferite în ceea ce privește randamentele de preparare, așa cum este prezentat în Tabelul 4.2.

**Tabelul 4.2** Randamentul de preparare a peptidelor.

Peptidă	Randament de preparare (%)
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT	$82.12 \pm 3.43$
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN	$81.14 \pm 3.35$
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)	$80.70 \pm 3.10$
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB	$80.60 \pm 0.46$

- **Controlul de calitate al peptidelor marcate cu  $^{68}\text{Ga}$**

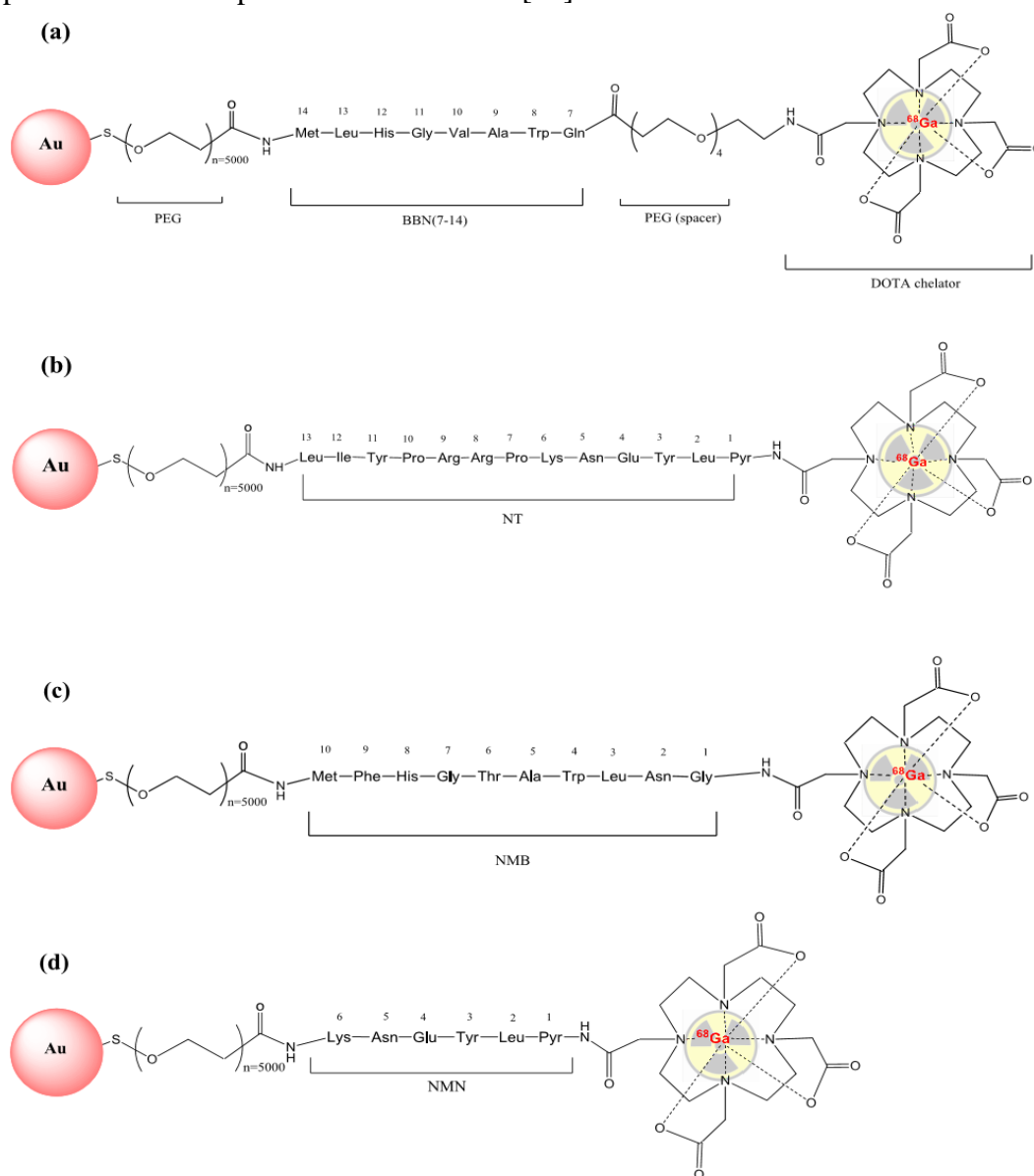
Evaluarea purității radiochimice (PRC) a biomoleculilor marcate, evaluată la sfârșitul procesului de preparare și purificare, prin metoda radio-HPLC a pus în evidență lipsa  $^{68}\text{Ga}$  nelegat și a moleculelor de degradare în produsul final. În cazul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT și al  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN, PRC este 100%. Profilele  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) și al  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB sunt similare cu cromatogramele corespunzătoare acestor peptide nemarcate conform certificatelor de analiză furnizate de producători, fără a fi detectate alte subproduse radiomarcate. În aceste cazuri, RCP a fost mai mare decât 80% și respectiv 85%. PRC a fost verificată în fiecare oră până la 4 ore după terminarea sintezei, fără a se observa degradări ale compușilor marcați. Toate moleculele marcate s-au utilizat astfel mai departe pentru studii biologice. pH-ul compușilor rezultați după marcarea este neutru ( $\text{pH} = 7 \pm 0.2$ ), fiind astfel potrivit pentru injecția directă.



**Fig. 4.7** Puritatea radiochimică a peptidelor marcate cu  $^{68}\text{Ga}$  la sfârșitul procesului de sinteză: (a)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT; (b)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-MN; (c)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14); (d)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB

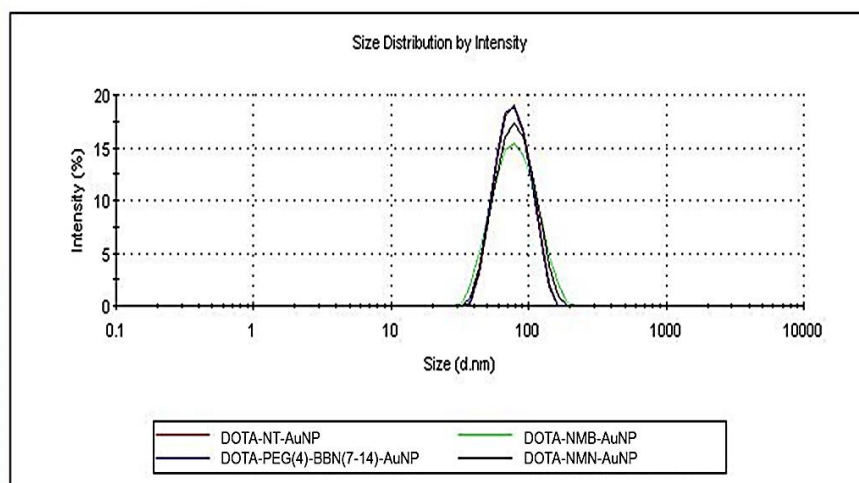
• **Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor din aur funcționalizate cu peptide**

Nanoparticulele din aur cu diametrul de 40 nm, conjugate cu PEG (5 kDa) și activate cu grupări N-hidroxisuccinimidă (NHS), au fost funcționalizate cu:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14),  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN. Procesul a fost realizat conform unui protocol adecvat tipului de nanostructuri [10].



**Fig. 4.8** Structurile nanotrasorilor din aur marcați cu  $^{68}\text{Ga}$ : (a)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP; (b)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP; (c)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP; (d)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP.

Reacția dintre peptide și PEG-AuNP activate cu grupări NHS a fost monitorizată prin detectarea modificărilor dimensiunii nanoparticulelor pe măsură ce se formează un strat peptidic în jurul acestora. Diametrul hidrodinamic inițial al PEG-AuNP a fost de 42.56 nm, după funcționalizare crescând până la aproximativ 73 nm (Fig. 4.9).



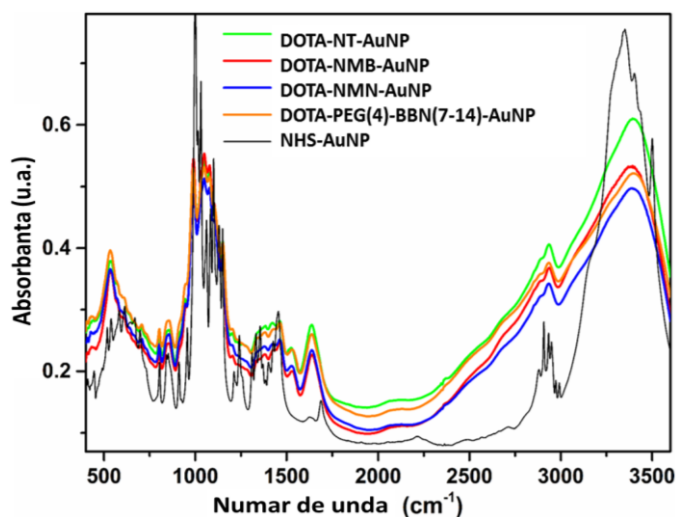
**Fig. 4.9** Distribuția în funcție de intensitate a dimensiunilor nanoparticulelor de aur funcționalizate cu peptide: DOTA-NT-AuNP (roșu), DOTA-NMN-AuNP (negru), DOTA-NMB-AuNP (verde) and DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP (albastru).

Proprietățile fizice ale fiecărei nanostructuri sunt prezentate în Tabelul 4.4. Potențialul electric la limita stratului dublu de ioni de la suprafața nanoparticulelor, cunoscut și ca potențial zeta, este mai mare decât  $-44$  mV. Astfel, nanoparticulele funcționalizate cu peptide prezintă o stabilitate fizică bună, forțele de repulsie fiind suficient de mari pentru a împiedica agregarea acestora.

**Table 4.3** Proprietățile fizice ale nanostructurilor, măsurate prin metoda DLS.

Nanostructură	Diametru hidrodinamic	Potențial Zeta
DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP	71.05 nm	$-44.7$ mV
DOTA-NMB-AuNP	72.18 nm	$-47.3$ mV
DOTA-NT-AuNP	72.36 nm	$-44.4$ mV
DOTA-NMN-AuNP	73.29 nm	$-49.6$ mV

În Fig. 4.10 sunt prezentate comparativ spectrele FTIR ale nanostructurilor: NHS-AuNP, DOTA-NT-AuNP, DOTA-NMB-AuNP, DOTA-NMN-AuNP și DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP. După cum se poate observa, semnalele din spectrul FTIR al NHS-AuNP sunt diferite de cele prezente în spectrele AuNP funcționalizate cu peptide. Semnalele din spectrul NHS-AuNPs sunt mai intense decât cele prezente în spectrele AuNP funcționalizate cu peptide. Spectrele FTIR ale probelor de nanoparticule de aur conțin benzile de absorbție caracteristice ambilor constituenți, și anume peptida cu chelatorul DOTA și nanoparticulele din aur.



**Fig. 4.10** Spectrul de absorbție FTIR al: DOTA-NT-AuNP (verde), DOTA-NMB-AuNP (roșu), DOTA-NMN-AuNP (albastru), DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP (portocaliu) și NHS-AuNP (negru).

Banda de absorbție relativ intensă din spectrul FTIR a AuNP situată în jurul a  $605\text{ cm}^{-1}$  este specifică pentru nanoparticulele din Au. În spectrele FTIR ale nanoparticulelor funcționalizate, aceasta este deplasată până la  $538\text{ cm}^{-1}$ , datorită atașării complexului DOTA-peptidă la nanoparticulele din aur. Benzile caracteristice ale peptidei conjugate cu agentul chelator DOTA apar în intervalul  $600\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ . Banda intensă de la  $3380\text{ cm}^{-1}$  este atribuită vibrațiilor de întindere a grupărilor NH libere și a grupărilor de NH legate de peptidă. Benzile din regiunea  $2914\text{ cm}^{-1}$  și  $2855\text{ cm}^{-1}$  provin de la vibrațiile de întindere ale C-H și CH<sub>2</sub> din stratul organic regăsit la suprafața AuNP. Banda corespunzătoare pentru  $1640\text{ cm}^{-1}$  este atribuită întinderilor C=O, aceasta indicând prezența peptidelor pe suprafața nanoparticulelor. Aceeași grupare C=O prezentă în esterul NHS redă în spectrul FTIR al NHS-AuNP două benzi slabe de absorbție cu un peak la  $1623\text{ cm}^{-1}$  și cealaltă la  $1690\text{ cm}^{-1}$ ; acest fapt indicând legătura covalentă dintre peptide și AuNP. Banda de absorbție de la  $1547\text{ cm}^{-1}$  este atribuită vibrației colective C=C/C-C din lanțul de aminoacizi ai peptidei. Banda de la  $1455\text{ cm}^{-1}$  a fost atribuită pentru vibrațiile de întindere N-H/C-N prezente în legăturile amidice ale proteinelor.

- **Evaluarea citotoxicității**

Pentru evaluarea efectelor citotoxice potențiale ale NP investigate s-a efectuat un studiu preliminar, atât cu nanoparticule simple (AuNP), cât și NP încărcate cu peptide (DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP, DOTA-NMB-AuNP, DOTA-NMN-AuNP, DOTA-NT-AuNP), pe celule normale (monocite umane CRL9855 proliferative) și celule tumorale (carcinom de colon uman din linia HT-29 și carcinom de prostată, celule DU-145). Testul de reducere a MTS a fost utilizat pentru a evalua numărul de celule metabolice active în cultură, în diferite condiții experimentale. Nanoparticulele au fost testate la  $0.25\text{ mg/mL}$  și  $0.50\text{ mg/mL}$ , concentrații mai mari decât cele utilizate pentru studiul de captare și retenție *in vitro* ( $0.10\text{--}0.15\text{ mg/mL}$ ). Aceste concentrații sunt, de asemenea, considerate ridicate în comparație cu domeniul concentrației în care nanoparticulele din aur sunt în general testate *in vitro* ( $0,005\text{--}0,025\text{ mg/mL}$ ) [11]. La concentrația de  $0.25\text{ mg/mL}$ , nanoparticulele încărcate cu peptide nu au modificat semnificativ reducerea MTS în celulele normale sau tumorale, exercitând aproape același efect ca AuNP. În schimb, concentrații mai mari ( $0.50\text{ mg/mL}$ ) de nanoparticule încărcate cu peptide și AuNP simple au avut o acțiune inhibitoare asupra reducerii MTS. Rezultatele indică faptul că o concentrație de  $0.25\text{ mg/mL}$  este biocompatibilă cu tipurile de celule investigate și, prin urmare, concentrații mai mici ar putea fi utilizate în siguranță pentru studii de captare/retenție celulară ale nanoparticulelor funcționalizate cu peptide marcate cu  $^{68}\text{Ga}$ . Concentrații mai mari de nanoparticule ( $0.50\text{ mg/mL}$ ) pot declanșa o reducere semnificativă a numărului de celule metabolice active, indicând faptul că acumularea de NP în sânge, după injectarea intravenoasă sau distribuția în organe, ar putea avea efecte dăunătoare. Acesta ar putea fi în schimb un beneficiu terapeutic în celulele tumorale, a căror viabilitate și proliferare ar putea fi limitate de nanoparticulele investigate, chiar și în absența radioizotopului. Având în vedere că peptidele încărcate pe NP s-ar putea detașa în fluxul sanguin sau atunci când sunt difuzate în organe, am investigat impactul lor direct asupra reducerii MTS. DOTA-NMB, DOTA-NMN, NT și BBN nu modifică reducerea MTS de către celulele normale și tumorale investigate la concentrații de  $1\text{--}4\text{ nmol/mL}$ , în timp ce DOTA-NT are doar o acțiune ușor inhibitoare la concentrații mai mici de  $2\text{ nmol/mL}$ . În concluzie, nanoparticulele testate cu peptide sunt biocompatibile cu celulele normale proliferative și celulele tumorale și nu ridică probleme de citotoxicitate în absența radioizotopului.

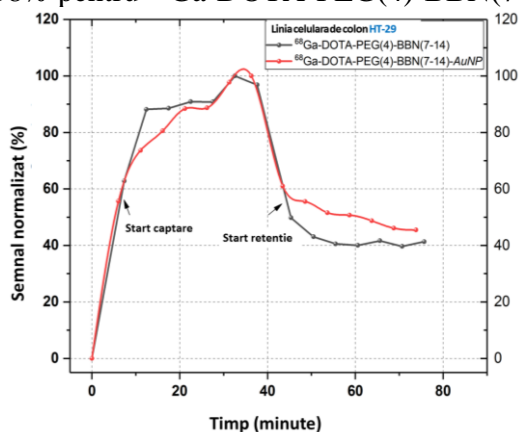
- **Studiile de legare *in vitro* la celule tumorale**

a) *Evaluarea captării și a retenției celulare*

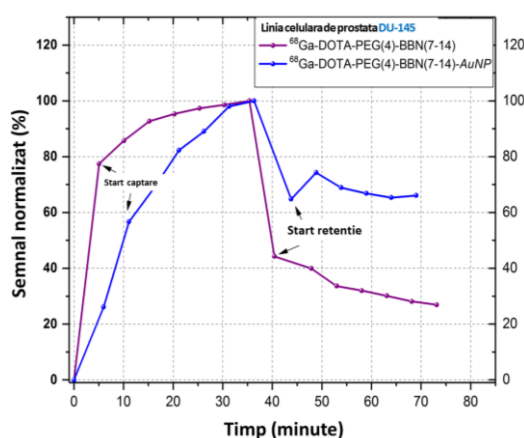


Cinetica de legare (captare și retenție) a peptidelor marcate cu  $^{68}\text{Ga}$  și a nanoparticulelor din aur funcționalizate cu aceste peptide a fost investigată prin tehnica radioimunoanalizei rotative. 2–3 nmol din fiecare peptidă s-au incubat pe celule de cancer de prostată DU-145 și de colon, linia HT-29. În urma analizei fiecărei peptide (Fig. 4.9), putem observa cu ușurință că absorbția atât a produselor farmaceutice nanostructurate, cât și a celor pe bază de peptide crește aproape exponențial odată cu timpul de incubație, ceea ce indică o dinamică bună la celulele tumorale. Un rezultat mai scăzut este obținut pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP pe linia celulară HT-29 de cancer de colon, pentru care profilul de captare urmează o curbă de variație, un indicator al legării instabile la receptorii neuromediei B (NMB, BBR2, BBR3). Nivelul de reținere este ilustrat după săgețile indicatoare și reflectă procentul de activitate reținut de celule din activitatea maximă detectată în timpul captării, după îndepărtarea mediului radioactiv și etapa de spălare a celulelor. Această parte a analizei este un screening care permite evaluarea potențialului peptidelor de a forma legături stabile cu receptorii lor specifici. Retenția celulară a peptidelor studiate depășește 30%, pentru majoritatea, nivelul fiind menținut până la sfârșitul analizei (aproximativ 75 min). Singura peptidă pentru care nivelul de retenție fluctuează este NMB incubat pe celule HT-29, ceea ce indică o legătură instabilă sau slabă între peptidă și receptori. Din curba de captare a nanoparticulelor din aur funcționalizate, se observă că nanoparticulele de aur îmbunătățesc retenția celulară a peptidelor marcate cu  $^{68}\text{Ga}$  fără a afecta capacitatea peptidelor de a se lega de receptori.

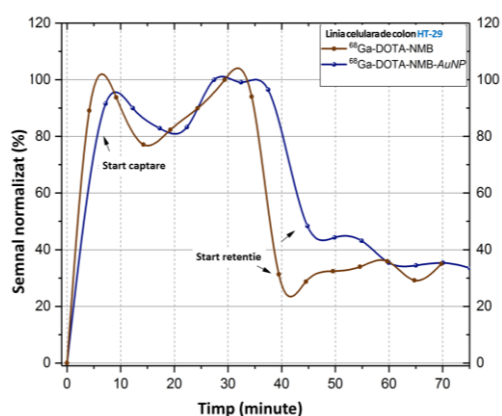
O creștere semnificativă a fost obținută pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP pe celule DU-145 pentru cancer de prostată, care ajunge la 75%, comparativ cu aproximativ 38% pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14).



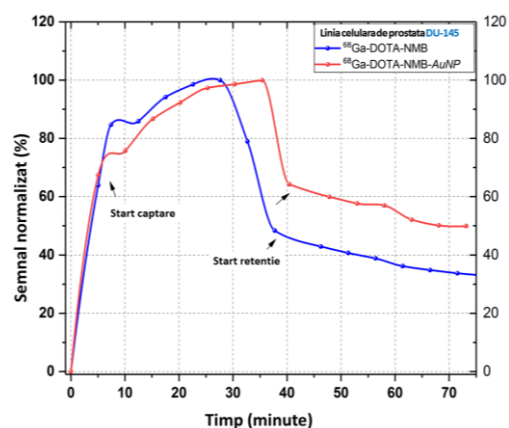
(a)



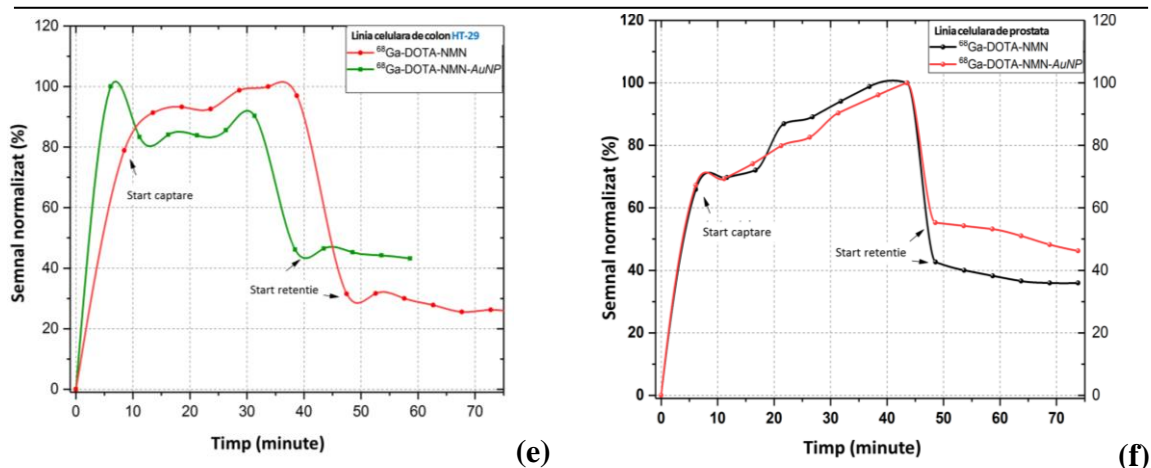
(b)



(c)



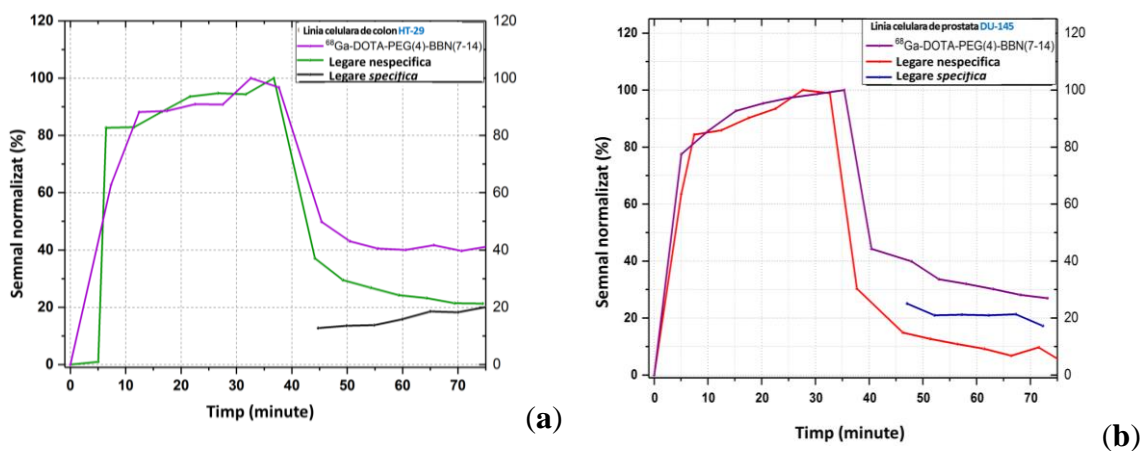
(d)

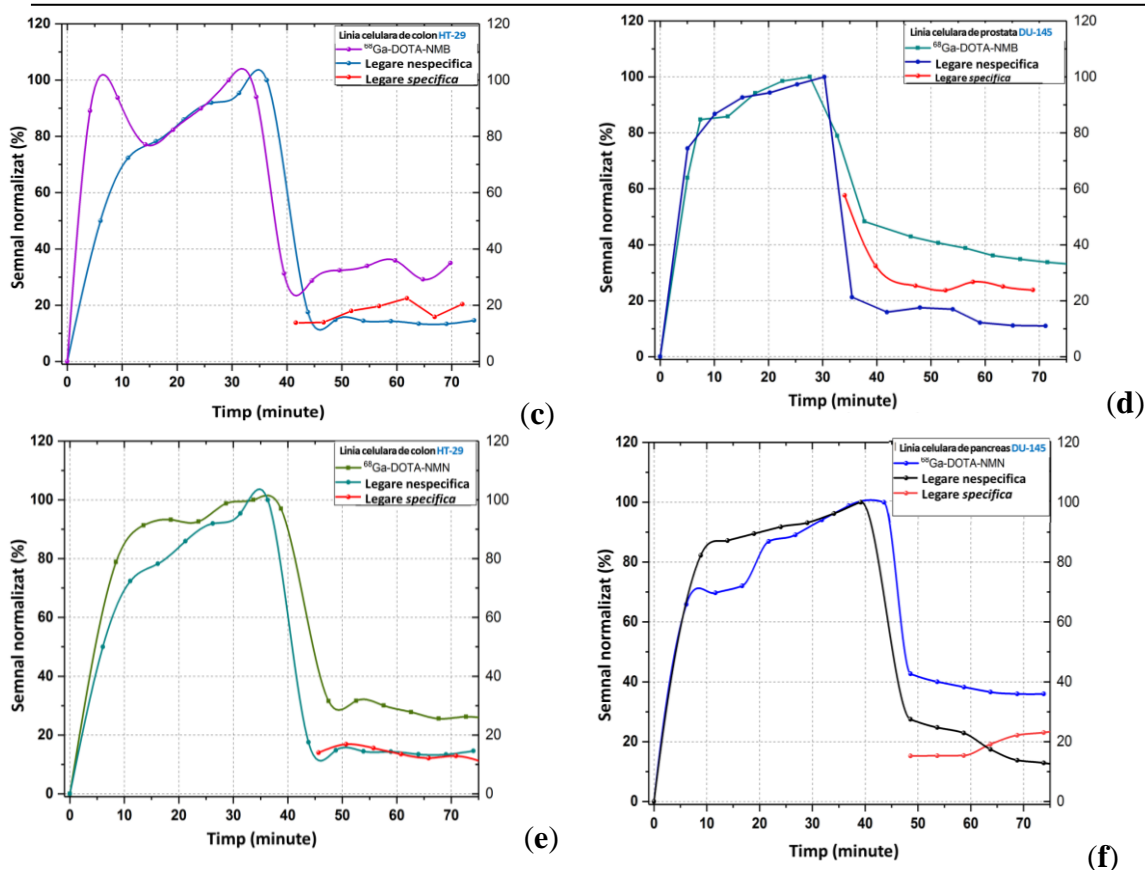


**Fig. 4.11** Evaluarea comparativă a curbelor de captare/retenție *in vitro* pentru: (a)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP pe linia celulară HT-29; (b)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP pe linia celulară DU-145; (c)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP pe linia celulară HT-29; (d)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP pe linia celulară DU-145; (e)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP pe linia celulară HT-29; (f)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP pe linia celulară DU-145.

### b) Legarea specifică

Evaluarea legării specifice a unei peptide la receptorii exprimați pe membrana celulară depinde în mare măsură de densitatea receptorilor, de conformația lor (activă sau inactivă) și de concentrația inhibitorului utilizat pentru a bloca receptorii înainte de incubarea peptidei [12, 13]. Pentru determinarea legării specifice, receptorii specifici pentru fiecare peptidă au fost blocați cu mai mulți antagoniști: ML-18 și PD176252 ( $K_d = 1 \text{ nM}$ ) pentru receptorii de bombezină BBR1, BBR2 și BBR3; SR48692 ( $K_d = 15 \text{ nM}$ ), SR142948 ( $K_d = 10 \text{ nM}$ ) și NTRC 824 ( $K_d = 38 \text{ nM}$ ) pentru receptorii de neurotensină NTR1, NTR2 și NTR3. Timpul de incubare a antagoniștilor a fost de 1-1,5 ore, apoi mediul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate și completate cu  $\sim 2 \text{ mL}$  mediu de cultură proaspăt. Captarea nespecifică și reținerea fiecărei peptide marcate cu  $^{68}\text{Ga}$  a fost ulterior evaluată utilizând același protocol ca cel utilizat pentru legarea totală. Profilele cinetice de legare pentru legarea nespecifică a fiecărei peptide și legarea totală sunt prezentate în Fig. 4.12. Legarea specifică reprezintă diferența dintre legarea totală și legarea nespecifică. Se poate observa că reținerea specifică a peptidelor este de aproximativ 20%, ceea ce reprezintă jumătate din legarea totală pentru fiecare peptidă marcată cu  $^{68}\text{Ga}$ .





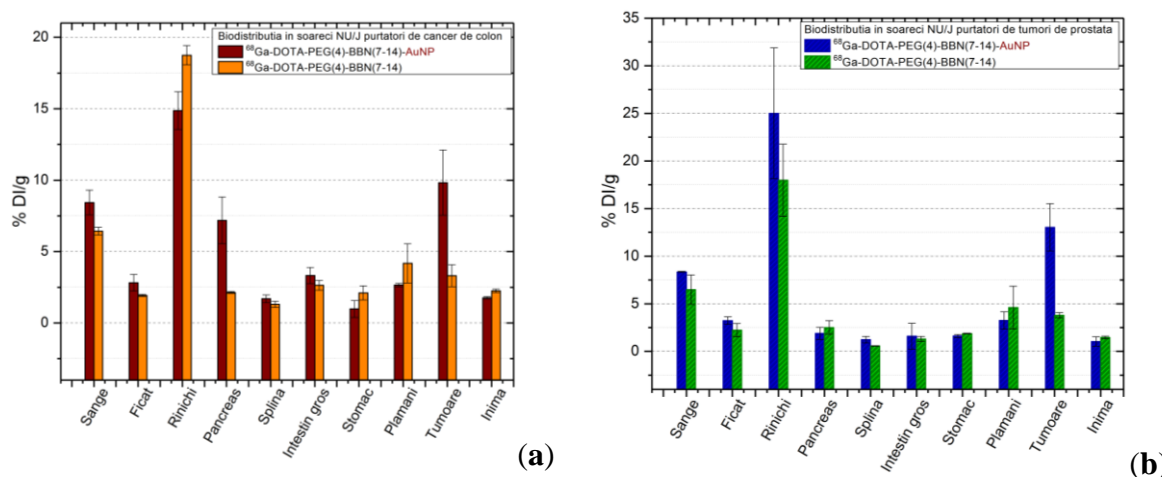
**Fig. 4.12** Evaluarea comparativă a legării specifice *in vitro*: (a)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) pe linia celulară HT-29 pentru cancer de colon; (b)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) pe linia celulară DU-145 pentru cancer de prostată; (c)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB pe linia celulară HT-29; (d)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB pe linia celulară DU-145; (e)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN pe linia celulară HT-29; (f)  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN pe linia celulară DU-145.

- **Biodistribuția *ex vivo***

**$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP**

Biodistribuția comparativă a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP este prezentată în Fig. 4.13. După 30 min post-injectare (p.i.) se observă eliminarea rapidă a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) prin rinichi ( $18.74 \pm 0.67\%$  DI/g) și în sânge ( $6.42 \pm 0.27\%$  DI/g). Comparativ cu aceasta,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP prezintă un nivel mai ridicat în sânge ( $8.24 \pm 0.86\%$  DI/g) și mai scăzut în rinichi ( $14.86 \pm 1.32\%$  DI/g), considerată semnificativă din punct de vedere statistic ( $p = 0.047$ ). În plus, în plămâni se regăsește  $4.17 \pm 1.37\%$  DI/g de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14). În schimb, activitatea în pancreas este de 3,37 ori mai mare dacă se utilizează nanoparticule de aur funcționalizate cu BBN în locul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) ( $p = 0.022$ ). O ușoară creștere a fost înregistrată în splină ( $1.69 \pm 0.26\%$  DI/g pentru AuNP comparativ cu  $1.31 \pm 0.22\%$  DI/g pentru BBN,  $p = 0.025$ ), în ficat ( $2.81 \pm 0.57\%$  DI/g pentru AuNP comparativ cu  $1.92 \pm 0.07\%$  DI/g for BBN,  $p = 0.014$ ) și în intestinul gros ( $3.31 \pm 0.56\%$  DI/g pentru AuNP comparativ cu  $2.63 \pm 0.34$  pentru BBN,  $p = 0.021$ ).



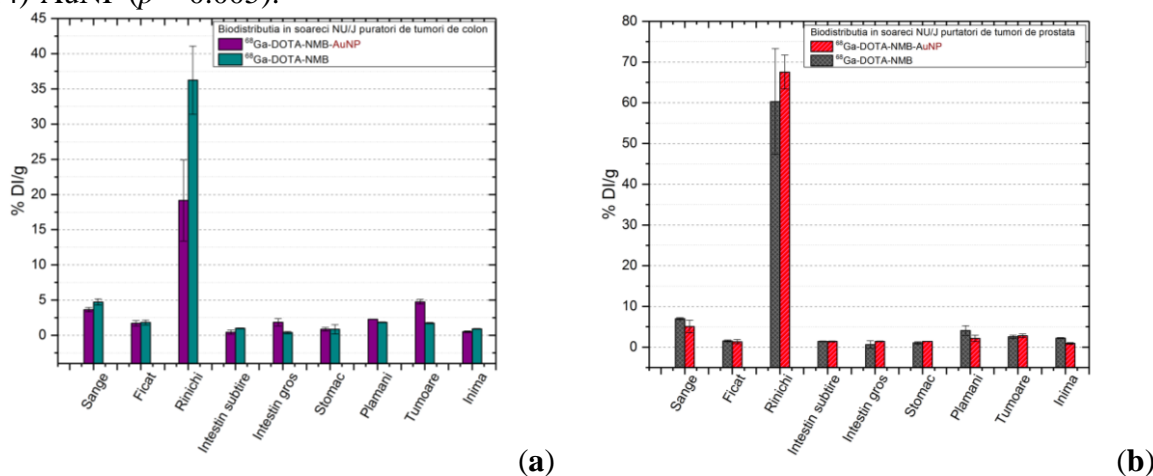


**Fig. 4.13** Biodistribuția comparativă *ex vivo* după 30 min post-injectare a  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)}$ / $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP}$  în: (a) la șoareci NU/J (imunosupresați) purtători de tumori de colon; (b) șoareci imunisupresați purtători de tumori de prostată. Datele sunt prezentate ca valori medii  $\pm$  abaterea pătratică medie ( $n = 4$ ).

O creștere semnificativă a activității ( $p = 0.007$ ) se observă la locul tumorii, unde activitatea se triplează după injectarea  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP}$ , atingând  $9.82 \pm 2.28\%$  DI/g de la  $3.31 \pm 0.76\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)}$ . Un comportament similar a fost observat la șoarecii inoculați cu celule tumorale de prostată (Fig. 4.13 - b), plămâni și inima având valori mai mici după injectia  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP}$  comparativ cu  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)}$  ( $p = 0.042$ ) și creșterea activității în ficat și intestinul gros. Tumoarea de prostată a captat  $13.01 \pm 2.49\%$  DI/g de  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP}$ , de trei ori mai mare ( $>3.44$ ) decât după administrarea  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)}$  uptake ( $3.78 \pm 0.27\%$  DI/g), valorile fiind considerate semnificative ( $p = 0.013$ ).

#### $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB}/^{68}\text{Ga-DOTA-NMB-AuNP}$

Atât la șoarecii cu tumori de colon, cât și la cei cu tumori de prostată, peptida neuromedină B marcată cu  $^{68}\text{Ga}$  și funcționalizată pe suprafața nanoparticulelor din aur este îndepărtată rapid din sistemul circulator, după doar 30 de minute p.i. ambele trăsori regăsindu-se în rinichi ( $60.28 \pm 13.01\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB}$  și  $67.51 \pm 4.16\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB-AuNP}$ ,  $p = 0.017$ ) și doar  $7.00 \pm 0.24\%$  DI/g  $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB}$  în sânge. Această observație se confirmă și cu rezultatele obținute în celelalte țesuturi, fiind semnificativ mai mică comparativ cu omologii săi  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)}$  și  $^{68}\text{Ga-DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP}$  ( $p = 0.005$ ).



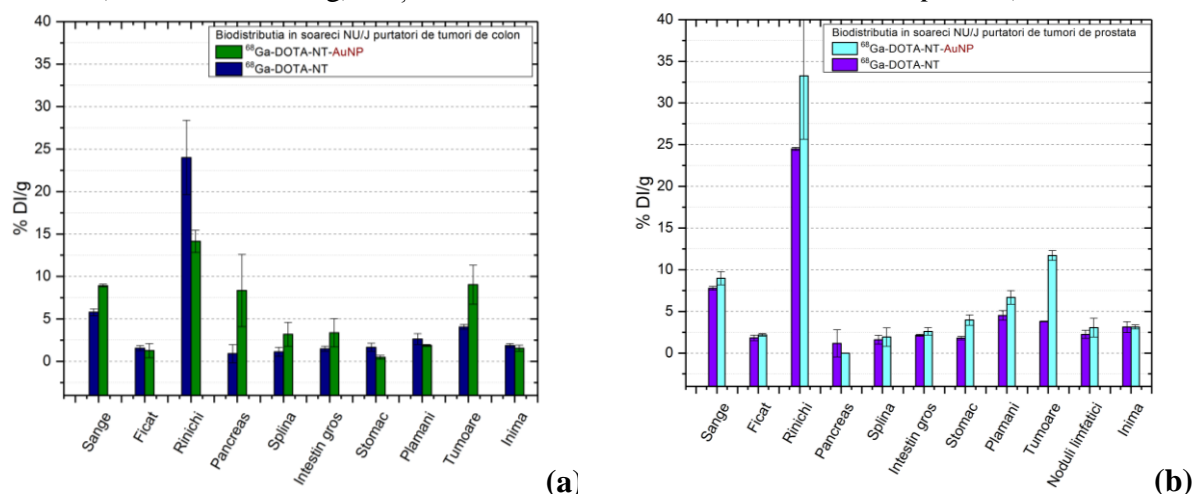
**Fig. 4.14** Biodistribuția comparativă *ex vivo* după 30 min post-injectare a  $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB}$ / $^{68}\text{Ga-DOTA-NMB-AuNP}$  în: (a) șoareci NU/J (imunosupresați) purtători de tumori de colon; (b) șoareci imunisupresați purtători de tumori de prostată. Datele sunt prezentate ca valori medii  $\pm$  abaterea pătratică medie ( $n = 4$ ).

Captarea în tumorile de prostată a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB (Fig. 4.14 - b) este de  $2.54 \pm 0.42\%$  DI/g organ și  $2.79 \pm 0.44\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP ( $p = 0.043$ ). Valori similare au fost înregistrate pentru tumorile de colon (Fig. 4.14 - a), fiind de  $1.73 \pm 0.08\%$  DI/g  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB și  $4.75 \pm 0.32\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP ( $p = 0.026$ ).

#### $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP

Captarea  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT în tumorile de prostată și colon (Fig. 4.15) este similară, obținându-se  $4.06 \pm 0.27\%$  DI/g în tumorile de colon ale șoarecilor și  $3.78 \pm 0.05\%$  DI/g în tumorile de prostată.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP prezintă rezultate comparative cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP, fiind o creștere de 3 ori a activității în tumorile de prostată ( $11.7 \pm 0.59\%$  DI/g) și de două ori mai mare în tumorile de colon ( $9.04 \pm 2.29\%$  DI/g). Atât la șoarecii cu tumori de colon, cât și la cei cu tumori de prostată, excreția neurotensinei este rapidă, după 30 de minute p.i. aproximativ 25% DI/g de organ se găsește în rinichi și 7–9% DI/g în sânge.

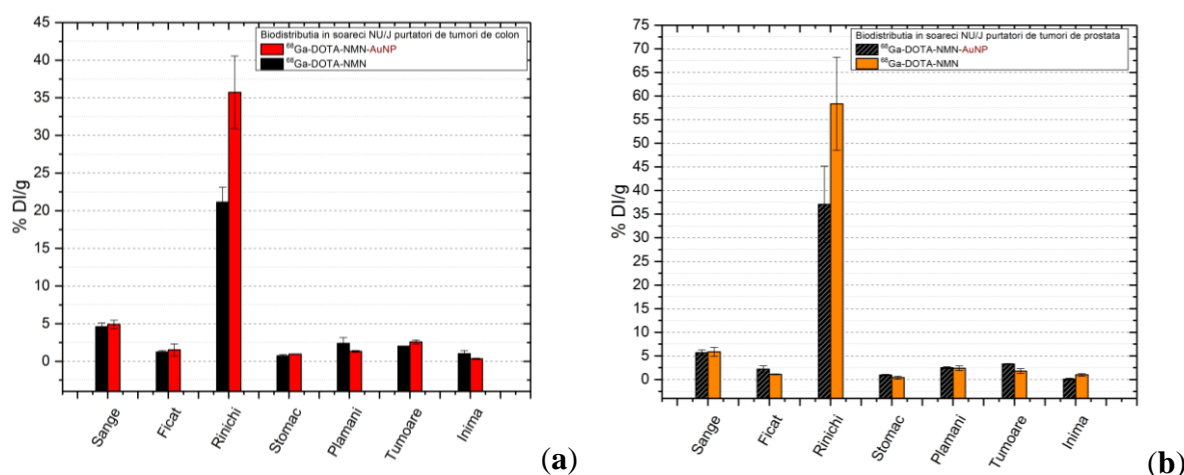
Nanoparticulele de aur funcționalizate au influențat creșterea cantității de traser în splină ( $3.19 \pm 1.39\%$  DI/g la șoarecii cu cancer de colon și  $1.92 \pm 0.11\%$  DI/g la cei cu tumori de prostată,  $p = 0.035$ ) și în intestinul gros ( $2.59 \pm 0.44\%$  DI/g la șoarecii cu tumori de colon și  $3.37 \pm 1.6\%$  DI/g la cei cu cancer de prostată,  $p = 0.021$ ). În plus, o absorbție semnificativă ( $p = 0.016$ ) a fost măsurată în pancreas la trei din grupul șoarecilor ( $n = 4$ ) inoculați cu celule canceroase de colon din linia HT-29. De asemenea, în ganglionul limfatic inghinal al șoarecilor cu cancer de prostată există un procent ridicat de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT ( $2.23 \pm 0.49\%$  DI/g) precum și de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP ( $3.04 \pm 1.13\%$  DI/g), deși rezultatul nu este semnificativ statistic ( $p = 0.7$ ).



**Fig. 4.15** Biodistribuția comparativă *ex vivo* după 30 min post-injectare a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP în: (a) șoareci NU/J (imunopresăți) purtători de tumori de colon; (b) șoareci imunopresăți purtători de tumori de prostată. Datele sunt prezentate ca valori medii ± abaterea pătratică medie ( $n = 4$ ).

#### $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP

Rezultatele obținute pentru șoarecii injectați cu neuromedina N și nanoparticule de aur funcționalizate cu neuromedină N sunt ilustrate în Fig. 4.16. Farmacocinetica peptidei neuromedin N la șoarecii inoculați cu celule canceroase de colon HT-29 este predominantă de eliminarea rapidă a traserilor din fluxul sanguin ( $4.59 \pm 0.49\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN și  $4.89 \pm 0.53\%$  DI/g a peptidei  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP). Nu există acumulări semnificative în alte organe ( $p > 0.19$ ) decât rinichii ( $21.14 \pm 1.97\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN;  $35.72 \pm 4.83\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP;  $p = 0.041$ ), ficat, plămâni și tumoare ( $2.02 \pm 0.02\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN și  $2.57 \pm 0.26\%$  DI/g  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP,  $p = 0.035$ ), care indică absorbția mediată de receptori întrucât aceste organe exprimă receptorii specifici ai neurotensinei [14].



**Fig. 4.16** Biodistribuția comparativă *ex vivo* după 30 min post-injectare a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP: (a) șoareci NU/J (imunosupresați) purtători de tumori de colon; (b) la șoareci imunisupresați purtători de tumori de prostată. Datele sunt prezentate ca valori medii  $\pm$  abaterea pătratică medie ( $n = 4$ ).

În cazul șoarecilor cu cancer de prostată (Fig. 4.16 - b) excreția renală este mai lentă după 30 min p.i.,  $58.34 \pm 9.86\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN regăsindu-se în rinichi. După injectarea  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP, excreția renală a traserului este îmbunătățită, scăzând la  $37.07 \pm 8.11\%$  DI/g dar păstrând valori similare în sânge ( $5.69 \pm 0.59\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP comparativ cu  $5.85 \pm 0.83\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN;  $p = 0.028$ ). Mai mult, absorbția tumorii este dublată, de la  $1.77 \pm 0.5\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN până la  $3.29 \pm 0.08\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP, rezultatul fiind semnificativ din punct de vedere statistic ( $p = 0.09$ ). Nanoparticulele dubleză, de asemenea, absorbția din ficat, intestinul subțire și stomac.

## • Discuții

În acest studiu, am marcat cu radioizotopul  $^{68}\text{Ga}$  peptidele: DOTA-neuromedin B, DOTA-neuromedin N și analogi de bombezină DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) și neurotensină DOTA-NT. Marcarea celor patru peptide cu radioizotopul  $^{68}\text{Ga}$  a fost efectuată cu ajutorul unui modul de sinteză semiautomat, procesul de sinteză fiind optimizat pentru a obține un randament de marcarea mai mare de 80% și puritate radiochimică mai mare de 80% pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14), până la 100% pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN. Compușii finali nu conțin  $^{68}\text{Ga}$  nelegat și sunt stabili timp de cel puțin 4 ore după purificarea finală, fiind adecvați pentru teste biologice. După procesul de funcționalizare a nanoparticulelor de aur cu peptidele menționate mai sus, am evaluat captarea *in vitro*, retenția și legarea specifică a fiecărui traser pe celulele de cancer de colon uman din linia HT-29 și celulele canceroase de prostată, din linia DU-145. Aproape toți radiotraserii au format legături stabile cu receptorii lor specifici, cu excepția  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB pentru care profilul de captare și retenție celulară variază în timpul analizei. Cea mai mare valoare de retenție a fost de 75%, măsurată pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP pe celule DU-145 pentru cancer de prostată.

Studiile de biodistribuire *ex vivo* la șoareci imunocompromiși inoculați cu celule tumorale HT-29 și DU-145 au confirmat rezultatele obținute *in vitro*, arătând că retenția celulară a fost semnificativ îmbunătățită după incubarea celulelor cu nanoparticule de aur funcționalizate cu aceleași peptide. Datorită capacității nanoparticulelor de aur acoperite cu PEG și activate cu grupări NHS de a reacționa cu aminele primare ale peptidelor, se formează un strat de peptidă extern marcat cu  $^{68}\text{Ga}$ . [15], iar semnalul detectat în țesutul tumoral este dublat în tumorile de prostată pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP, precum și în tumorile de colon pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP. În cazul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP atât pe tumorile de colon cât și pe cele de prostată, activitatea  $^{68}\text{Ga}$  este de trei ori mai mare decât cea obținută pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14). Nanoparticulele de aur funcționalizate cu peptide pot fi livrate tumorilor prin ambele mecanisme de țintire: pasiv prin efect de permeabilitate și retenție crescută a vasculaturii; și prin

mecanism de țintire mediată de receptori, deoarece peptidele NT/NMN și BBN/NMN recunosc receptori specifici exprimați de celulele canceroase de colon și prostată. Prin urmare, neo-vascularizația tumorii poate influența absorbția nanoparticulelor în celulele tumorale [16]. O ușoară creștere a captării  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP a fost observată și în tumorile de prostată, precum și a captării  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP în tumorile de colon. Studii suplimentare sunt necesare pentru a evalua dacă acest rezultat ușor mai scăzut (comparativ cu celelalte sisteme nanoparticulă-peptidă) a fost influențat de țesuturile tumorale slab vascularizate sau necrotice.

Studiile anterioare pentru dezvoltarea medicamentelor pe bază de nanoparticule au evidențiat importanța sistemului reticuloendotelial (RES), o rețea de celule și țesuturi responsabile de eliminarea avidă a nanoparticulelor nemodificate din circulația sângelui în câteva secunde sau minute [16-18]. Printre organele esențiale ale RES, splina, rinichii, ficatul, pancreasul, plămâni, măduva osoasă și ganglionii limfatici joacă un rol important în farmacocinetica produselor farmaceutice care utilizează nanoparticule și, din acest motiv, s-a acordat o atenție specială cantității de traser absorbită în aceste țesuturi. În cazul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB (-AuNP) și al  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN injectat la șoarecii cu cancer de prostată, deși clearance-ul traserilor din sânge este rapid, excreția renală este mai lentă în comparație cu celelalte peptide, cantități mari de radiotraser regăsindu-se la 30 min p.i în rinichi (aproximativ 60% DI/g). Deoarece receptorii pentru peptida neurotensină se găsesc și în rinichi [14], absorbția  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN se datorează cel mai probabil interacțiunii neuromediei N cu receptorii săi, preces care momentan nu este pe deplin cunoscut în literatura de specialitate.

Ficatul și sistemul biliar reprezintă calea principală pentru excreția nanoparticulelor care nu suferă eliminare prin rinichi, celulele Kupffer din ficat fiind un potențial loc de stocare, deoarece exprimă receptori pentru endocitoza selectivă a nanoparticulelor opsonizate și se bazează pe degradarea particulelor pentru eliminare [18]. Nanoparticulele care nu pot fi degradate de procesele intracelulare vor rămâne în celule și, prin urmare, vor fi reținute. Rolul polietilen glicolului (PEG 5 kDa) este acela de a preveni opsoninilor (proteinele serice) de a se absorbi pasiv pe suprafața nanoparticulelor și, astfel, de a preveni acumulările nedorite de NP în ficat. Cu toate acestea, activități ușor crescute a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP au fost măsurate la șoareci cu cancer de colon și de prostată, dar și niveluri mai ridicate de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP (dublu comparativ cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN) la șoareci inoculați cu celule de cancer de prostată DU-145. Studiile anterioare au arătat că dimensiunea nanoparticulelor influențează puternic calea pe care sunt excretate/eliminate din sistem; nanoparticulele cu diametrul hidrodinamic mai mic de 6 nm sunt filtrate primar de rinichi [19], nanoparticulele mai mici de 200 nm suferă excreție hepatică mediată de celulele Kupffer, în timp ce nanoparticulele mai mari de 200 nm sunt eliminate de macrofagele splenice. Am observat  $3.19 \pm 1.39\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP (cu diametrul hidrodinamic de 72.36 nm) în splină, pentru șoareci inoculați cu celule de cancer de colon, ceea ce sugerează captarea mediată de receptori a acestora [20].

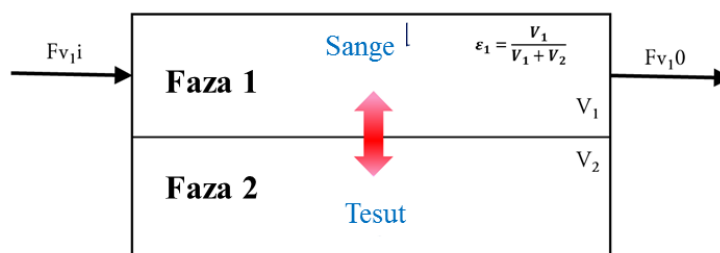
Până în prezent, au fost dezvoltați mai mulți radiotrasori pentru a viza și facilita imagistica moleculară a cancerului de colon sau de prostată, cum ar fi:  $^{68}\text{Ga}$ -NGR cu peste  $2.7 \pm 0.65\%$  DI/g în tumori de colon la 30 min p.i [21], [ $^{18}\text{F}$ ]FDG cu  $2.5 \pm 0.5\%$  DI/g în tumori de colon [22], [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorocolină (FCH) cu  $7.9 \pm 5\%$  DI/g la 60 min p.i. la șoarecii purtători de tumori de prostată [23]. În comparație cu acestea, valorile obținute pentru captarea tumorală a celor patru nanotrasori preparați sunt cuprinse între:  $2.53 \pm 0.26\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP, până la  $9.82 \pm 2.28\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP în tumorile de colon și  $2.79 \pm 0.4\%$  DI/g de  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP până la  $13.01 \pm 2.49\%$  DI/g a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP în tumorile de prostată. Rezultatele promițătoare pentru nanoparticulele de aur funcționalizate cu bombesină, neuromedină B, neurotensină și neuromedină N obținute în studiile *in vitro* și *ex vivo* vor fi completate în viitor cu studiile de imagistică *in vivo*  $\mu\text{PET}$  / CT. De asemenea, aceste studii vor fi completate și cu evaluarea ICP-MS a pentru a confirma că peptidele nu se detașează de nanoparticulele din aur în fluidele fiziologice.

- **Concluzii**

În concluzie, am sintetizat și evaluat patru nanotrasori compuși din nanoparticule din aur și peptide marcate cu radioizotopul  $^{68}\text{Ga}$ . Studiile *in vitro* și *ex vivo* pe șoareci imunocompromiși au pus în evidență stabilitatea ridicată în condiții fiziologice a compușilor, acumulare minimă în organele nevizate și distribuția rapidă în tumorile de cancer de colon și de prostată. Cele mai promițătoare rezultate s-au obținut pentru nanotrasorii  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP care triplează cantitatea de radiotrasor din tumoare, comparativ cu aceleași peptide radiomarcate.

## CAPITOLUL 5 MODELAREA MATEMATICĂ A BIODISTRIBUȚIEI NANOPARTICULELOR DIN AUR

Modelarea matematică poate oferi informații esențiale despre organele în care trasorul s-ar putea acumula preferențial, precum și despre timpul de circulație prin fluxul sanguin, care poate ajuta în continuare la estimarea dozei la care corpul este expus în acest timp. În cazul nanostructurilor vizate, cum ar fi nanoparticulele de aur funcționalizate cu peptide marcate cu radioizotopi, modelarea matematică poate facilita, de asemenea, o mai bună diferențiere a acumulării datorită distribuției pasive prin intermediul fluxului sanguin care transportă nanotrasorul către țesut, de acumulare datorată exclusiv ținuturii medice de receptori prin legarea peptidelor la receptorii specifici exprimați de celulele tumorale. Modelul propus este unul compartimental, unde mai multe organe ale corpului (șoarecele în acest caz) sunt conectate prin vase de sânge. Fiecare organ este modelat ca un compartiment cu amestecare axială cu două faze (Fig. 5.1), fazele fiind conectate între ele prin transferul de masă. Prima fază are în vedere circulația sângelui prin organ, în timp ce a doua fază reprezintă țesutul, unde difuzia este singurul mecanism de transport de masă. Nanoparticulele de aur marcate ar putea trece, prin transfer de masă, de la o fază la alta, în funcție de concentrația lor relativă, adică la început, de la sânge la țesut, deoarece concentrația lor este mai mare în sânge, dar, dacă nanotrasorul este excretat suficient de rapid din corp, transferul de masă ar putea avea loc și din țesut în sânge, datorită scăderii concentrației sale din sânge



**Fig. 5.1** Schema unui compartiment cu amestecare axială cu două faze

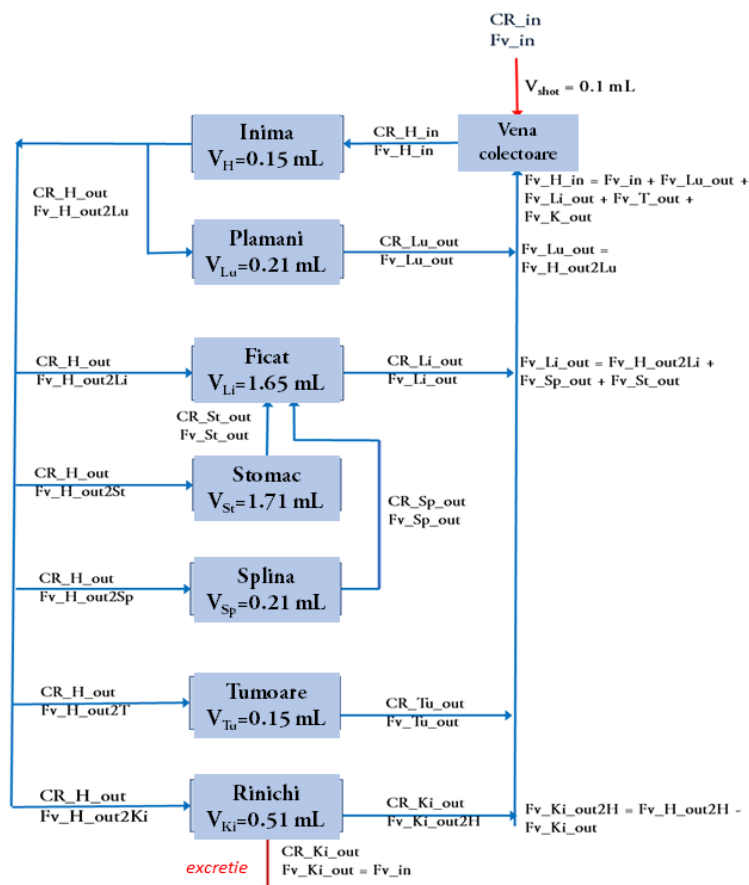
Intrarea trasorului în corp se face prin plexul venos retro-orbicular, iar singura ieșire este prin excreția în urină. Acest trasor este excretat prin țesutul rinichilor și poate fi considerat un proces de transfer de masă de ordinul întâi din țesutul rinichilor în urină, fără a lua în considerare concentrația de nanotrasorului din urină.

- **Ipoteze principale și modelul fizic**

Procesul implică dezintegrarea radioizotopului în volumul ocupat de sânge în organ (faza 1) și în țesutul organului (faza 2), împreună cu transferul de masă a speciilor radioactive/neradioactive între faza sanguină și țesutul organului. La intrare, sunt prezente doar nanoparticulele de aur radioactive. În modelul propus, se presupune că este respectat modelul de dispersie axială, indiferent de volumul prin care curge sângele (volumul de sânge al organelor, arterelor sau venelor). Activitatea injectată a fost aproximată ca un impuls

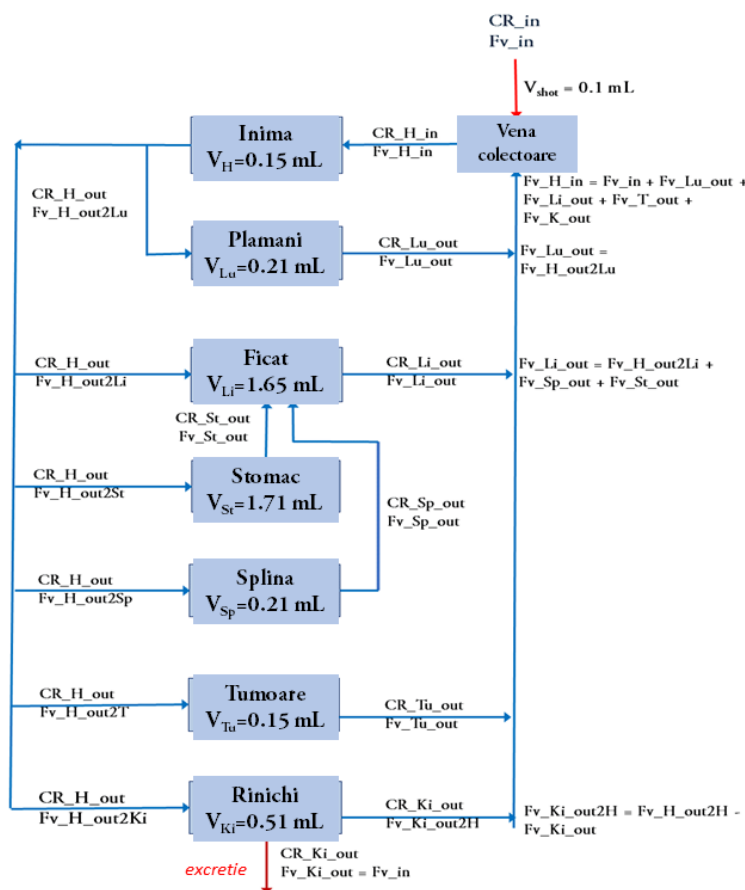


dreptunghiular cu o durată de timp necesară pentru a injecta un volum de 0,1 mL de nanotraser.



Modelul fizic (

Fig. 5.2) ia în considerare șapte organe de interes: inima (H), plămâni (Lu), ficatul (Li), splina (Sp), stomacul (St), tumoarea (Tu) și rinichii (Ki). De asemenea, arterele și venele care le interconectează sunt luate în considerare.



**Fig. 5.2** Modelul fizic al șoarecelui utilizat pentru modelarea matematică.

- **Forma adimensională a ecuațiilor**

Pentru a completa modelul matematic, s-au scris ecuațiile bilanțului de masă pentru nanotrasori radioactivi și pentru nanotrasorii la care radioizotopul a dezintegrat (trecând într-un nuclid stabil). Pentru a simplifica calculul, am folosit forma adimensională a ecuațiilor echilibrului de masă. Exemplu de ecuații de echilibru de masă pentru sângele inimii (a cărei metodă de calcul se aplică și în cazul celorlalte organe, diferind doar notația) sunt:

$$\frac{\partial \Gamma_{BH}}{\partial \tau} + \frac{\tau_{sys}}{\tau_H} \frac{\partial \Gamma_{BH}}{\partial \xi} = \frac{D_{LBH} \cdot u_{FBH} \cdot \tau_{sys}}{L_H \cdot u_{FBH} \cdot L_H} \frac{\partial^2 \Gamma_{1H}}{\partial \xi^2} - \frac{(N_{BH} + r_{DBH}) \cdot \tau_{sys}}{CR\_in \cdot \varepsilon_{BH}} \quad (5.1)$$

$$\frac{\partial \Gamma_{sBH}}{\partial \tau} + \frac{\tau_{sys}}{\tau_H} \frac{\partial \Gamma_{sBH}}{\partial \xi} = \frac{D_{LBH} \cdot u_{FBH} \cdot \tau_{sys}}{u_{FBH} \cdot L_H^2} \frac{\partial^2 \Gamma_{sBH}}{\partial \xi^2} - \frac{(N_{BHs} - r_{DBH}) \cdot \tau_{sys}}{CR\_in \cdot \varepsilon_{BH}} \quad (5.2)$$

Condiția inițială corespunde timpului în care radiotrasorul nu a intrat încă în sistem, prin urmare concentrațiile ( $\Gamma_{BH}$ ,  $\Gamma_{sBH}$ ) sunt nule. La intrarea în organ ( $z = 0$ ), transportul de masă convectiv se suprapune cu dispersia axială. La ieșire ( $z = L$ ), condiția de simetrie (finitudine) este aplicabilă, deoarece concentrația nu poate crește/scade la nesfârșit, prin urmare derivata este zero. Condițiile inițiale și la limită sunt:

$$\tau = 0, \forall \xi \in [0, 1], \Gamma_{BH} = \Gamma_{sBH} = 0 \quad (5.3)$$

$$\tau > 0, \left\{ \begin{array}{l} \xi = 0, \\ \Gamma_{s_{BH},in} = \Gamma_{s_{BH}} - Dg_{BH} \cdot \frac{\partial \Gamma_{s_{BH}}}{\partial \xi} \\ \Gamma_{BH,in} = \Gamma_{BH} - Dg_{BH} \cdot \frac{\partial \Gamma_{BH}}{\partial \xi} \\ \xi = 1, \\ \frac{\partial \Gamma_{BH}}{\partial \xi} = 0 \\ \frac{\partial \Gamma_{s_{BH}}}{\partial \xi} = 0 \end{array} \right. \quad (5.4)$$

Forma adimensională a ecuațiilor echilibrului de masă a speciilor radioactive și stabile pentru țesutul inimii este:

$$\frac{\partial \Gamma_H}{\partial \tau} = Dg_H \frac{\tau_{sys}}{\tau_H} \frac{\partial^2 \Gamma_H}{\partial \xi^2} + \frac{(N_{BH} - r_{DH}) \cdot \tau_{sys}}{(1 - \varepsilon_{BH}) \cdot CR_{in}} \quad (5.5)$$

$$\frac{\partial \Gamma_{s_H}}{\partial \tau} = Dg_H \frac{\tau_{sys}}{\tau_H} \frac{\partial^2 \Gamma_{s_H}}{\partial \xi^2} + \frac{(N_{BHs} + r_{DH}) \cdot \tau_{sys}}{(1 - \varepsilon_{BH}) \cdot CR_{in}} \quad (5.6)$$

Forma adimensională a condițiilor inițiale și la limită este:

$$\tau = 0, \forall \xi \in [0,1], \Gamma_H = \Gamma_{s_H} = 0 \quad (5.7)$$

$$\tau > 0, \left\{ \begin{array}{l} \xi = 0, \frac{\partial \Gamma_H}{\partial \xi} = \frac{\partial \Gamma_{s_H}}{\partial \xi} = 0 \\ \xi = 1, \frac{\partial \Gamma_H}{\partial \xi} = \frac{\partial \Gamma_{s_H}}{\partial \xi} = 0 \end{array} \right. \quad (5.8)$$

Forma adimensională a debitului molar pentru speciile radioactive și stabile:

$$\frac{N_{BH} \cdot \tau_{sys}}{CR_{in} \cdot \varepsilon_{BH}} = K_{LBH} \cdot \frac{\tau_{sys}}{\varepsilon_{BH}} \cdot (\Gamma_{BH} - m_{BH-H} \Gamma_H) \quad (5.9)$$

$$\frac{N_{BH} \cdot \tau_{sys}}{CR_{in} \cdot (1 - \varepsilon_{BH})} = K_{LBH} \cdot \frac{\tau_{sys}}{(1 - \varepsilon_{BH})} \cdot (\Gamma_{s_{BH}} - m_{BH-H} \Gamma_{s_H}) \quad (5.10)$$

În toate ecuațiile,  $r_D$  reprezintă rata de dezintegrare, fiind proporțională cu constanta de dezintegrare a radioizotopului ( $k_d$ ) și concentrația speciilor radioactive.

### • Parametrii de intrare

Modelul matematic propus, alcătuit din 28 de ecuații diferențiale parțiale pentru cele șapte organe și 24 de ecuații diferențiale parțiale pentru vene și artere, a fost rezolvat folosind un program dezvoltat cu ajutorul funcției *pdepe* încorporată în librăria de funcții a MATLAB, care rezolvă probleme cu valorii inițiale și la limită pentru ecuații diferențiale (pentru forme de elipse/parabole) în 1-D. Toate datele de intrare necesare pentru rezolvarea modelului matematic sunt introduse prin interfața programului dezvoltat. Datele de operare, care individualizează fiecare experiment (simulat sau *in vivo*), sunt:

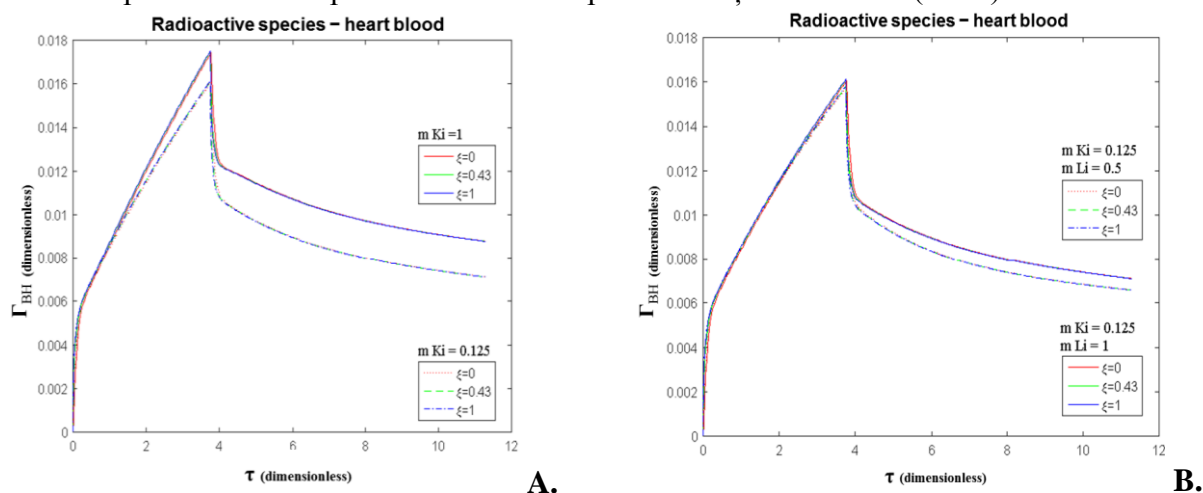
- constanta de dezintegrare ( $k_d$ ) a radioizotopului  $^{68}\text{Ga}$ :  $1.703 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
- timpul de staționare în sistem ( $\tau_{sys}$ ): 15.94 s;
- perioada în care se injectează nanotrasorul ( $t_{shot}$ ): 60 s;
- volumul injectat ( $V_{shot}$ ): 0.1 mL
- debitul de sânge ( $F_{vt}$ ) care circulă de la inimă la organe: 0.286 mL/s
- fracția, în raport cu debitul volumetric intern, a fluidului introdus în timpul injectării ( $\alpha$ ):  $5.83 \cdot 10^{-3}$



Timpul de simulare este de 180 s, reprezentând mai mult de 11 timpi de staționare adimensionali, suficient pentru a sublinia evoluția complexă a concentrației de radiotrasor în timpul injectării și după acest eveniment, în sângele care curge prin organe și țesuturile acestora. Ulterior, timpul de simulare a fost mărit la 1800 s, la fel ca timpul experimental, respectiv 30 de minute, pentru a vedea efectele pe termen lung. Volumul fiecărui organ, fracția ocupată de sânge în fiecare organ și fracția de sânge recirculat prin fiecare organ sunt preluate din literatură. La stabilirea valorilor pentru grupurile de dispersie ale fiecărui organ (sânge și țesut) a fost luată în considerare ipoteza că o curgere a sângelui prin organe implică mai multă dispersie axială decât cea corespunzătoare amestecării simple, în țesut. Valorile pentru coeficienții de transfer de masă au fost ajustate pe baza datelor experimentale disponibile, astfel încât concentrația de radiotrasor la sfârșitul simulării (1800 s) să fie aproape de valorile măsurate în experimentele *in vivo*. Unul dintre cei mai importanți parametri ai modelului este coeficientul de partiție, care reprezintă raportul dintre concentrațiile de radiotrasor în sânge și țesut, la interfață.

## • Rezultate și discuții

S-au simulat trei situații pentru a investiga influența rinichilor și a ficatului asupra circulației și dispersiei radiotrasorului în organe (Fig. 5.2). În prima ipoteză testată, rinichii și ficatul nu absorb preferențial radiotrasorul. În cea de-a doua situație simulată, rolul rinichilor, ca organ excretor al radionuclidului a fost recunoscut, atribuindu-i un coeficient de partiție de 0,125 (la interfață, concentrația de radiotrasor în țesut este de opt ori mai mare decât concentrația sa în sânge). În cea de-a treia situație, s-a luat în considerare rolul ficatului ca organ principal de stocare a nanotrasorilor datorită fenestrărilor mari, atribuindu-i un coeficient de partiție de 0,5 (la interfață, concentrația de radiotrasor în țesut este de două de ori mai mare decât concertarea sa în sânge). După cum se poate observa din Fig. 5.3, concentrația în sângele inimii crește foarte repede, pentru o perioadă foarte scurtă de timp. După această perioadă, efectele de transfer de masă devin mai pronunțate, concentrația nanotrasorului scade brusc, pentru o perioadă scurtă, arătând apoi o scădere treptată mult mai lentă până la sfârșitul simulării (180 s)

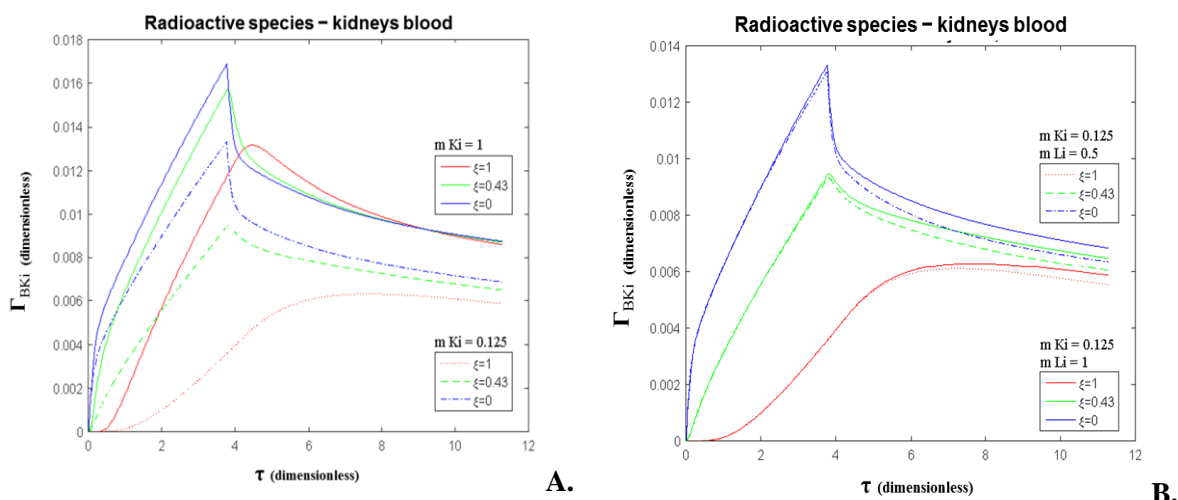


**Fig. 5.3** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din sangele inimii, pentru intrare, mijloc și ieșirea din vas: **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a ficatului.

Scăderea bruscă ar putea fi dată de doi factori: a) sângele alimentat în sistem nu mai are trasor, deci diluează sângele primit de la restul organelor; b) eliminarea din sânge datorată absorbției rinichilor. După acest timp scurt scăderea este atenuată de efectul de transfer de masă, de la țesut la sânge. Aceeași tendință a profilului de distribuție în timp se menține pe toată lungimea simulată a țesutului cardiac ( $\xi = 0$ ;  $\xi = 0,43$ ;  $\xi = 1$ ).

Când rolul rinichilor ca organ de excreție este subliniat prin scăderea coeficientului de partiție de opt ori, impactul asupra profilului radiotrasorului este foarte important atât pentru sânge, cât și pentru țesuturi (Fig. 5.3 -A și Fig. 5.4 **Error! Reference source not found.** - A).

Eliminarea fiind mai rapidă (proporțional cu concentrația de radiotrasor din țesutul rinichilor), concentrația de radiotrasor devine semnificativ mai mică și, după o perioadă scurtă de diluare, concentrația de radiotrasor scade datorită excreției. Când rolul ficatului de a absorbi preferențial traserul este subliniat prin scăderea coeficientului de partiție de două ori, impactul asupra profilului radiotrasorului se manifestă, dar nu are amploarea din situația anterioară. Valoarea maximă este afectată, dar foarte puțin, efectul fiind mai proeminent după ce radiotrasorul a încetat să mai fie injectat. Deoarece țesutul hepatic reține doar radiotrasorul, fără a-l distruge, acesta acționează doar ca un colector, ceea ce înseamnă că, până la saturatie, va contribui la scăderea suplimentară a concentrației de radiotrasor din sânge. După ce concentrația sanguină devine mai mică decât concentrația țesutului hepatic, datorită clearance-ului continuu efectuat de rinichi, țesutul hepatic va deveni donor de radiotrasor. Datorită volumului semnificativ mai mare al rinichilor, distribuția nanotrasorului în sângele rinichilor variază în spațiu, scăzând de la intrare la ieșire, efect datorat transferului de masă între sânge și țesut. La intrarea vasului de sânge, concentrația radioactivă este dată de concentrația care iese din inimă. Pe măsură ce sângele curge prin rinichi, trecerea traserului către țesutul renal scade concentrația din sânge și, în același timp, întârzie momentul în care apare maximul cel mai pronunțat pentru concentrația de ieșire ( $\xi=1$ ,  $m_{Ki} = 1$ , Fig. 5.4 - A.). Mai mult, înainte de ieșire, gradientul devine negativ, după aproximativ patru unități adimensionale de timp, concentrația sanguină scăzând de la intrare la ieșire, datorită concentrației țesutului rinichilor, care devine mai mare decât concentrația sanguină. Gradientul revine pozitiv după aproximativ nouă unități de timp adimensional, când concentrațiile tisulare scad sub saturatie. Același efect al transferului de masă din sânge în țesut poate fi observat și pentru concentrația țesutului la rinichi (Fig. 5.5 - A,  $m_{Ki} = 1$ ), care are, de asemenea, o modificare de gradient, datorită dezechilibrului dintre concentrațiile din sânge și țesuturi.

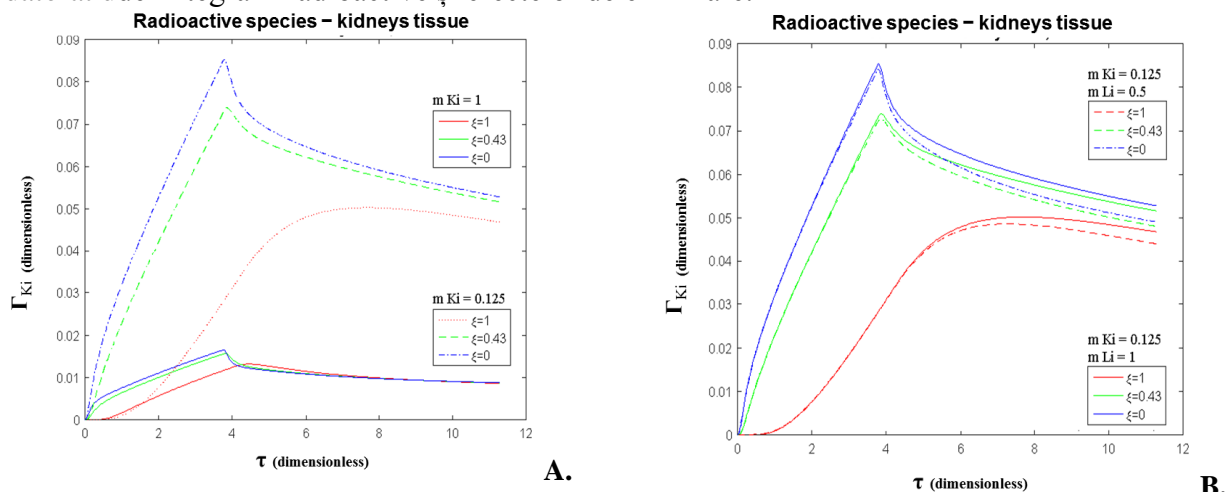


**Fig. 5.4** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din sangele rinichilor, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție al ficatului.

După cum am menționat, atunci când coeficientul de partiție pentru nanotrasor este de opt ori mai mic, ceea ce înseamnă că rinichii îl captează pe acesta din urmă pentru a-l excreta din sistem, efectul acestui clearance este foarte important. Datorită creșterii forței motrice a transferului de masă, concentrația din sânge scade mai repede de la intrare la ieșire, astfel se obțin valori mai mari pentru gradienti. Mai mult, datorită aceleiași concentrații reduse și a ratei de eliminare mai mari, chiar și după 180 s nu există nicio modificare a gradientului concentrației sanguine, observându-se un decalaj vizibil între concentrațiile de intrare și ieșire.

O tendință similară este observată pentru țesutul renal (Fig. 5.5,  $m_{Li} = 0.125$ ) cu excepția nivelului până la care activitatea lor crește, fiind de aproximativ 7 ori mai mare decât în fluxul sanguin al rinichilor. Acest rezultat evidențiază fenomenul filtrării renale, care permite trecerea moleculelor în interiorul țesutului renal. Pentru această simulare, a fost utilizat un coeficient de partiție scăzut, corespunzător nanoparticulelor cu diametrul hidrodinamic mai mic

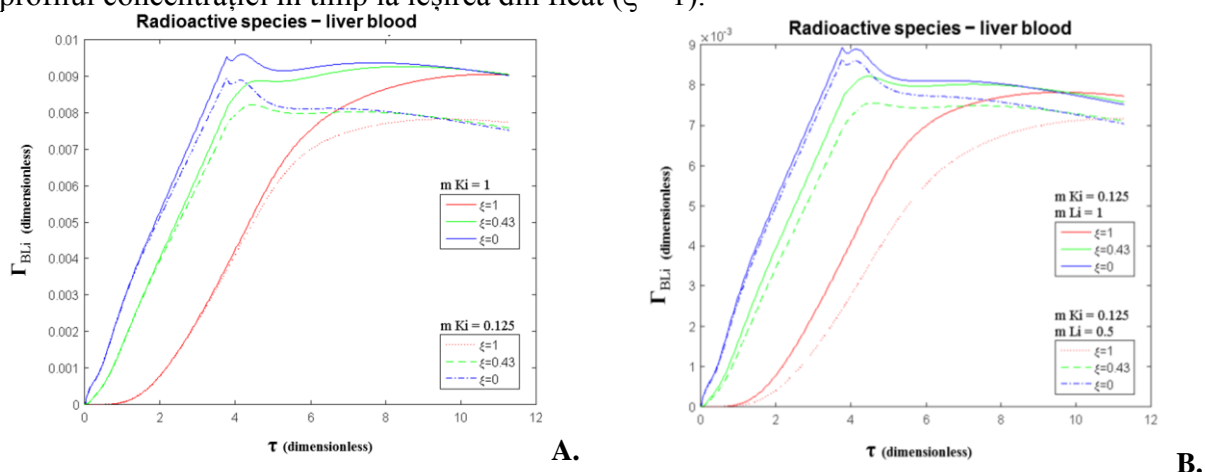
de 11 nm, care poate trece din fluxul sanguin în țesutul renal. Spre sfârșitul timpului de simulare, există un echilibru clar între sânge și țesut în ceea ce privește distribuția nanotrasorului, efect datorat dezintegrării radioactive și efectelor de eliminare.



**Fig. 5.5** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din țesutul rinichilor, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție al ficatului.

Atunci când coeficientul de partiție hepatică este redus de două ori, efectul asupra rinichilor este mult mai puțin important (Fig. 5.4 - B și Fig. 5.5 - B), datorită efectului de amortizare pe care îl au restul organelor din sistem. Ambele concentrații (din sânge și țesuturi), sunt afectate, cel mai vizibil după sfârșitul injecției traserului, diferența crescând pe măsură ce trece timpul, dar, din nou, nu s-a putut observa nicio modificare de gradient.

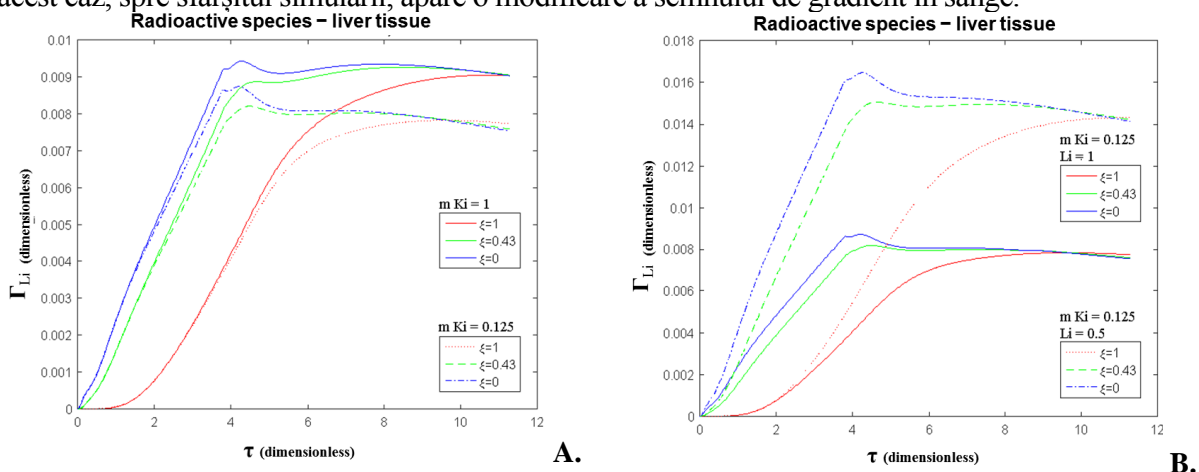
Distribuția nanotrasorului în ficat, ca și în cazul rinichilor, variază foarte mult în spațiu, deoarece ficatul este, de asemenea, un organ mare (Fig. 5.6 și Fig. 5.7). Contrar rinichilor, la intrare ( $\xi = 0$ ), creșterea concentrației este mai puțin pronunțată în perioada de injecție, datorită efectului de diluare a sângelui provenit din stomac și splină ( $m Ki = 1$ ). După ce se termină înjecția, există o perioadă scurtă de activitate constantă datorită aportului de nanotrasor radioactiv care curge din stomac și splină. Datorită contribuției stomacului, în special concentrația de intrare prezintă o variație în timp (Fig. 5.6 - A,  $m Ki = 1$ ). Transferul de masă din sânge în țesut produce aceeași variație și în mijlocul ficatului ( $\xi = 0,43$ ), modificând complet profilul concentrației în timp la ieșirea din ficat ( $\xi = 1$ ).



**Fig. 5.6** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din sângele ficatului, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție al ficatului.

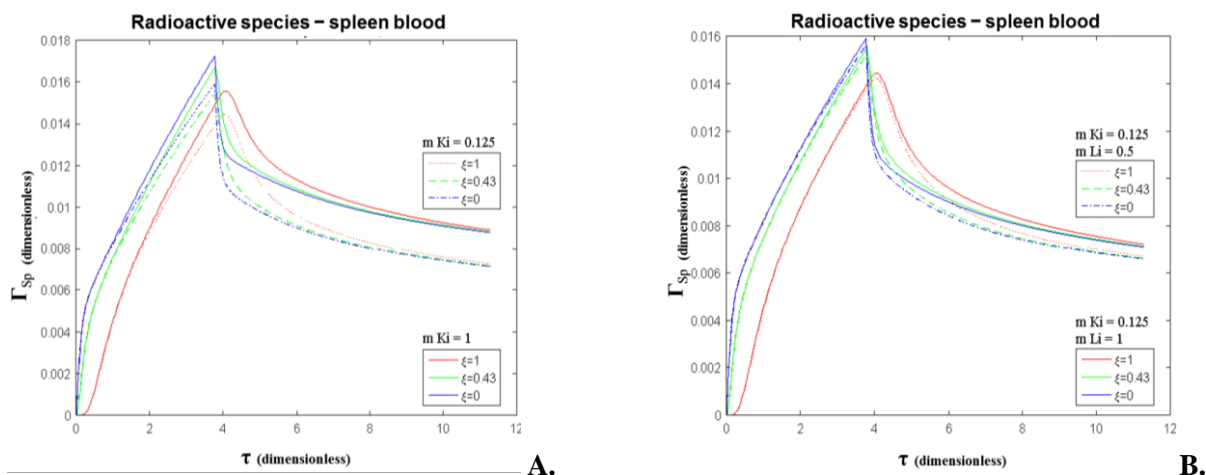
Atunci când coeficientul de partiție al rinichilor se modifică, recunoscându-i rolul de organ excretor, profilul concentrației în timp se schimbă, în special după încheierea injecției cu radiotrasor.

Nu numai că scăderea concentrației devine din ce în ce mai importantă, dar, de asemenea, apare o schimbare a semnului de gradient, după nouă unități de timp adimensionale, arătând că ficatul începe să fie o sursă de radiotrasor (Fig. 5.6 și Fig. 5.7,  $m Ki = 0,125$ ). Țesutul hepatic imită comportamentul sângelui hepatic, datorită transferului permanent de masă între cele două faze. Acest rezultat evidențiază capacitatea ficatului de a stoca compusul radioactiv pentru perioade mai lungi de 180 s, din cauza incapacității de a distruge radiotrasorul sau de a-l excreta, așa cum fac rinichii. Când coeficientul de partiție hepatică se înjumătățește, concentrația radiotrasorului în țesutul hepatic crește, dar nu de două ori (Fig. 5.7 - B), odată cu creșterea corespunzătoare a gradientului de concentrație de-a lungul țesutului hepatic. Spre sfârșitul simulării, în ambele cazuri apare o schimbare de semn pentru gradient (Fig. 5.7 - B). Concentrației sanguină scade (Fig. 5.6 - B), pe măsură ce sângele curge prin ficat, datorită fluxului crescut de transfer de masă, cauzat de creșterea forței motrice. Chiar și pentru acest caz, spre sfârșitul simulării, apare o modificare a semnului de gradient în sânge.



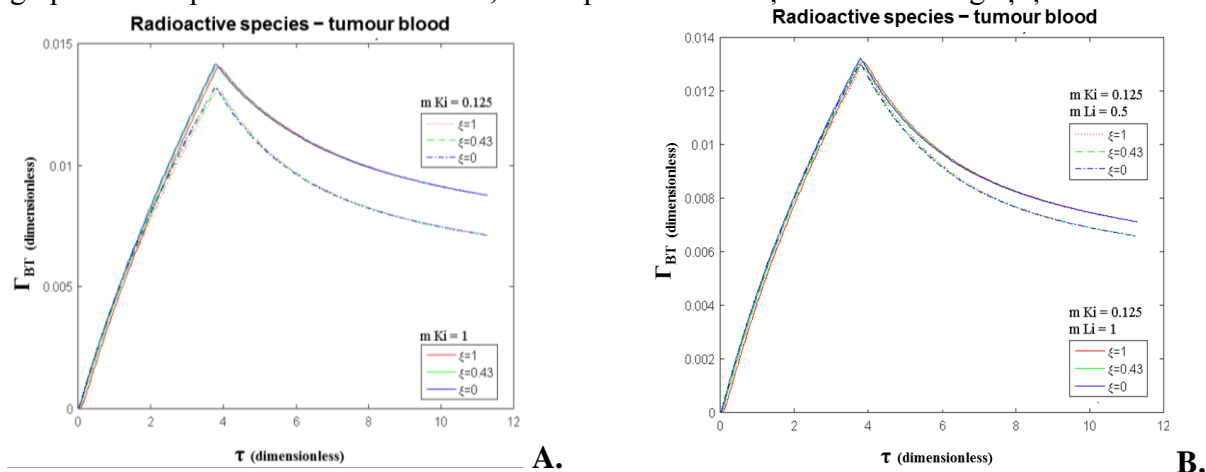
**Fig. 5.7** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din țesutul ficatului, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a ficatului.

Profilul de distribuție în compartimentele splinei și plămânilor este similar în sânge și țesut, o schimbare a semnului de gradient apare în toate cazurile, după patru unități de timp adimensionale, care se menține până la încheierea simulării. Acest lucru se datorează faptului că, după acest timp, ambele organe au devenit donatori de radiotrasor eliberat de țesutul lor. Atât în sângele splinei, cât și în cel pulmonar, creșterea activității la intrarea în vas ( $\xi = 0$ ) corespunde cu activitatea sângelui care iese din inimă. Pe măsură ce sângele curge prin aceste țesuturi, transferul de masă către acestea scade concentrația din sânge a radiotrasorului, gradientul crescând pe măsură ce sângele se apropie de ieșire.



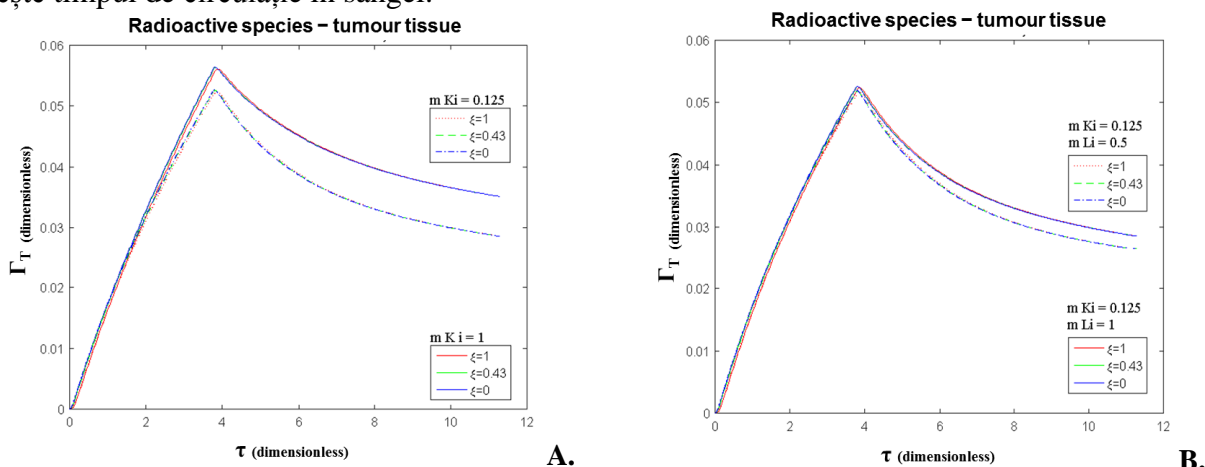
**Fig. 5.8** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din sângele splinei, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): **A.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; **B.** situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a ficatului.

În sistemul sanguin al tumorii, activitatea crește în timpul perioadei de injecție, dar profilul este diferit de cel al altor organe, datorită celei mai mari valori a grupului de dispersie - nu există discontinuitate în rata la care crește concentrația (Fig. 5.9 și Fig. 5.10). După această perioadă, urmează o scădere continuă, după 180 s doar 60% din concentrația maximă înregistrată se păstrează. Acest rezultat este corelat cu permeabilitatea sporită și efectul de retenție al endoteliului vascular al tumorilor, care permit direcționarea pasivă a compusului pentru țesutul tumoral - acest lucru se regăsește în modelul matematic în valoarea atribuită coeficientului de partiție a tumorii, și anume 0,25. Profilele de distribuție în timp a concentrației sunt identice pe toată lungimea organului, datorită grupului de dispersie cu valoare ridicată, care reprezintă interacțiunile dintre sânge și țesutul tumoral.



**Fig. 5.9** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din sângele tumorii, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): A. situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; B. situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a ficatului.

În țesutul tumoral, distribuția în timp și spațiu a concentrației de radiotrasor este asemănătoare profilului concentrației sanguine a tumorii, cu excepția nivelului maxim atins, fiind mai mare decât activitatea stomacului, splinei sau ficatului. Aceste valori sunt corelate cu studiile anterioare *in vivo* [24]. Trasorul se acumulează continuu în țesutul tumoral dacă acesta încă circulă în sânge, astfel încât acest aport compensează scăderea prin dezintegrare sau eliminare din celule. Acesta este motivul pentru care este de dorit să se îmbunătățească proprietățile fizico-chimice ale nanotracerului pentru a evita eliminarea prea rapidă și pentru a crește timpul de circulație în sânge.



**Fig. 5.10** Profilele variației concentrației în timp pentru speciile radioactive din țesutul tumoral, pe toată lungimea simulată (intrarea, mijloc și ieșire): A. situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a rinichilor; B. situația în care a fost modificat coeficientul de partiție a ficatului.

## • Concluzii

Modelul propus evidențiază variația în timp și spațiu a concentrației nanotrasorului. Mai mult, profilurile obținute în faza 1 (sânge) și faza 2 (țesut) ale fiecărui organ sunt în conformitate cu procesele de filtrare biologică (renală), sau acumulare hepatică, dar și efectul EPR al vasculaturii tumorale. Îmbunătățirea viitoare a algoritmului de calcul va permite ajustarea nivelului de absorbție în fiecare organ în funcție de mărimea nanoparticulelor, proprietăților chimice ale acestora (care poate duce la o scădere a concentrației în rinichi și o creștere în splină și ficat), densitatea receptorilor din membrana celulelor tumorale, dar și a eliminării din sânge datorită recunoașterii imune. Rezultatele sugerează că în primele 60 de secunde de la injectare, concentrația traserului atinge maximum în toate organele și după un maxim de 100 s activitatea scade la un nivel omogen distribuit pe tot volumul lor, cu excepția rinichilor unde filtrarea permanentă a sângelui duce la o profil de activitate constant în timp. În același timp, cea mai mare parte a activității injectate este distribuită în rinichi, urmată de plămâni și splină. Nivelul de activitate distribuit în tumoră este similar cu cel din interiorul inimii, acest rezultat fiind în concordanță cu valorile măsurate experimental pentru toți cei patru nanotrasori testați ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP).

## CONCLUZII GENERALE

Obiectivele stabilite pentru studiile mele de doctorat au fost dezvoltarea de noi nanotrasori cu aplicații în medicina nucleară, evaluarea preclinică a efectului biologic al acestora și utilizarea rezultatelor experimentale pentru a dezvolta un model matematic capabil să prezică biodistribuirea anumitor radiofarmaceutice în organele de interes. În acest scop, au fost sintetizate radiofarmaceutice care utilizează nanoparticule din aur funcționalizate cu peptide marcate anterior cu radioizotopul emițător de pozitroni  $^{68}\text{Ga}$  și utilizate în continuare în studiile *in vitro* și *in vivo*.

Studiile au debutat cu utilizarea nanoparticulelor de aur pe a căror suprafață au fost atașate direct peptidele marcate, optimizând timpii de marcare și funcționalizare pentru a le adapta la timpul de înjumătățire scurt al radioizotopului  $^{68}\text{Ga}$ . Evaluarea ulterioară de cineticii de legare *in vitro* la celulele tumorale a pus în evidență capacitatea nanoparticulelor de aur de a crește cantitatea de radioizotop  $^{68}\text{Ga}$  disponibil în interiorul celulelor tumorale. Scesse rezultate se datorează capacității nanoparticulelor din aur de a lega mai multe biomolecule pe suprafața lor, care mai departe se atașează la receptorii lor specifici supraexprimați pe celulele tumorale. Nanotrasorii  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC-AuNP și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC-AuNP au prezentat o retenție a radionuclizilor mai mare de 60%, aducând o creștere mai mare de 35%, respectiv 50%, comparativ cu aceleași peptide radiomarcate ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC). Aceste rezultate sunt atribuite captării mediate de receptori a nanoparticulelor, care crește cantitatea de radioizotop disponibil în celulele tumorale.

Una dintre cele mai importante provocări ale aplicațiilor *in vivo* ale nanoparticulelor destinate imagisticii nucleare este găsirea unei formulări care să ofere un timp de circulație în sânge suficient de lung pentru a efectua scanarea PET-CT. Pentru a rezolva această problemă, am utilizat în continuarea studiilor menționate anterior, nanoparticulele de aur acoperite cu un polimer (polietilen glicol) biocompatibil, activate cu esteri N-hidroxisuccinimidă. Gruparea NHS poate crea una dintre cele mai stabile legături cu aminele primare din lanțul de aminoacizi al peptidelor, îmbunătățind astfel stabilitatea *in vivo*. Peptidele radiomacrate  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-neuromedin B,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-neuromedin N, analogul de bombezină  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) și neurotensina  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT au fost funcționalizate pe structurile de AuNP-PEG(5000)-NHS și evaluate *in vitro* în vederea determinării captării, retenției și legării specifice asupra celulelor HT-29 pentru cancer de colon uman și a celulelor DU-145 de cancer de prostată. Aproape toți nanotrasorii au format legături stabile cu receptorii lor specifici, cu excepția  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB pentru care profilul de captare variază pe perioada analizei. Cea



mai mare retenție celulară s-a obținut pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP, fiind de 75% pe celulele DU-145 de cancer de prostată. Studiile de biodistribuire *ex vivo* pe șoareci imunocompromiși inoculați cu celule tumorale HT-29 și DU-145 au confirmat rezultatele obținute *in vitro*, demonstrând că retenția celulară poate fi semnificativ îmbunătățită după incubarea celulelor cu nanoparticule de aur funcționalizate cu peptide.

Cele mai mare captare tumorală a fost determinată pentru nanotrasorul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP atât pentru tumorile de colon cât și în cele de prostată, activitatea  $^{68}\text{Ga}$  triplându-se comparativ cu situația în care se injectează doar peptidele radiomarcate. Rezultate similare se obțin și pentru nanotrasorul  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP în tumorile de prostată. În plus, semnalul detectat în țesutul tumoral de prostată se dublează după injectarea  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP, dar și în tumorile de colon prin utilizarea ca agent de imagistică a nanotrasorilor  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NT-AuNP.

Comparativ cu alți radiotrasori utilizați deja în practica clinică (exemplu:  $^{68}\text{Ga}$ -NGR cu peste  $2.7 \pm 0.65\%$  DI/g reținută în tumoare la 30 min p.i., [ $^{18}\text{F}$ ]FDG cu  $2.5 \pm 0.5\%$  DI/g, în tumorile de colon, [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorocolina care prezintă  $7.9 \pm 5\%$  DI/g în tumori de prostată), valorile obținute pentru nanotrasorii preparați și testați este mai mare, plecând de la  $2.53 \pm 0.26\%$  DI/g for  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMN-AuNP până la  $9.82 \pm 2.28\%$  ID/g for  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP în tumorile de colon și  $2.79 \pm 0.4\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NMB-AuNP până la  $13.01 \pm 2.49\%$  DI/g pentru  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14)-AuNP.

Rezultate obținute experimental au permis dezvoltarea unui model matematic care oferă informații despre distribuția în spațiu și timp a concentrației radioactive de nanotrasor datorită circulației sângelui, capacității de absorbție a fiecărui organ, dar și datorită permeabilității și retenției crescute a vasculaturii tumorale. Modelul reușește să evidențieze procesele biologice, cum ar fi filtrarea renală sau stocarea hepatică, fiind un predictor fiabil al distribuției atât în vasele de sânge ale organelor, cât și în țesuturile acestora.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ

Rezultatele și datele prezentate în această teză de doctorat sunt rezultatul experimentelor și ale lucrărilor de simulare efectuate în timpul studiilor mele de doctorat. Ele aduc contribuții personale la stadiul actual al dezvoltării nanostructurilor și la aplicarea lor în medicina nucleară, prin:

- dezvoltarea a patru radiotrasori marcați cu radioizotopul  $^{68}\text{Ga}$ , care utilizează nanoparticule de aur funcționalizate cu peptide marcate în vederea țintirii receptorilor bombesinei și neurotensinei exprimați pe suprafața membranelor celulelor tumorale de prostată și colon;
- caracterizarea fizică și chimică a nanostructurilor, cu o atenție deosebită acordată legăturilor formate între peptide și nanoparticule, precum și stabilității acestor nanostructuri;
- optimizarea timpului de funcționalizare, cu scopul de a obține valori adecvate pentru radioizotopii de viață scurtă utilizați în imagistica PET, cum ar fi  $^{68}\text{Ga}$ ;
- analiza comparativă a două metode de funcționalizare pe suprafața nanoparticulelor, urmată de evaluarea biologică a compușilor radiomarcați pe liniile celulare de cancer de colon și de prostată;
- Punerea în evidență a legării specifice *in vitro* a peptidelor funcționalizate pe suprafața nanoparticulelor la receptorii lor specifici;
- evaluarea *in vivo* a potențialului nanotrasorilor pentru a ținti în mod specific tumorile de colon și prostată. Rezultatele scot în evidență absorbția de până la trei ori mai mare comparativ cu cea a acelorași peptide marcate, dar fără nanoparticule de aur, și dublă în comparație cu absorbția unor radiofarmaceutice deja utilizate în practica clinică (Exemplu: [ $^{18}\text{F}$ ]FDG);
- dezvoltarea unui model matematic care poate simula procesul de biodistribuire *in vivo* a nanotrasorilor;
- optimizarea algoritmului de calcul pentru a evidenția procesele de filtrare biologică (renală) și efectul de permeabilitatea și retenție crescută a vasculaturii tumorale.

Rezultatele prezentate în această teză promovează aceste nanotrasori pentru a fi aplicați în continuare în studiile de imagistică duală PET-CT, în care nanoparticulele de aur pot fi un agent de contrast excelent în tomografia computerizată, capabile să îmbunătățească imaginile obținute. Mai mult, studiile viitoare ar putea determina dacă nanotrasorii dezvoltați sunt stabili *in vivo*, investigând cantitatea de radioizotop  $^{68}\text{Ga}$  detașat de nanostructură sub acțiunea chelatorilor naturali din sistemul sanguin. Aceste nanostructuri pot fi utilizate în aplicații de terapie fototermică, nanoparticulele de aur având proprietatea conductivității fototermice prin iradiere laser.

Pentru a utiliza aceste produse farmaceutice pe bază de nanoparticule de aur pentru studii clinice, este necesară o validare suplimentară a metodelor de preparare și de control al calității în conformitate cu reglementările UE pentru siguranța farmaceutică.

Algoritmul de modelare matematică ar putea fi îmbunătățit prin adaptarea acestuia în funcție de diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor, proprietățile lor chimice și densitatea receptorilor activi biologic de pe suprafața membranelor celulare și nivelul de necroză a țesutului tumoral.

## DISEMINAREA REZULTATELOR

### • **Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate de circulație internațională cotate ISI:**

1. **Livia E. Chilug**, Dana Niculae, Radu Anton Leonte, Alexandrina Nan, Rodica Turcu, Cosmin Mustaciosu, Radu Marian Serban, Vasile Lavric, Gina Manda, Preclinical Evaluation of NHS-Activated Gold Nanoparticles Functionalized with Bombesin or Neurotensin-Like Peptides for Targeting Colon and Prostate Tumours, *Molecules*, vol. 25, nr. 15, 2020, pp. 3363, ISSN 1420-3049
2. **Livia E. Chilug**, Radu Anton Leonte, Ciuca Maria Daniela, Vasile Lavric, Gold nanoparticles-based radiopharmaceuticals for nuclear molecular imaging and therapy applications, acceptat pentru publicare în *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 2020
3. **Livia E. Chilug**, Radu A. Leonte, Marcela E. Barbița-Pătrașcu, Alexandru C. Ion, Cătălin S. Tuță, Alina Raicu, Gina Manda, Dana Niculae, *In vitro* binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 311, nr. 2, 2017, pp. 1485–1493, ISSN: 1588 2780

### • **Lucrări tip proceedings indexate ISI Clarivate Analytics Web of Science:**

1. Niculae Dana, **Chilug Livia**, Serban Radu, Abrunhosa Antero, Leonte Radu, Turcu Rodica, Nan Alexandrina, Lavric Vasile, Activated Gold Nanoparticles Conjugated with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) for Targeting Tumours Expressing GRP Receptors, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 46, S108-S108, 2019
2. Raicu Alina, Min Elena Alexandra, **Chilug Livia Elena**, Leonte Radu Anton, Serban Radu Marian, Tuta Catalin Stelian, Draganescu Doina, Niculae Dana, Synthesis and Biological valuation of Gallium Radiopharmaceuticals Compounds, *Proceedings of The Romanian National Congress of Pharmacy, 17<sup>th</sup> Edition: 21<sup>st</sup> Century Pharmacy – Between Intelligent Specialization and Social Responsibility*, 2018, pp. 187-192
3. D. Niculae, D. Draganescu, E. A. Min, A. Raicu, **L. Chilug**, G. Manda, R. A. Leonte, I. Manea, M. Costache, Bioaffinity testing of  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Neurotensin and neurotensin fragments as theranostic agent in colon cancer, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 44, supl. 2, 2017, pp. S555-S555, EP-0297, ISSN: 1619-7089

### • **Prezentări orale la conferințe internaționale/naționale:**

1. D. Niculae, **L. E. Chilug**, R. M. Serban, A. J. Abrunhosa, R. A. Leonte, R. Turcu, A. Nan, V. Lavric, Activated Gold Nanoparticles Conjugated with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) for Targeting Tumours Expressing GRP Receptors, *Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM 19)*, Barcelona - Spania, October, 2019
2. Dana Niculae, **Livia Chilug**, Alina Raicu, Radu A. Leonte, Radu Serban, Cosmin Mustaciosu, Marieta Panait, Iuliana Gruia, Gina Manda, Vasile Lavric, Preclinical evaluation of radiolabelled peptides targeting neurotensin receptor subtype 1, as theranostic agents in colon cancers, 13<sup>th</sup>



International Symposium on the synthesis and applications of isotopes and isotopically labelled compounds (IIS-2018), Praga-epublica Cehă, Junie, 2018

**3. Livia Chilug**, Radu Leonte, Dana Niculae, Doina Draganescu, Rodica Turcu, Alexandrina Nan, Gina Manda, Vasile Lavric, Activated gold nanoparticles conjugated with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PEG(4)-BBN(7-14) for targeting tumours expressing GRP receptors, Nuclear Medicine Days, Iași, România, Noiembrie 2018

**4. L. E. Chilug**, R. A. Leonte, V. Lavric, D. Niculae, A. Raicu, D. Draganescu, E. A. Min, R. M. Serban, G. Manda, Biophysical studies of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides as improved tumour targeting system, 17th International Balkan Workshop on Applied Physics (IBWAP), Constanța-România, 2017

**5. L. E. Chilug**, R. A. Leonte, V. Lavric, D. Niculae, A. Raicu, D. Draganescu, E. A. Min, R. M. Serban, G. Manda, Studiul in vitro al cineticii nanoparticulelor de aur funcționalizate cu peptide conjugate cu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA, Simpozionul Translațional de Oncologie Personalizată (STOP Cancer), București-România, 2017

**6. D. Niculae**, D. Draganescu, R.A. Leonte, A. Raicu, E.A. Min, **L.E. Chilug**, R.M. Serban, M.I. Gruia, M. Panait, V. Negoita, Preclinical evaluation of  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NT as theranostic pair in cancers expressing neurotensin receptors, Simpozionul Translațional de Oncologie Personalizată (STOP Cancer), București-România, 2017

**7. Elena A. Min**, **Livia E. Chilug**, Alina Raicu, Radu M. Serban, Radu A. Leonte, Dana Niculae, Doina Drăgănescu, Comparative biological evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-NOC for adenocarcinoma and glioblastoma diagnosis, The Congress of the University of Medicine and Pharmacy Carol Davila Bucharest 5<sup>th</sup> Edition, București-România, 2017

**8. Dana Niculae**, Radu A. Leonte, Doina Drăgănescu, **Livia Chilug**, Radionuclidul Ga-68 și radiofarmaceutice marcate cu Ga-68 - din laborator în practica clinică, Conferința Societății Române de Medicină Nucleară, Predeal-România, 2016

**9. Livia E. Chilug**, Alina Raicu, Elena A. Min, Radu A. Leonte, Radu M. Serban, Dana Niculae, Evaluarea comparativă dintre  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC și  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC-NP pe tumori neuroendocrine, Conferința Societății Române de Radioterapie și Zilele Medicale ale Institutului Oncologic „Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu”, București-România, 2015

**10. R. Leonte**, **Livia Chilug**, Alina Raicu, Elena Miu, R. Serban, Dana Niculae, Preclinical evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RDG) dimmers for imaging of angiogenesis, Conferința Societății Române de Radioterapie și Zilele Medicale ale Institutului Oncologic „Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu”, București-România, 2015

• **Prezentări tip oster:**

**1. Chilug Livia**, Dana Niculae; Radu Anton Leonte; Gina Manda; Cosmin Mustaciosu; Vasile Lavric, Comparative preclinical evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -labelled Neuromedin N and B for targeting glioblastoma malignant tissues, International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR 2019), Viena-Austria, 2019

**2. Alina Raicu**, **Livia Elena Chilug**, Radu Anton Leonte, Radu Marian Serban, Dana Niculae, In vivo evaluation of some radiolabeled peptides for targeting malignant melanoma, International Workshop Imaging and therapeutic targeting in cancerology: New advances and trends in preclinical and clinical studies, Le Bono-Franța, 2018

**3. Raicu Alina**, Min Elena Alexandra, **Chilug Livia Elena**, Leonte Radu Anton, Serban Radu Marian, Tuta Catalin Stelian, Draganescu Doina, Niculae Dana, Synthesis and biological evaluation of Gallium radiopharmaceuticals compounds, The 17<sup>th</sup> Edition of the National Pharmacy Congress in Romania 2018 (NPCA 2018) – The 21<sup>st</sup> Pharmacy – Between Smart Specialization and Social Responsibility, București-România, 2018

**4. D. Niculae**, D. Draganescu, E. A. Min, A. Raicu, **L. Chilug**, G. Manda, R. A. Leonte, I. Manea, M. Costache, Bioaffinity testing of  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Neurotensin and neurotensin fragments as

teranostic agent in colon cancer, European Association of Nuclear Medicine Annual Congress, Viena-Austria, 2017

5. D. Niculae, D. Draganescu, R. A. Leonte, A. Raicu, E. A. Min, **L. E. Chilug**, R. M. Serban, M. I. Gruia, M. Panait, V. Negoita,  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$  radiolabeled compounds for targeting neurotensin receptors. Synthesis and *in vitro/in vivo* evaluation, 3rd Romanian Conference of Nuclear Medicine in conjunction with International Seminar on Applying Radionuclides for Therapy, București-România, 2017

6. E. A. Min, **L. E. Chilug**, A. Raicu, R. M. Serban, R. A. Leonte, D. Niculae, D. Draganescu, Comparative biological profile of  $^{68}\text{Ga}$  somatostatin-analogue for colorectal adenocarcinoma and glioblastoma diagnosis, 3<sup>rd</sup> Romanian Conference of Nuclear Medicine in conjunction with International Seminar on Applying Radionuclides for Therapy, București-România, 2017

7. **Livia E. Chilug**, Radu A. Leonte, Alina Raicu, Marcela E. Barbinta Patrascu, Alexandru C. Ion, Catalin S. Tuta, Dana Niculae, *In vitro* binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides, 1st International Conference on Radioanalytical and Nuclear Chemistry (RANC-2016), Budapesta-Ungaria, 2016

8. Alina Raicu, Elena A. Min, **Livia E. Chilug**, Radu A. Leonte, Radu M. Serban, Dana Niculae, Synthesis and Bioaffinity Profile to Neurotensin Receptors of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Neurotensin, 1st International Conference on Radioanalytical and Nuclear Chemistry (RANC 2016), Budapesta-Ungaria, 2016

9. **Livia E. Chilug**, Radu A. Leonte, Alina Raicu, Marcela E. Barbiņa-Pătrașcu, Alexandru C. Ion, Cătălin S. Tuță, Dana Niculae, Improving tumor uptake and retention of  $^{68}\text{Ga}$  radiolabeled compounds using gold nanoparticles as intracellular delivery system, Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC ANMBES), Brașov-România, 2016

10. **Livia E. Chilug**, Radu A. Leonte, Alina Raicu, Marcela E. Barbiņa-Pătrașcu, Alexandru C. Ion, Cătălin S. Tuță, Dana Niculae, Improving tumor uptake and retention of  $^{68}\text{Ga}$  radiolabeled compounds using gold nanoparticles as intracellular delivery system, Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES), Brașov-România, 2016

## BIBLIOGRAFIE

- [1] R. A. Leonte, D. Niculae, L.S. Craciun, G. Cata-Danil, "Medical radioisotopes production at TR-19 cyclotron from IFIN-HH", U.P.B. Sci. Bull., Series A, vol. 79, nr. 1, 2017, pp. 223-236.
- [2] P. C. S. J. Turkevich, J. Hillie, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold", Discussions of the Faraday Society, vol. 11, 1951.
- [3] S. Nie, "Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine", Nanomedicine (Lond), vol. 5, no. 4, Jun 2010, pp. 523-8.
- [4] Y. N. Zhang, W. Poon, A. J. Tavares, I. D. McGilvray, and W. C. W. Chan, "Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination," J Control Release, vol. 240, Oct 28 2016, pp. 332-348.
- [5] R. A. Sperling and W. J. Parak, "Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles", Philos Trans A Math Phys Eng Sci, vol. 368, no. 1915, Mar 28 2010, pp. 1333-83.
- [6] D. Wild *et al.*, "DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals", Eur J Nucl Med Mol Imaging, vol. 30, no. 10, Oct 2003, pp. 1338-47.
- [7] **L. E. Chilug et al.**, "*In vitro* binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA conjugated peptides," Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, vol. 311, no. 2, pp. 1485-1493, 2016.
- [8] J. K. Sosabowski and S. J. Mather, "Conjugation of DOTA-like chelating agents to peptides and radiolabeling with trivalent metallic isotopes", Nat Protoc, vol. 1, no. 2, 2006, pp. 972-6.

- [9] *Y. Q. He, S. P. Liu, L. Kong, and Z. F. Liu*, "A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering", *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 61, no. 13-14, Oct 2005, pp. 2861-6.
- [10] Cytodiagnostic. Available: <http://portal.cytodocs.com:8008/documents/Product-Sheets/Product-Sheet-NHS-Activated-Gold-Nanoparticles.pdf>
- [11] *Y. Huai, Y. Zhang, X. Xiong, S. Das, R. Bhattacharya, and P. Mukherjee*, "Gold Nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine", *Cell Stress*, vol. 3, no. 8, 2019, pp. 267-279.
- [12] *M. C. M. Peter Hein, K. Leineweber, T. Wieland, N. Wettschureck, S. Offermanns*, "Receptor and Binding Studies", in *Practical Methods in Cardiovascular Research*, W. M. Stefan Dhein/Friedrich, Mario Delmar, Ed., ed: Springer, 2005, pp. 723-783.
- [13] *W. Schlegel*, Peptide-receptor interaction: An introduction (*Synaptic Constituents in Health and Disease*). Ljubljana-Yugoslavia, Oxford-U.K.: Elsevier, 1980, p. 792.
- [14] *R. Quirion, P. Gaudreau, S. St-Pierre, and F. Rioux*, "Localization of neurotensin binding sites in rat kidney", *Peptides*, vol. 3, no. 5, 1982, pp. 765-769.
- [15] *J. Zong, S. L. Cobb, and N. R. Cameron*, "Peptide-functionalized gold nanoparticles: versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications", *Biomater Sci*, vol. 5, no. 5, May 2017, pp. 872-886.
- [16] *M. Yu and J. Zheng*, "Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles", *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, Jul 28 2015, pp. 6655-74.
- [17] *S. Guo and L. Huang*, "Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011, 2011, pp. 1-12.
- [18] *M. Longmire, P. L. Choyke, and H. Kobayashi*, "Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats", *Nanomedicine (Lond)*, vol. 3, no. 5, Oct 2008, pp. 703-17.
- [19] *D. Cassano et al.*, "Biosafety and Biokinetics of Noble Metals: The Impact of Their Chemical Nature", *ACS Applied Bio Materials*, vol. 2, no. 10, 2019, pp. 4464-4470.
- [20] *E. G. 'a-Garayoa et al.*, "Preclinical Evaluation of a New Stabilized Neurotensin(8–13) Pseudopeptide Radiolabeled with <sup>99m</sup>Tc," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 43, no. 3, 2002, pp. 374-383.
- [21] *X. F. Li, Y. Du, Y. Ma, G. C. Postel, and A. C. Civelek*, "(18)F-fluorodeoxyglucose uptake and tumor hypoxia: revisit (18)f-fluorodeoxyglucose in oncology application", *Transl Oncol*, vol. 7, no. 2, pp. 240-7, Apr 2014.
- [22] *X. F. Li, Y. Ma, X. Sun, J. L. Humm, C. C. Ling, and J. A. O'Donoghue*, "High <sup>18</sup>F-FDG uptake in microscopic peritoneal tumors requires physiologic hypoxia", *J Nucl Med*, vol. 51, no. 4, pp. 632-8, Apr 2010.
- [23] *T. R. DeGrado, R. E. Reiman, D. T. Price, S. Wang, and R. E. Coleman*, "Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry of <sup>18</sup>F-Fluorocholine," *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 43, no. 1, pp. 92-96, 2002.
- [24] *L. E. Chilug et al.*, "Preclinical Evaluation of NHS-Activated Gold Nanoparticles Functionalized with Bombesin or Neurotensin-Like Peptides for Targeting Colon and Prostate Tumours", *Molecules*, vol. 25, no. 15, 2020.