



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



“Preparación y caracterización de nanopartículas de
ácido poli(láctico-co-glicólico) PLGA modificadas
con ácido hialurónico y radiomarcadas con
¹⁷⁷Lu para la liberación controlada de metotrexato”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICAS

PRESENTA:

**Q.F.B. ROSA MAYDELID TRUJILLO
NOLASCO**

Dirigido por:

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

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

Dra. en C. y T.F. Mariana Ortíz Reynoso (UAEMéx)



Toluca de Lerdo, Estado de México, 2018



Parte de la investigación del presente trabajo de Tesis de Maestría, se realizó en el **Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER)** de **CONACyT** adscrito a la **Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ)**, México. El mismo se realizó con financiamiento del proyecto: International Atomic Energy Agency CRP-F22064 (Contract No. 18358).

Responsable Técnico: Dra. en C. Blanca Elí Ocampo García.



Parte de la investigación del presente trabajo de Tesis de Maestría, se realizó en la:
**Facultad de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de México, con
financiamiento del proyecto número 4288/2017/CI UAEM.**

Responsable Técnico: Dr. Enrique Morales Avila

“No culpes a nadie”

Nunca te quejes de nadie, ni de nada, porque fundamentalmente tú has hecho lo que querías en tu vida.
Acepta la dificultad de edificarte a ti mismo y el valor de empezar corrigiéndote.

El triunfo del verdadero hombre surge de las cenizas de su error. Nunca te quejes de tu soledad o de tu suerte, enfóntala con valor y acéptala. De una manera u otra es el resultado de tus actos y prueba que tú siempre has de ganar.

No te amargues de tu propio fracaso ni se lo cargues a otro, acéptate ahora o seguirás justificándote como un niño. Recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar y que ninguno es tan terrible para claudicar.
No olvides que la causa de tu presente es tu pasado, así como la causa de tu futuro es tu presente.

Aprende de los audaces, de los fuertes, de quien no acepta situaciones, de quien vivirá a pesar de todo, piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo y tus problemas sin eliminarlos morirán.

Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande que el más grande de los obstáculos, mírate en el espejo de ti mismo y serás libre y fuerte y dejarás de ser un títere de las circunstancias porque tú mismo eres tú destino.

Levántate y mira el sol por las mañanas y respira la luz del amanecer. Tú eres parte de la fuerza de tu vida, ahora despiértate, lucha, camina, decídete y triunfarás en la vida; nunca pienses en la suerte, porque la suerte es: el pretexto de los fracasados.

Pablo Neruda

DEDICATORIAS

A **Dios**, gracias por la vida, y por poner a cada persona, cada situación y tropiezo en mi vida porque me han hecho aprender, crecer y ser más fuerte. En tus manos pongo mi futuro, ayúdame a que cada decisión que tome sea la correcta.

A MIS PAPÁS

De todo corazón a mis padres, **José de Jesús y Veronica**, por el amor y apoyo que me han dado desde el día en que nací, infinitamente gracias por su ejemplo, sus experiencias y consejos, las palabras duras y los momentos dulces que me han regalado. Lo que soy es por ustedes y para ustedes. ¡Los amo!

A MIS HERMANOS

Veronica, Fernando y Daniel gracias por siempre impulsarme para lograr todos mis metas, porque siempre están a mi lado y comparten mis logros y fracasos. Gracias porque sé que siempre podré contar con ustedes y ustedes saben que siempre estaré para cuando me necesiten, así nos enseñó papá y mamá. Y recuerden que deben llegar muy lejos para que el esfuerzo que han hecho nuestros padres rinda grandes frutos. ¡Los amo!

A MI FAMILIA

Abuelitos Tino y Gloria, Abuelito Adolfo, Abuelita Elia, Tío Mario y familia, Tía Flor y familia, Tío Juan y familia, primos, primas y a todos muchas gracias por creer en mí, por quererme y apoyarme en todos los aspectos.

A mis pequeños **Brandon y Monserrat** son mi más grande satisfacción, alegran cada día de mi vida con la inocencia de su sonrisa y su mirada, y me han enseñado la infinita capacidad que Dios nos ha dado para amar. ¡Los amo con toda mi alma y con todo mi corazón!

A **Felipe**, gracias por el apoyo que me has dado desde el día en que te conocí, gracias por compartir tu vida conmigo, este logro no es solo mío, también es tuyo, porque juntos llegamos hasta aquí. ¡Te amo!

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Departamento de Gerencia y Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares donde se realizó gran parte de esta investigación.

Al Dr. Enrique gracias por el apoyo que siempre me ha brindado y por ser un ejemplo de perseverancia y trabajo, por la oportunidad de aprender y por la fortuna que he tenido de conocer no solo a un excelente profesional sino también a una gran persona. Por más que diga, no me alcanzarán las palabras para expresarle mi admiración y gratitud.

A la Dra. Blanquita le agradezco su tiempo, dedicación y confianza para realizar esta tesis, así como sus consejos y enseñanzas, y sobre todo por el apoyo que me ha brindado, por ser una excelente investigadora, pero sobre todo un excelente ser humano. ¡Muchas gracias Doctora!

A la Dra. Guille quiero agradecerle todo el apoyo durante el desarrollo de este proyecto, gracias por todos sus consejos y conocimientos y sobre todo gracias por ejemplo de humildad, dedicación, perseverancia.

De modo muy especial, mi agradecimiento para mis amigos del ININ que me apoyaron incondicionalmente en la realización de esta tesis, y me brindaron su amistad ¡Gracias Alo y Bren!

CONTENIDO

1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	11
3. ANTECEDENTES	13
3.1. Artritis reumatoide (AR)	13
3.2. Radiosinoviotesis (RSO)	13
3.2.1. ¹⁷⁷Lutecio (¹⁷⁷Lu)	14
3.3. Quimioterapia para AR	16
3.3.1. Metotrexato (MTX)	16
3.4. Transporte y liberación de fármacos con excipientes poliméricos	18
3.4.1. Nanopartículas poliméricas	19
3.4.2. Modificación superficial de sistemas poliméricos	19
3.4.3. Nanopartículas en medicina	20
3.5. Sistemas de transporte de fármacos empleados en AR usando nanopartículas poliméricas	21
3.6. Ácido hialurónico (HA)	21
3.6.1. Receptor CD44	23
3.6.1.1. Estructura del receptor CD44	24
3.7. Sistemas de nanopartículas modificadas o preparadas de HA	24
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVOS	28
6.1. Objetivo general	28
6.2. Objetivos específicos	28
7. METODOLOGÍA	30
7.1. Preparación de nanopartículas poliméricas de:	30
7.2. Caracterización de los sistemas poliméricos	32
7.3. Evaluación del perfil de liberación del metotrexato (MTX)	32
7.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la captación específica de las nanopartículas	32
7.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la viabilidad celular	33
8. RESULTADOS	35
8.1. Artículo enviado	35
8.2. Registro de patente	72
9. CONCLUSIONES GENERALES	106

10. PERSPECTIVAS	108
11. REFERENCIAS	109

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de decaimiento de ^{177}Lu con las principales partículas β^- y fotones emitidos por ^{177}Lu	14
Figura 2. Estructura del complejo Lu-DOTA.	15
Figura 3. Estructura del metotrexato.	17
Figura 4. Estructura del ácido hialurónico.	22
Figura 5. Estructura del receptor CD44: a) forma estándar (CD44 _s), b) isoformas variantes (CD44 _v).	24

Índice de tablas

Tabla 1. Agentes quelantes de Lu^{3+} y constantes de estabilidad.	15
Tabla 2. Aplicaciones en medicina nuclear del ^{177}Lu	16

Abreviaturas

AR: Artritis reumatoide

RSO: Radiosinoviotesis

MTX: Metotrexato

HA: Ácido hialurónico

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

EDA: Etilendiamina

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

NHSS: N-hidroxisulfosuccimida

NPs: Nanopartículas

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

¹⁷⁷Lu: ¹⁷⁷Lutecio

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

GGC: Glicina-Glicina-Cisteína

DMF: Dimetilformamida

TNF: Factor de necrosis tumoral

1. RESUMEN

La radiosinovioartesis (RSO) es una técnica utilizada para disminuir la inflamación del tejido sinovial mediante la inyección intraarticular de un radionúclido emisor beta: β^- en forma de partículas o coloides. Actualmente el ^{177}Lu ha sido utilizado en radioterapia debido a sus características de desintegración favorables ($T_{1/2} = 6.71$ días; $\beta_{\text{máx}} = 0.497$ MeV, 78 %; $\gamma = 0.208$ MeV, 11 % y un alcance promedio de 2 mm en tejido blando). Las nanopartículas poliméricas a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables como el PLGA representan una alternativa a las terapias convencionales contra la artritis reumatoide (AR), ya que permiten aumentar la selectividad y efectividad del tratamiento y minimizar los efectos secundarios no deseados. El metotrexato (MTX) es un fármaco citotóxico ampliamente utilizado en el tratamiento de la artritis, mientras que el ácido hialurónico (HA) es un ligando específico para los receptores de CD44 sobreexpresados en las células del tejido sinovial inflamado como los macrófagos. El objetivo de este trabajo fue sintetizar ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) como un sistema de administración de fármaco con reconocimiento específico potencialmente útil en la radiosinovioartesis para el tratamiento local de la artritis reumatoide. Métodos: El sistema de nanopartículas poliméricas se preparó mediante el método de emulsificación evaporación del disolvente. La conjugación con -HA se llevó a cabo mediante una reacción con carbodiimida, y el agente quelante -DOTA se conjugó mediante una reacción con HATU. La caracterización fisicoquímica se realizó mediante técnicas de UV-Vis, FT-IR, SEM y DLS. La encapsulación de MTX y la eficacia de carga se determinaron mediante UV-Vis. El marcaje con ^{177}Lu se realizó en medio acuoso a pH 7.0. Resultados: el diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas de DOTA-HA-PLGA(MTX) fue de 167.6 nm, con una distribución monomodal. Las técnicas espectroscópicas demostraron la conjugación de HA y DOTA al nanosistema polimérico. La eficiencia de encapsulado de metotrexato (MTX) fue de 95.2 %, con una eficiencia de carga del 6 %. El perfil de liberación mostró una respuesta a favor de condiciones de pH ácido (5.3). La pureza radioquímica se determinó de $96 \pm 2\%$ mediante ITLC. Finalmente el sistema fue evaluado en células RAW 264.7 mostrando efectos citotóxicos y de captación específica. Conclusión: El sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) es un nanosistema específico que mostró propiedades adecuadas para la radiosinovioartesis y para la terapia con MTX en la AR.

2. ABSTRACT

Radiosynoviorthesis is a technique used to decrease inflammation of the synovial tissue by intraarticular injection of a β -emitting radionuclide into the joint in the form of particles or colloids. ^{177}Lu is suitable for radiotherapy due to its decay characteristics ($T_{1/2} = 6.71$ days, $\beta_{\text{max}} = 0.497$ MeV, 78 %, $\gamma = 0.208$ MeV, 11 % and an average range of 2 mm in soft tissue). The polymeric nanoparticles from biocompatible and biodegradable polymers such as PLGA represent an alternative to conventional therapies against rheumatoid arthritis (RA), since they allow to increase the selectivity and effectiveness of the treatment and minimize unwanted side effects. Methotrexate (MTX) is a cytotoxic drug widely used in the treatment of arthritis, while hyaluronic acid (HA) is a specific ligand for CD44 receptors overexpressed in inflamed synovial tissue cells such as macrophages. The aim of this research was to synthesize ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) as a smart drug delivery system with target-specific recognition potentially useful in radiosynoviorthesis for local treatment of rheumatoid arthritis. *Methods:* The polymeric nanoparticle system was prepared by single emulsification-solvent evaporation method. The conjugation with -HA was carried out by a reaction with carbodiimide, and the chelating agent -DOTA was conjugated by a reaction with HATU. Physicochemical characterization was performed by UV-Vis, FT-IR, SEM and DLS. The MTX encapsulation and loading efficiency were determined by UV-Vis. ^{177}Lu labelling was performed in aqueous medium at pH 7.0. *Results:* The DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticle mean diameters was 167.6 nm, with a monomodal and narrow distribution. Spectroscopic techniques demonstrated the conjugation of HA and DOTA to polymeric nanosystem. The MTX encapsulation was 95.2 % and the loading efficiency was 6 %. The release profile showed a response in acid pH conditions (5.3). The radiochemical purity was 96 ± 2 % determined by ITLC. Finally, the system was evaluated in RAW 264.7 cells showing cytotoxic effects and specific uptake. *Conclusion:* ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) was prepared as a biocompatible polymeric PLGA nanoparticles conjugated to hyaluronic acid for specific targeting. The therapeutic nanosystem is based on bi-modal mechanisms using MTX as a disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) and ^{177}Lu as a radiotherapeutic component. ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX)-HA is a target-specific nanosystem that showed properties suitable for radiosynovectomy and for MTX therapy in RA.

MARCO TEÓRICO

3. ANTECEDENTES

3.1. Artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que afecta entre el 0.4 y 1 % de la población a nivel mundial, su prevalencia aumenta con la edad ocurriendo principalmente entre los 40 y 70 años y siendo las mujeres de dos a tres veces más susceptibles a padecerla que los hombres. Tiene relevante importancia socioeconómica ya que es causa importante de discapacidad y en pacientes adultos se le relaciona con enfermedades cardiovasculares que conducen a un aumento en la mortalidad y una reducción de 5 a 10 años en la esperanza de vida (Poh et al. 2017; Gouveia et al. 2015; Mitragotri & J. W. Yoo 2011; Shin et al. 2014).

La patogénesis de la AR involucra a antígenos externos o auto-antígenos, que son desconocidos, los cuales desencadenan respuestas inmunes anormales que a su vez generan la infiltración y activación de linfocitos, neutrófilos y macrófagos en la membrana sinovial. Una vez activados los macrófagos inducen la producción de citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina-1 y -6, así como la prostaglandina E2 y las proteasas lo que resulta en la destrucción de la membrana sinovial (Mitragotri & J. W. Yoo 2011). Además, los macrófagos una vez activados sobre-expresan receptores CD44 que se han detectado de 3.5 a 10.7 veces más en pacientes con AR que en pacientes con osteoartritis y traumatismos articulares respectivamente, por lo que los altos niveles de CD44 han sido asociados con el grado de inflamación y progresión de la enfermedad (Shin et al. 2014).

3.2. Radiosinoviortesis (RSO)

La RSO consiste en la inyección intraarticular de un radionúclido (emisor beta: β^-) en forma de partículas o coloides con un tamaño de partícula en el rango de 1-20 μm . La emisión de radiación β^- disminuye el proceso inflamatorio y produce ablación sobre la membrana sinovial inflamada (pannus) con posterior fibrosis (Klett et al. 2007; Mödder 2012). Los isótopos más utilizados para RSO son Itrio-90 (^{90}Y), Renio-186 [^{186}Re], Erblio-169 [^{169}Er], Fósforo-32 [^{32}P] y actualmente Lutecio-177 [^{177}Lu].

3.2.1. ^{177}Lu (Lutecio (^{177}Lu))

El ^{177}Lu es un radionúclido con una vida media de 6.71 días y posee emisiones $\beta_{\text{máx}}$ de 0.497 MeV con una abundancia de 78 %; con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando. Sus emisiones γ son de 0.208 MeV en una abundancia del 11 %. En células, produce efecto de fuego cruzado, por lo que permite la irradiación del tejido en forma homogénea. El esquema de decaimiento se muestra en la figura 1 (Kunikowska et al. 2011).

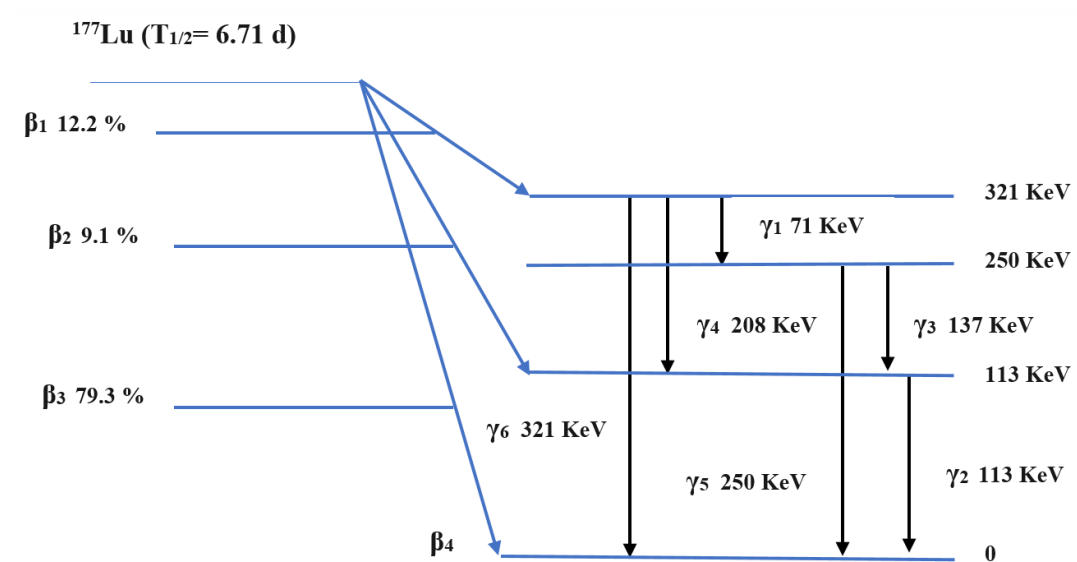


Figura 1. Esquema de decaimiento de ^{177}Lu con las principales partículas β^- y fotones emitidos por ^{177}Lu .

Es el último miembro de la serie de lantánidos, con 71 electrones dispuestos en la configuración $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^16s^2$. Durante una reacción química, los átomos de Lu pierden los dos electrones más externos y el único electrón 5d, generando así un metal +3. El lutecio forma complejos con números de coordinación de 6, 7, 8 y 9, siendo 8 y 9 los más comunes y estables. El agente quelante DOTA forma complejos con una estabilidad termodinámica significativamente alta comparada con otros agentes quelantes (ver tabla 1).

Tabla 1. Agentes quelantes de Lu ³⁺ y constantes de estabilidad.	
Agente quelante	Log de la constante de estabilidad
DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético)	12.5
EDTA (ácido etilendiamino tetraacético)	19.8
NTA (ácido nitrilotriacético)	22.4
DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético)	25.4
DO3A (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotriacético)	23.0
NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético)	15.3

Los complejos DOTA-Lu³⁺ tienen una geometría de antiprisma cuadrada truncada, donde el plano basal está ocupado por cuatro nitrógenos de las aminas del macrociclo, mientras que la tapa está ocupada por los cuatro oxígenos de los carboxilatos y la posición límite está ocupada por una molécula de agua (ver figura 2) (Banerjee et al. 2015).

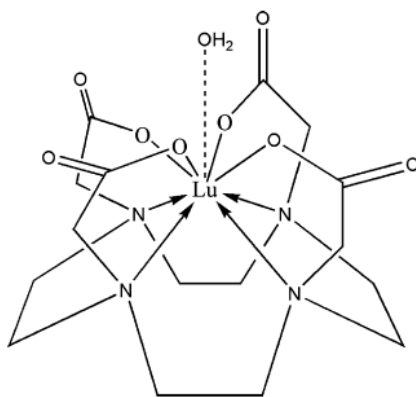


Figura 2. Estructura del complejo Lu-DOTA.

El ¹⁷⁷Lu tiene aplicaciones en medicina nuclear, entre las que se incluyen terapia paliativa en dolor crónico, tratamiento de tumores neuroendocrinos, gastroenteropancreáticos y metástasis óseas (Marcados & Lu 2015); algunos ejemplos se describen en la tabla 2:

Tabla 2. Aplicaciones en medicina nuclear del ^{177}Lu .			
Radiofármaco	Tratamiento de	Actividad (MBq)	Referencia
^{177}Lu -PYP , ^{177}Lu -MDP y ^{177}Lu -EDTMP	Metástasis esqueléticas	~ 10	(Abbasi 2012; Milenic et al. 2002)
^{177}Lu -DOTA-AE105	Cáncer colorrectal	18.4 y 28.3	(Persson et al. 2012)
^{177}Lu -DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH ₂	Cáncer positivo a receptores de GRP (cáncer de próstata)	0.185**	(Smith et al. 2003)
^{177}Lu -PA-DOTA-CC49	Carcinoma de ovario	1665/m ² *	(Milenic et al. 2002)
^{177}Lu -DOTA-TOC	Tumores neuroendocrinos	7400	(Forrer et al. 2005)
	Neuroblastoma infantil	7300	(Gains et al. 2011)
	Paraganglioma y meningioma	7400	(Van Essen et al. 2006)
	Tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos	3700-7400	(Kwekkeboom et al. 2008)
*Dosis máxima tolerada **Dosis inyectada en ratones			

3.3. Quimioterapia para AR

De acuerdo al Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) (Aletaha et al. 2010), los regímenes que se siguen para los pacientes con AR incluye fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), glucocorticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), fármacos biológicos, sistemas de nanopartículas y procesos como la radiosinovioresis (RSO) (Dolati et al. 2016).

3.3.1. Metotrexato (MTX)

El metotrexato es el agente terapéutico más utilizado para tratar diversos tumores sólidos y enfermedades autoinmunes como la AR cuyo uso fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1988. El metotrexato: 2,4-diamino-N10-metil ácido

propilglutámico es un análogo estructural del ácido fólico (ver figura 3), es un ácido dicarboxílico débil con un peso molecular de 454.5 g/mol ($C_{20}H_{22}N_8O_5$) (Abolmaali et al. 2013).

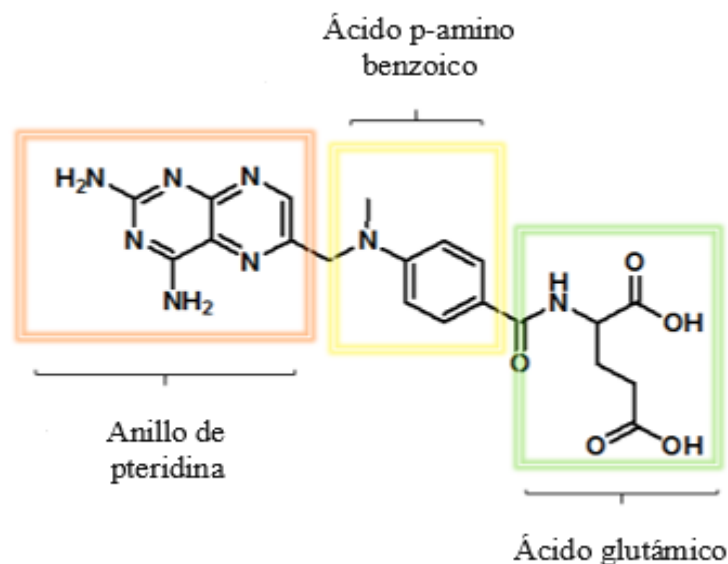


Figura 3. Estructura del metotrexato.

El metotrexato puede ser administrado por vía oral, subcutánea, intramuscular o intravenosa, en pacientes con AR se administran dosis semanales que varían de 7.5 a 25 mg/semana. La biodisponibilidad por vía oral a dosis bajas es alta (70 %), a dosis superiores de 15 mg/semana disminuye hasta un 30 %, esto es debido a que su absorción está limitada por un transportador saturable (transportador de folato reducido (RFC)). Tras su absorción, un 10 % del metotrexato se biotransforma vía hepática en un metabolito parcialmente inactivo, el 7-hidroxi metotrexato (7-OH metotrexato), lo que reduce su concentración en plasma. En cuanto a su distribución, del 35-50 % del metotrexato circulante se une a albúmina y alcanza sus máximas concentraciones en riñón, hígado, vesícula biliar, bazo, piel y eritrocitos. El 65-80 % del fármaco se excreta por los riñones sin metabolizar (en su mayor parte en las primeras 12 horas después de la administración) y un 20-35 % es excretado vía biliar y se metaboliza o transfiere a otros compartimentos. El tiempo de vida media del metotrexato en plasma es aproximadamente de 7-10 h y es indetectable en el suero después de 24 horas (Tian & Cronstein 2007; Villanueva Ramos et al. 2012).

La actividad antiproliferativa en las células responsables de la inflamación producida en las articulaciones con AR por parte del MTX, está correlacionada con la eficiencia de su transporte dentro de la célula (citósol), donde el MTX se acumula en altas concentraciones. Intracelularmente el MTX poliglutamato (MTXGlu) actúa inhibiendo competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), lo que provoca una disminución de tetrahidrofolatos que son requeridos para la síntesis de ADN, ARN y proteínas, por lo que estas y otras reacciones metabólicas se ven interrumpidas interfiriendo con la división celular mitótica, es por eso que el metotrexato y otros fármacos como la doxorubicina presentan radiosensibilización en distintos tipos de células (Villanueva Ramos et al. 2012).

Sin embargo las bajas dosis utilizadas en AR son insuficientes para generar un efecto antiproliferativo, por lo que el mecanismo más importante recae en la disminución de la conversión de 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR) a formil-AICAR. La acumulación de AICAR inhibe la degradación de la adenosina (agente antiinflamatorio), cuya acumulación en el espacio extracelular produce su unión a los receptores A₂, y una vez unidos aumenta el nivel de monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP) y estos altos niveles producen una variedad de efectos antiinflamatorios, como la disminución de mediadores de inflamación tales como interleucinas (IL-1, IL-6, actividad de factor de necrosis tumoral 1 (TNF) y otras citoquinas inflamatorias) (Nakashima-Matsushita et al. 1999; Rajagopalan et al. 2002; Puig 2014; Khan et al. 2012; Tian, Henghe, Cronstein 2007; Abolmaali et al. 2013).

3.4. Transporte y liberación de fármacos con excipientes poliméricos

El desarrollo de nuevos sistemas para la liberación controlada de fármacos en función de tiempo y estímulos como la temperatura, pH, entorno iónico, etc., en una región determinada del organismo, se ha visto beneficiada por los avances en la obtención de excipientes biocompatibles, especialmente materiales poliméricos los cuales pueden controlar la liberación del principio activo, mediante diferentes mecanismos: a) desorción del fármaco, b) difusión a través de la pared de polímero de la nanopartícula, y c) erosión de la matriz. Además, los fármacos pueden ser liberados mediante un mecanismo de ráfaga (Burst) o de forma sostenida (Chronopoulou et al. 2013; Lai et al. 2014).

Parte de estos nuevos sistemas para la liberación controlada de fármacos incluyen dendrímeros, liposomas, micelas y nanopartículas poliméricas, que debido a su tamaño son capaces de penetrar sitios específicos y depositar ahí su carga (Costa et al. 2004).

3.4.1. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales, de naturaleza polimérica con un tamaño inferior a 1 μm (Brigger et al. 2012), en donde el fármaco puede estar atrapado, encapsulado, adsorbido físicamente o unido químicamente en su superficie o en la matriz de éstas (Muthu & Singh 2009).

Representan uno de los sistemas más utilizados para la administración de fármacos debido a características como: estabilidad, alta capacidad portadora, liberación controlada del fármaco, capacidad para fármacos con características hidrofílicas e hidrofóbicas, reducción de la captación celular no específica, ya que es posible modificar su superficie con moléculas que permitan la orientación dirigida hacia un tejido u órgano específico (mecanismo ligando-receptor), y/o que permitan incrementar el tiempo de residencia (Zhu et al. 2006; Chronopoulou et al. 2013; Lai et al. 2014).

3.4.2. Modificación superficial de sistemas poliméricos

Los sistemas transportadores como los liposomas, micelas poliméricas y nanopartículas poliméricas han surgido como nuevos sistemas para la liberación efectiva de fármacos. Siendo las nanopartículas poliméricas unas de las más importantes debido a sus ventajas, entre las que destacan su a) biocompatibilidad, b) no inmunogenicidad, c) biodegradabilidad, d) fácil preparación, e) alta estabilidad física, f) posibilidad de controlar la liberación del fármaco y g) posibilidad de realizar modificaciones superficiales (Nahar et al. 2006).

Las modificaciones que se realizan a las nanopartículas con la finalidad de funcionalizarlas tienen como objetivo que la nanopartícula transportadora llegue y se acumule en el sitio deseado, ya sea órgano, tejido o células y ahí descargue el fármaco. Se clasifica en dos tipos: pasivo y activo.

Vectorización pasiva: se aprovechan las características fisiopatológicas del tejido o tumor, como el pH, la temperatura, la carga superficial y el proceso de angiogénesis, el cual promueve el rápido desarrollo de vasos sanguíneos nuevos, desorganizados y fenestrados que ofrecen poca resistencia a la extravasación de nanopartículas al espacio del tumor, permitiendo el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) (Prabhu et al. 2015; Jaimes-Aguirre et al. 2016).

Vectorización activa: consiste en un proceso de reconocimiento molecular que se basa en el uso de ligandos específicos (anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, azúcares o moléculas pequeñas como vitaminas) unidos a la superficie de las nanopartículas. Estos ligandos son reconocidos y se unen de forma selectiva y específica a las células blanco a través de interacciones ligando-receptor. Para lograr una alta especificidad, los receptores deben sobreexpresarse en células dañadas, pero no en células normales (Prabhu et al. 2015; Jaimes-Aguirre et al. 2016).

3.4.3. Nanopartículas en medicina

Las necesidades de la población han planteado el reto de incorporar nuevas formulaciones farmacéuticas que permitan superar las limitaciones que presentan los medicamentos ya existentes, por lo que algunas estrategias terapéuticas nuevas como la terapia celular, el bloqueo génico post-transcripcional, la terapia génica, y las formulaciones farmacéuticas desarrolladas a partir de la micro y nanotecnología se han vuelto una de las técnicas más sobresalientes en este sentido (Feldmann et al. 2005). La nanotecnología se ha podido desarrollar gracias a la introducción de nuevos materiales, especialmente los polímeros que, por sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad fueron incluidos oficialmente en el campo farmacéutico en 1980 en la Farmacopea Americana (USP, 1980) y desde entonces se han empleado como auxiliares de formulación en medicamentos y como materiales de envases y empaques (Urquhart 2001).

3.5. Sistemas de transporte de fármacos empleados en AR usando nanopartículas poliméricas

La artritis reumatoide y la osteoartritis son las enfermedades más comunes dentro de las enfermedades autoinmunes y se caracterizan por la degradación progresiva de la matriz extracelular y la inflamación de las articulaciones sinoviales. Las nanopartículas a base del polímero poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) han sido ampliamente descritas con aplicaciones en trastornos autoinmunes. En el ámbito de la administración de fármacos para AR, Higaki et al. incorporaron un glucocorticoide (betametasona) en nanopartículas de PLGA con un tamaño de 100-200 nm. La administración intravenosa a ratas y ratones artríticos demostró que el sistema de PLGA-betametasona era más eficaz para reducir la respuesta inflamatoria que el glucocorticoide libre (Higaki et al. 2005). Liang et al. diseñaron micropartículas de PLA cargadas con MTX, después de la inyección intraarticular en articulaciones inflamadas de un modelo de conejo se demostró que se retuvieron en el área de la articulación y exhibieron un perfil de liberación controlada (Liang et al. 2004a; Liang et al. 2005).

3.6. Ácido hialurónico (HA)

Es un polisacárido natural aniónico, biocompatible y biodegradable de alto peso molecular, pertenece a la familia de carbohidratos llamada glicosaminoglicanos (GAG), y está compuesto de unidades repetidas de disacáridos de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina y β -1,3-D-ácido glucorónico (ver figura 4), es el mayor componente de la matriz extracelular y está presente en articulaciones, fluidos sinoviales y tejido conectivo; juega un rol importante en procesos de adhesión, migración y proliferación celular. Sus características viscoelásticas le han permitido ser utilizado clínicamente para tratamientos de artritis reumatoide (Kim et al. 2010; Chen et al. 2014; Shin et al. 2014).

Es sintetizado vía endógena por condrocitos y sinoviocitos, posteriormente se libera al espacio sinovial y se acumula en la superficie del ligamento y cartílago. En articulación de rodilla de una persona sana la concentración de HA en el fluido sinovial se encuentra entre 2.5-4 mg/mL, estas concentraciones reducen bajo ciertas condiciones patológicas hasta 1-2 mg/mL (Dhal et al. 2012)

El HA tiene alta afinidad y especificidad por receptores CD44, y es internalizado eficientemente por las células que los expresan mediante el proceso de endocitosis mediada por receptor (Vangara et al. 2013). Los receptores CD44 son sobreexpresados en diferentes tipos de cáncer y juegan un rol importante en la progresión del tumor, están implicados en el proceso de metástasis, invasión, adhesión y angiogénesis (Shin et al. 2014).

El HA es un componente principal de las matrices y fluidos tisulares y participa en diversas funciones fisiológicas. Mantiene el equilibrio osmótico y la hidratación tisular, el ensamblaje y la remodelación de la matriz extracelular, la proliferación celular, la adhesión y la migración (S. Pandey et al. 2017).

En humanos, el HA se sintetiza mediante las HA-sintasas HAS1, HAS2 y HAS3 en el lado citoplásmico de la membrana plasmática y luego se expulsa al espacio extracelular. Es sintetizado por muchas células, principalmente mesenquimales y se degrada por la familia de enzimas hialuronidasa, que hidrolizan los enlaces entre el ácido D-glucurónico y los disacáridos de N-acetil-D-glucosamina (S. Pandey et al. 2017).

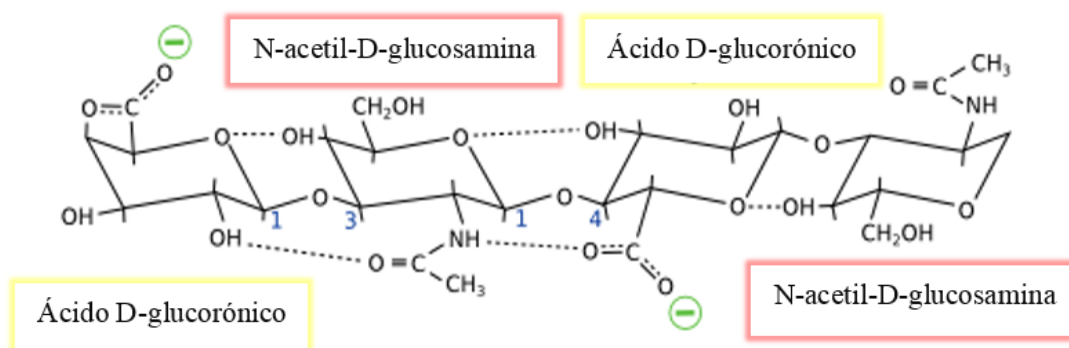


Figura 4. Estructura del ácido hialurónico.

El HA de bajo peso molecular e intermedio (2×10^4 - 4.5×10^5 Da) estimula la expresión génica en macrófagos, células endoteliales, eosinófilos y ciertas células epiteliales, tiene una vida media de 2 - 6 minutos en sangre, la captación principal de la sangre tiene lugar en las células endoteliales hepáticas (Necas et al. 2008).

3.6.1. Receptor CD44

Los receptores CD44 son glicoproteínas que actúan como moléculas de adhesión transmembrana que median diversas actividades fisiológicas y patológicas que están involucrados en el enlace, endocitosis y el metabolismo del ácido hialurónico (HA), además participan en la respuesta inmune a través de procesos de adhesión, migración, activación y proliferación celular (Vachon et al. 2006; Chen et al. 2014). Se une a varios ligandos, principalmente al ácido hialurónico (S. Pandey et al. 2017).

CD44 se encuentra en dos isoformas, CD44 estándar (CD44) y su variante CD44v, el receptor se expresa en la mayoría de las células; sin embargo, las isoformas se expresan durante procesos infecciosos, inflamatorios y en células tumorales. El receptor CD44 se divide en tres dominios: extracelular, transmembrana y citoplásmico. Se ha demostrado que el receptor de adhesión CD44 media su función uniéndose a su (s) ligando (s) extracelular (s), mediante el acoplamiento del citoesqueleto y coordinando los eventos de señalización para permitir que la célula responda a los cambios en el entorno. Los dominios transmembrana y citoplásmico son necesarios para la unión efectiva del ligando. Dependiendo del tipo de célula, la señalización de CD44-HA media las interacciones célula-matriz, activación celular, adhesión celular y migración celular en diversos procesos normales y fisiopatológicos tales como cicatrización de heridas, metástasis tumoral, linfocitos y extravasación de leucocitos en sitios de inflamación. La unión de CD44 y HA también media la internalización de HA. La molécula de adhesión celular CD44 se expresa en la mayoría de las células inmunes y los agentes inflamatorios inducen la unión de CD44 a HA en los linfocitos T después de la activación por el antígeno y en los monocitos después de su estimulación (S. Pandey et al. 2017).

El receptor transmembrana CD44 es sobreexpresado por los linfocitos sinoviales, macrófagos y fibroblastos en la articulación inflamada de los pacientes con AR, ya que la expresión se activa rápidamente cuando se expone a estímulos inflamatorios (Knudson et al. 2002; Dolati et al. 2016; Yang et al. 2017).

La principal molécula de adhesión a los receptores CD44 es el HA, los macrófagos tienen una alta expresión de CD44 y juegan un papel importante en la absorción y degradación de HA (Rios de la Rosa et al. 2017).

3.6.1.1. Estructura del receptor CD44

La forma más abundante de CD44 consiste en una secuencia de señal N-terminal, un módulo de unión a HA, una región de tallo, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. La proteína del receptor CD44 consiste en una gran parte extracelular (270 aminoácidos), una parte transmembrana (23 aminoácidos) y una parte citoplásmica (72 aminoácidos). La región amino-terminal con el dominio de unión a HA permanece presente en todas las isoformas, mientras que la región proximal de la membrana está menos conservada y los dominios citoplásmicos transmembrana y C-terminal son regiones altamente conservadas (ver figura 5) (S. Pandey et al. 2017).

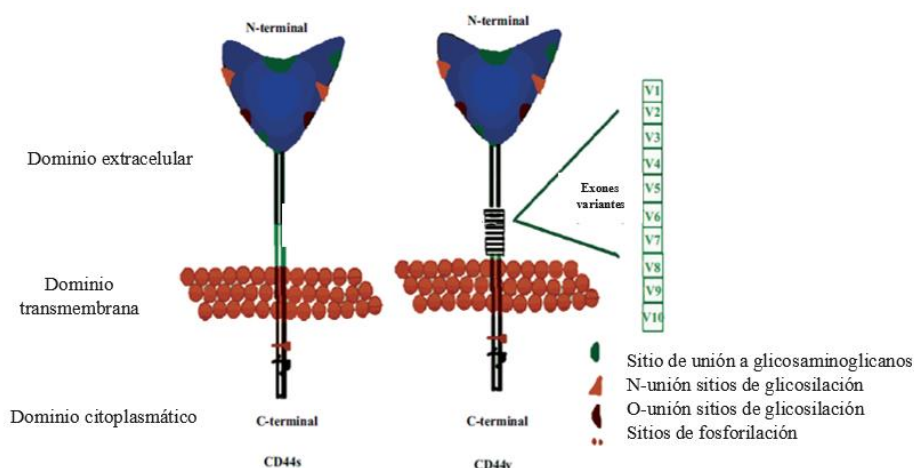


Figura 5. Estructura del receptor CD44: a) forma estándar (CD44_s), b) isoformas variantes (CD44_v).

3.7. Sistemas de nanopartículas modificadas o preparadas de HA

Los macrófagos son las células responsables de la iniciación y mantenimiento del proceso inflamatorio que deriva en la destrucción del tejido en pacientes con AR, una vez activados dichos macrófagos incrementan la expresión de los receptores CD44 y de esta forma se mejora la afinidad del enlace con el HA (Clares et al. 2012; Shin et al. 2014). Por lo que los

sistemas de HA son un vehículo prometedor para la administración de fármacos a estos pacientes.

En este contexto Yadav et al. reportaron nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) conjugadas con HA (5,7 kDa) mediante los grupos carboxilo terminales, y en un estudio basado en células demostraron que el conjugado tenía una mayor captación y citotoxicidad en células que sobreexpresaban receptores CD44 en comparación con células con bajo nivel de expresión de CD44 (Yadav et al. 2007a).

A. Homma et al. prepararon un conjugado de metotrexato (MTX) con HA (HA-MTX) unidos mediante un péptido, que puede ser degradado por catepsina intracelular para el tratamiento de AR, la inyección intraarticular del conjugado HA-MTX produjo una reducción significativa en la hinchazón de la rodilla en un modelo de artritis inducida por antígeno en ratas a diferencia del MTX libre, HA o una mezcla de HA y MTX (Homma et al. 2009; Homma et al. 2010).

Kim et al. desarrollaron nanocomplejos de HA/PEG-TRAIL para el tratamiento de la AR, en experimentos en un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno (CIA), demostraron que la administración sostenida de PEG-TRAIL a partir del nanocomplejo en HA producía una reducción significativa de citoquinas inflamatorias en suero que son responsables de la patogénesis de la AR (Kim et al. 2010).

Shin et al. prepararon un conjugado HA-MTX que se puede unir específicamente a CD44 en las células inflamatorias y liberar MTX en un tejido inflamado de AR, demostraron que el conjugado HA-MTX fue captado eficazmente por los macrófagos activados a través de la unión entre CD44 y HA. Las pruebas de biodistribución in vivo confirmaron que después de su administración sistémica, el conjugado HA-MTX se acumuló selectivamente en el sitio de unión inflamatoria de los ratones CIA. El conjugado HA-MTX mejoró significativamente los resultados clínicos, incluidos los índices de artritis y el grosor de la pata, en comparación con el MTX libre. Además, las citoquinas proinflamatorias y las IgG patógenas se redujeron significativamente mediante la administración sistémica del conjugado HA-MTX. En

general, fue evidente que el conjugado HA-MTX tiene un potencial prometedor como agente terapéutico para la terapia de AR (Shin et al. 2014).

Tamura et al. prepararon un conjugado de ácido hialurónico (HA) y MTX como un posible candidato para el tratamiento intraarticular de la artritis inflamatoria. Compararon la eficacia y la seguridad de un conjugado de HA-MTX con el de MTX en modelos de rata artrítica inflamatoria. Los resultados mostraron que la proliferación de células HFSL (sinoviocitos similares a fibroblastos humanos) y una línea celular de sarcoma sinovial SW982 fue inhibida por el conjugado, y después de la administración intraarticular la hinchazón de la rodilla en ratones AIA (artritis inducida por antígeno) fue inhibida con el nanoconjugado, pero no por MTX libre o una mezcla de HA y MTX (Tamura et al. 2016a).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la baja concentración terapéutica en las articulaciones y a los efectos secundarios sistémicos de la terapia administrada oralmente en AR, surge la necesidad de adaptar o mejorar los fármacos existentes, en este contexto la nanomedicina presenta alternativas en la terapia con el desarrollo de sistemas de administración de fármacos mediante nanopartículas poliméricas

El objetivo de este trabajo consiste en preparar, caracterizar y evaluar un sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA modificadas con ácido hialurónico y radiomarcadas con ^{177}Lu , para el transporte y la liberación controlada de metotrexato ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX). El sistema propuesto actuará mediante dos mecanismos de acción de manera independiente. Los mecanismos involucrados son: 1) efecto de la radiación por parte del ^{177}Lu que inhibirá la acumulación células pro-inflamatorias contribuyendo al alivio el dolor y disminución de la inflamación, favoreciendo fisiológicamente a mejorar el movimiento de la articulación, 2) inhibición metabólica como parte del mecanismo intrínseco del metotrexato; esto generara un efecto de radiosensibilización lo que originara, disminución de dosis de radiación necesaria para conseguir el efecto, disminución de dosis administrada de metotrexato y un incremento de efectividad terapéutica. Mientras que la matriz de PLGA y HA ayudaran a que el sistema sea biocompatible y biodegradable, y el HA será el ligando específico hacía receptores CD44 sobreexpresados en células inflamadas de tejido sinovial como los macrófagos, por lo que se espera una acumulación del fármaco en el área deseada, manteniendo al mínimo su distribución sistémica tras la inyección intraarticular del sistema.

5. HIPÓTESIS

La preparación de nanopartículas poliméricas de PLGA modificadas con ácido hialurónico será un fármaco multifuncional para el transporte y liberación de metotrexato, que junto con la incorporación del radionúclido ^{177}Lu servirá para el diseño de nuevas formas farmacéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Preparar, caracterizar y evaluar el sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA modificadas con ácido hialurónico y radiomarcadas con ^{177}Lu , para el transporte y liberación controlada de metotrexato.

6.2. Objetivos específicos

6.2.1. Preparar y caracterizar sistemas poliméricos de:

- Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).
- Ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con metotrexato ((PLGA(MTX)).
- Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico (HA-PLGA).
- Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico y cargadas con metotrexato ((HA-PLGA(MTX)).
- Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico y DOTA, y cargadas con metotrexato ((DOTA-HA-PLGA(MTX)).
- Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico, cargadas con metotrexato y radiomarcadas con ^{177}Lu (^{177}Lu -HA-PLGA(MTX)).

6.2.2. Evaluar la eficiencia de encapsulado y el perfil de liberación de metotrexato.

6.2.3. Evaluar *in vitro*, la captación específica y la viabilidad celular.

METODOLOGÍA

7. METODOLOGÍA

7.1. Preparación de nanopartículas poliméricas de:

Ácido poli(láctico-co-glicólico) por el método de emulsión /evaporación del disolvente (Stevanović et al. 2007).

Se preparó una solución de PLGA en acetona (15 mg/mL), se tomó 1 mL y se mezcló con 1.32 mL de metanol, esta fase orgánica se agitó en vórtex durante 15 segundos. La mezcla anterior se agregó lentamente (por goteo) a 7.3 mL de solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) (0.25 % p/v) en el sonicador con hielo durante 10 minutos. Los disolventes orgánicos (acetona y metanol) se evaporaron al vacío mediante un evaporador rotatorio durante 20 minutos, a 67 ° C y 40 rpm. Finalmente, las nanopartículas se purificaron con un sistema de diálisis (MWCO 30 KDa, centrifugación de 4,400 rpm durante 30 minutos). El volumen recuperado se almacenó para su uso posterior.

Ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con metotrexato ((PLGA(MTX)) por el método de emulsión /evaporación del disolvente (Stevanović et al. 2007).

La carga de metotrexato se realizó durante la formación de las nanopartículas de PLGA. Se añadieron diferentes volúmenes de solución de MTX (1 mg/mL) a 1 ml de solución de PLGA en acetona (15 mg/mL) y se agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se siguió el mismo procedimiento de preparación de nanopartículas de PLGA, una vez terminado el tiempo de reacción, la suspensión de nanopartículas se centrifugó (20 min a 4,400 rpm), los sobrenadantes se separaron y analizaron por UV-Vis ($\lambda = 304$ nm). Finalmente, las nanopartículas se recuperaron con sistema de diálisis (MWCO 30 KDa, centrifugación de 4,400 rpm durante 30 minutos).

La cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas de PLGA se determinó a partir de la diferencia entre el metotrexato añadido inicialmente y el metotrexato libre en el sobrenadante. La eficacia de encapsulación (% EE) y la eficiencia de carga (% LE) se calcularon de la siguiente manera:

% Eficiencia de encapsulado:

$$\%EE = \frac{MTX_{añadido} - MTX_{no\ encapsulado}}{MTX_{añadido}} \times 100$$

% Eficiencia de carga:

$$\%LE = \frac{MTX_{añadido} - MTX_{no\ encapsulado}}{PLGA_{añadido}} \times 100$$

Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico (HA-PLGA) mediante una reacción con carbodiimida (Kuo & Yu 2011).

Se adicionó 1 mL de una solución de ácido hialurónico pH 4.75 (1.25 mM) a 9 mL de una solución de agua inyectable que contenía 0.01 g de nanopartículas de PLGA, 0.0479 g de EDC (25 mM) y 0.0108 g de NHSS (5 mM) y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, con la finalidad de activar los grupos carboxilo presentes en la superficie de las nanopartículas de PLGA y HA. Por otra parte, 2.08 µL de EDA se disolvieron en 5 mL de agua inyectable para obtener una solución 374 ng/µL, de esta solución se tomó 1 mL y se agregó a la solución de HA (1:0.5). La mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 4 h a temperatura ambiente para obtener nanopartículas conjugadas de HA-PLGA. Finalmente las nanopartículas HA-PLGA se purificaron a través de un filtro MWCO 30 KDa, se lavaron y se resuspendieron en 2 mL con agua inyectable.

Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico y DOTA, y cargadas con metotrexato ((DOTA-HA-PLGA(MTX)) mediante una reacción con HATU.

Se disolvieron 1.1 mg de nanopartículas de HA-PLGA(MTX) liofilizadas en 40 µL de agua inyectable y 100 µL de DMF, después se le adicionó una solución de 2.2 mg de HATU (2:1 p/p respecto a las NP) en 100 µL de DMF y 100 µL de DIPEA (10 µL de DIPEA/300 µL de DMF). La mezcla se agitó durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se le añadieron 100 µL de DOTA (1 mg/100 µL de DMF) y la mezcla se agitó nuevamente durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las nanopartículas DOTA-HA-PLGA(MTX) se purificaron mediante diálisis (MWCO 30 KDa, centrifugación de 2,500 g durante 20 minutos).

Ácido poli(láctico-co-glicólico) conjugadas con ácido hialurónico, cargadas con metotrexato y radiomarcadas con ^{177}Lu ($^{177}\text{Lu-HA-PLGA(MTX)}$).

100 μL de nanopartículas DOTA-HA-PLGA(MTX) (1 mg/250 μL H_2O) se diluyeron en 100 μL de buffer de acetato 1 M pH 7.0, después se le adicionaron 10 μL de solución $^{177}\text{LuCl}_3$ (3 MBq). La mezcla se incubó a 37 °C en un baño seco durante 3 horas, se centrifugó a 2,500 g durante 20 minutos (MWCO 30 KDa). El $^{177}\text{Lu-HA-PLGA(MTX)}$ se lavó dos veces con 2 mL de agua y se midió la actividad en la membrana, mientras que el ^{177}Lu libre se quedó en la solución filtrada y se midió en un calibrador de dosis (Capintec, EE. UU.) para calcular la pureza radioquímica.

7.2. Caracterización de los sistemas poliméricos

- Medición del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS).
- Evaluación de la estabilidad coloidal del sistema mediante potencial zeta.
- Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluación de la formación de los sistemas mediante espectroscopia UV-Vis y espectroscopia vibracional (FT-IR).

7.3. Evaluación del perfil de liberación del metotrexato (MTX)

La cinética de liberación de MTX a partir de las nanopartículas se evaluó mediante el método de diálisis, donde 10 mg de nanopartículas cargadas con metotrexato ((HA-PLGA(MTX)) se disolvieron en 1 mL de solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 5.3 y 7.4 respectivamente y se colocaron en una bolsa de diálisis (14,000 Da MWCO). La bolsa de diálisis cerrada se colocó en un tubo cónico con 10 ml de PBS como medio de liberación (pH 5.3 y pH 7.4), posteriormente el tubo se mantuvo en agitación a 37 °C y se realizó la recolección de alícuotas de 500 μL a diferentes tiempos (1 h, 2 h, 3 h, 1 día, 2 días, 3 días y 4 días), el volumen se reemplazó con PBS fresco y la liberación del fármaco se cuantificó por espectroscopia UV-Vis ($\lambda = 304 \text{ nm}$).

7.4. Evaluación *in vitro* de la captación específica de las nanopartículas

La captación específica de las nanopartículas se evaluó en células de macrófagos RAW 264.7. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (100,000 células/pozo) en placas de cultivo de 48 pozos. Después de 24 h, se retiró el medio y las células se incubaron con 200 μL de cada tratamiento (^{177}Lu -HA-PLGA, ^{177}Lu -PLGA (MTX) y DOTA-HA-PLGA (MTX)) durante 3 horas a 37 °C, después de este tiempo las células se lavaron dos veces con solución de buffer de fosfatos (PBS), luego se añadieron 500 μL de buffer de glicina (50 mM, pH 2.8) y las células se incubaron durante 5 min (dos veces), posteriormente se retiró la glicina y las células se incubaron con solución de NaOH durante 5 min. Por otra parte, con el fin de evaluar la captación no específica por receptores CD44 las células se preincubaron con una concentración 500 veces mayor que la adicionada en el tratamiento con ácido hialurónico (HA: $1 \times 10^{-3}\text{g/mL}$) durante 10 min antes de la adición de los tratamientos.

7.5. Evaluación *in vitro* de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó usando el kit XTT (2,3-bis[2-Metoxi-4-nitro-5-sulfopenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida, 0.1 mg/mL). Las células RAW 264.7 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (10,000 células/pocillo) con 200 μL de medio RPMI 1640 y se incubaron 24 h, después de este tiempo se retiró el medio y se adicionaron 200 μL de cada tratamiento (MTX, PLGA(MTX), HA-PLGA, HA-PLGA(MTX), $^{177}\text{LuCl}_3$, ^{177}Lu -PLGA(MTX), ^{177}Lu -HA-PLGA, DOTA-HA-PLGA(MTX)), todos los tratamientos con 3 kBq/pozo y 48.5 ng de MTX. Adicionalmente y bajo las mismas condiciones pero sin tratamiento, se procesó el grupo control. La viabilidad después de la exposición al tratamiento se evaluó a las 24, 48 y 120 h. El porcentaje de proliferación celular en cada pozo se evaluó por espectroscopía UV-Vis ($\lambda = 450 \text{ nm}$) en un lector de microplacas (EpochTM, BioTek Instruments, EE. UU.). La absorbancia medida en el grupo control se consideró como 100 % de viabilidad.

Las muestras se evaluaron mediante la prueba ANOVA y una comparación de medias de Bonferroni.

RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1. Artículo enviado

Manuscript Details

Manuscript number	MSEC_2018_1250
Title	Preparation and in vitro evaluation of radiolabeled HA-PLGA nanoparticles as novel MTX delivery system for local treatment of rheumatoid arthritis
Article type	Research Paper

Abstract

Radiosynovectomy is a technique used to decrease inflammation of the synovial tissue by intraarticular injection of a β -emitting radionuclide, such as ^{177}Lu , which is suitable for radiotherapy due to its decay characteristics. Drug-encapsulating polymeric nanoparticles are a suitable option to treat several arthritic diseases, such as methotrexate (MTX), which has been widely used in the arthritis treatment (RA), and hyaluronic acid (HA), which specifically binds the CD44 and hyaluronan receptors overexpressed on the inflamed synovial tissue cells. The aim of this research was to synthesize ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) as a novel, smart drug delivery system with target-specific recognition, potentially useful in radiosynovectomy for local treatment of rheumatoid arthritis. Methods: The polymeric nanoparticle system was prepared by the single emulsification-solvent evaporation method. Conjugation (-HA, -DOTA) was carried out and samples were purified by ultracentrifugation. Physicochemical characterization was performed by UV-Vis, FT-IR, SEM and DLS. The MTX encapsulation and loading efficiency were determined by UV-Vis. ^{177}Lu labelling was performed in aqueous medium at pH 7.0. Results: The HA-PLGA(MTX) nanoparticle mean diameter was $167.6 \text{ nm} \pm 57.48$, with a monomodal and narrow distribution. Spectroscopic techniques demonstrated the effective conjugation of HA and chelating agent DOTA to the polymeric nanosystem. The MTX encapsulation was 95.2 % and the loading efficiency was 6 %. The radiochemical purity was $96 \pm 2 \%$, determined by ITLC. Conclusion: ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) was prepared as a biocompatible polymeric PLGA nanoparticle conjugated to HA for specific targeting. The therapeutic nanosystem is based on bi-modal mechanisms using MTX as a disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) and ^{177}Lu as a radiotherapeutic component. The ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles showed properties suitable for radiosynovectomy and further specific targeted anti-rheumatic therapy.

Keywords Radiosynovectomy; Rheumatoid arthritis; ^{177}Lu ; methotrexate; polymeric nanoparticles; targeted therapy

Corresponding Author Enrique Morales-Avila

Corresponding Author's Institution UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO

Order of Authors Enrique Morales-Avila, Rosa Maydelid Trujillo-Nolasco, Blanca Ocampo, GUILLERMINA FERRO-FLORES, Brenda Vianey Gibbens-Bandala, Alondra Escudero-Castellanos, Keilla Isaac-Olive

Suggested reviewers Nicola Tirelli, Srinath Palakurthi, Liepe Knut

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.pdf [Cover Letter]

Trujillo Nolasco 21may REVISADO.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

Preparation and *in vitro* evaluation of radiolabeled HA-PLGA nanoparticles as novel MTX delivery system for local treatment of rheumatoid arthritis

R. Maydelid Trujillo-Nolasco^{1,2}, Enrique Morales-Avila^{1*}, Blanca E. Ocampo-García², Guillermina Ferro-Flores², Brenda V. Gibbens-Bandala^{1,2}, Alondra Escudero-Castellanos^{2,3}, Keila Isaac-Olive³

¹ *Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química Toluca-México*

² *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Departamento de Materiales Radiactivos Ocoyoacac-México*

³ *Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Toluca-México*

***CORRESPONDENCE TO:**

Enrique Morales-Avila, Prof
Facultad de Química
Universidad Autónoma del Estado de México
Paseo Tollocan esq Paseo Colón S/N.
Toluca, Estado de México.
C.P. 50120, México.
Tel. + (52) (722) 2 17 41 20
Fax. + (52) (722) 2 17 38 90
e-mail: enrimorafm@yahoo.com.mx
emoralesav@uaemex.mx

Abstract

Radiosynovectomy is a technique used to decrease inflammation of the synovial tissue by intraarticular injection of a β -emitting radionuclide, such as ^{177}Lu , which is suitable for radiotherapy due to its decay characteristics. Drug-encapsulating polymeric nanoparticles are a suitable option to treat several arthritic diseases, such as methotrexate (MTX), which has been widely used in the arthritis treatment (RA), and hyaluronic acid (HA), which specifically binds the CD44 and hyaluronan receptors overexpressed on the inflamed synovial tissue cells. The aim of this research was to synthesize ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) as a novel, smart drug delivery system with target-specific recognition, potentially useful in radiosynovectomy for local treatment of rheumatoid arthritis. *Methods:* The polymeric nanoparticle system was prepared by the single emulsification-solvent evaporation method. Conjugation (-HA, -DOTA) was carried out and samples were purified by ultracentrifugation. Physicochemical characterization was performed by UV-Vis, FT-IR, SEM and DLS. The MTX encapsulation and loading efficiency were determined by UV-Vis. ^{177}Lu labelling was performed in aqueous medium at pH 7.0. *Results:* The HA-PLGA(MTX) nanoparticle mean diameter was $167.6 \text{ nm} \pm 57.48$, with a monomodal and narrow distribution. Spectroscopic techniques demonstrated the effective conjugation of HA and chelating agent DOTA to the polymeric nanosystem. The MTX encapsulation was 95.2 % and the loading efficiency was 6 %. The radiochemical purity was $96 \pm 2 \%$, determined by ITLC. *Conclusion:* ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) was prepared as a biocompatible polymeric PLGA nanoparticle conjugated to HA for specific targeting. The therapeutic nanosystem is based on bi-modal mechanisms using MTX as a disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) and ^{177}Lu as a radiotherapeutic component. The ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles showed properties suitable for radiosynovectomy and further specific targeted anti-rheumatic therapy.

Key words

Radiosynovectomy, smart drug delivery system, ^{177}Lu , methotrexate, polymeric nanoparticles, targeted therapy

1. Introduction

Conventional treatment of rheumatic diseases is usually based on low doses of methotrexate (MTX), a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD). The clinical management is commonly accompanied by systemic side effects such as suppression of the immune system, with an elevated risk of viral and bacterial infection. The common adverse effects of MTX are nausea, vomiting, anemia, neutropenia, pulmonary fibrosis, diarrhea, dermatitis, bone marrow depression, mucositis, bruising and hepatitis (Khan, Tripathi and Mishra, 2012; Sparks *et al.*, 2017). MTX acts as an anti-proliferative molecule (through inhibition of dihydrofolate reductase enzyme, DHFR) and an anti-inflammatory agent (by means of adenosine overproduction). It is widely reported that it has poor pharmacokinetics and a narrow safety margin, which limits the therapeutic outcomes (Liang *et al.*, 2009; Khan, Tripathi and Mishra, 2012; Abolmaali, Tamaddon and Dinarvand, 2013).

The target-specific delivery of traditional chemotherapeutic agents to a diseased area has made new approaches imperative, in order to minimize or even avoid introducing the cargo into critical normal tissues. Despite the advances in nanomedicine, the complexity implicated in predicting biological behavior limits their clinical applications. Several nanomaterials have been proposed as delivery systems to treat cancer or metabolic, chronic and degenerative diseases including osteoarticular disorders or rheumatic diseases. The inflamed synovial tissues contain activated macrophages, among other cells, which contribute to inflammation and joint destruction (Shin *et al.*, 2014).

Hyaluronic acid (HA) specifically binds to cluster determinant 44 (CD44), a receptor that mediates various physiological and pathological processes. In pathogenic conditions, the CD44 receptor facilitates migration of damaged cells to vital organs, resulting in tissue and organ injury (Pandey *et al.*, 2017; Senbanjo and Chellaiah, 2017). In patients suffering from RA, the inflamed synovial tissue contains activated macrophages, which overexpress CD44. The over-expression of CD44 is associated with the extent of inflammation (Shin *et al.*, 2014).

Some studies regarding HA bound to the surface of nanoparticles have demonstrated that the nanosystems can effectively be accumulated in inflamed synovial tissues in RA animal models through the CD44 receptor (Abolmaali, Tamaddon and Dinarvand, 2013).

Radiolabeled polymeric nanoparticles conjugated to biological molecules have demonstrated themselves capable of recognizing specific target sites; therefore, they can be a potential strategy to enhance therapeutic response rates and disease-free survival times. Lutetium-177 (^{177}Lu , half-life of 6.71 d) is a theranostic radionuclide which enables radiotherapy due to its β max emission energy of 0.497 MeV (78 %) and diagnosis through its γ radiation of 0.208 MeV (11 %). It has been successfully used for targeted radiotherapy with efficient cross-fire effect in cancer cells (Vilchis-Juárez *et al.*, 2014; Ferro-Flores *et al.*, 2015). Several antiarthritic radiopharmaceuticals based on ^{177}Lu have been proposed to treat joints in advanced stages of arthritis.

In this research, a new approach was designed, prepared, characterized and evaluated for producing dual therapy on macrophage cells over-expressing the CD44 receptor through MTX delivery as a disease-modifying antirheumatic drug and ^{177}Lu as the radiotherapeutic component. ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) is proposed as a target-specific nanosystem with properties suitable for radiosynovectomy and for MTX therapy in RA.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid terminated (PLGA); 50:50 lactide to glycolide ratio MW: 40,300 g/mol), Poly(vinyl alcohol) (PVA, Mowiol® 4-88; MW: 31,000 g/mol), hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi* (MW: $\sim 1.5\text{-}1.8 \times 10^6$ Da), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHSS), methotrexate (MTX) (MW: 454.4 g/mol), HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uroniumhexafluoro phosphate), XTT Kit II and other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used as received.

The DOTA-GGC (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N',N''*-tetraacetic-Gly-Gly-Cys) was synthesized and characterized by piChem (Graz, Austria) as previously described (Vilchis-

Juárez *et al.*, 2014). $^{177}\text{LuCl}_3$ was obtained from ITM Isotope Technologies Garching München AG, (Garching, Germany). The RAW 264.7 cell line (murine macrophage) was obtained from ATCC (Atlanta, GA, USA)

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of PLGA nanoparticles

PLGA nanoparticles were prepared by the single emulsification-solvent evaporation method (Stevanović, Jordović and Uskoković, 2007; Jaimes-Aguirre *et al.*, 2017). Some modifications to the procedure were performed. Briefly, 1 mL of PLGA/acetone solution (15 mg/ mL) was added to 1.32 mL of methanol and stirred via vortex for 15 seconds. The solution was then slowly dropped over a solution of PVA (7.3 mL, 0.25 % w/v) and the mixture was sonicated for 10 min in an ice bath. Acetone and methanol were eliminated by vacuum with a rotary evaporator (67 °C, 40 rpm, 20 min). Nanoparticles were purified by centrifugal filtration dialysis (MWCO 30 kDa; 4,400 rpm for 30 minutes). The filtrate was suspended, lyophilized and stored for physicochemical characterization (DLS, SEM, FT-IR) and further use.

2.2.2. Preparation of the PLGA(MTX) nanoparticles

PLGA(MTX) nanoparticles (Fig. 1a) were prepared with the nanoparticles described above. In order to optimize the drug loading capacity in the nanoparticle systems, increased concentrations of MTX (100 to 1000 µg/mL) were added to the mixture. After the reaction time, the nanoparticle suspension was recovered via a centrifugal filtration dialysis system (MWCO 30 kDa; centrifugation of 4,400 rpm for 30 minutes). The amount of encapsulated drug was determined indirectly by measuring free MTX in the supernatant (UV-Vis; $\lambda=304$ nm) in relation to the initial amount added. The encapsulation efficiency (%EE) and loading efficiency (% LE) were calculated as follows:

$$\% EE = \frac{MTX_{added} - MTX_{free}}{MTX_{added}} \times 100$$

$$\% \text{ LE} = \frac{MTX_{\text{added}} - MTX_{\text{free}}}{PLGA_{\text{added}}} \times 100$$

2.2.3. Hyaluronic Acid (HA) conjugation to PLGA and PLGA(MTX) nanoparticles

A hyaluronic acid solution (pH 4.75; 1 mL; 1.25 mM) was added to 9 mL of PLGA or PLGA(MTX) nanoparticles (0.01 g) in injectable-grade water, along with 0.0479 g of EDC (25 mM) and 0.0108 g of NHSS (5 mM). This solution was stirred for 4 h at room temperature. Then, 1 mL of EDA solution (0.003 g) in water was added to the HA solution and the mixture was stirred for 4 h at room temperature to obtain HA-PLGA and HA-PLGA(MTX) conjugated nanoparticles. The mixture was purified via a centrifugal filtration dialysis system (MWCO 30 kDa). Finally HA-PLGA and HA-PLGA(MTX) nanoparticles were washed and suspended in 2 mL of injectable-grade water (Fig. 1b).

2.2.4. DOTA conjugation to PLGA(MTX), HA-PLGA or HA-PLGA(MTX) nanoparticles

Lyophilized PLGA(MTX) (4 mg), HA-PLGA (2.4 mg) or HA-PLGA(MTX) (1.1 mg, equivalent to 2.3×10^{-4} mmol of MTX) nanoparticles were dissolved in 40 μL of injectable-grade water and 100 μL of DMF. Afterwards, 8.1, 4.8 and 2.2 mg of HATU were respectively added (2:1 wt/wt, with regard to NPs), as a carboxylic acid-activator, to a 100 μL of DMF, followed by the addition of 100 μL of DIPEA (10 μL DIPEA/300 μL DMF). The mixture was stirred for 15 min at room temperature. Then, 100 μL of DOTA (1 mg/ 100 μL DMF) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Finally, the mixture was purified through dialysis (MWCO 30 KDa) (Fig. 1c and 1d).

Insert figure 1

2.2.5. Preparation of radiolabeled nanoparticles with ^{177}Lu

Briefly, a 100 μL aliquot of DOTA-PLGA, DOTA-HA-PLGA and DOTA-HA-PLGA(MTX) (1 mg/250 μL H₂O) was diluted with 100 μL of 1 M acetate buffer at pH 7.0, followed by the addition of 10 μL (3 MBq) of the $^{177}\text{LuCl}_3$ solution (ITG, Germany). The mixture was

incubated at 37 °C in a dry block heater for 3 hours. The solution was then centrifuged at 2,500 g for 20 minutes (MWCO 30 KDa). The ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA and ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles were washed twice with 2 mL of water. The membrane activity, corresponding to ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) and free ^{177}Lu in the filtered solution, was measured in a dose calibrator (Capintec, USA). In order to calculate the radiochemical purity, ITLC with a mobile phase of NaCl 0.9 % and HCl 0.02 M, was performed, where free lutetium was identified at the solvent front.

2.3. Chemical characterization

2.3.1. Nanoparticle size and zeta potential

Particle size and Z potential were measured by dynamic light scattering (DLS), using a Nanotracs analyzer (Nanotracs Wave, Model MN401, Microtract, FL, USA). The analyses were performed with a wavelength of 657 nm at 20°C, current of 15.79 mA, electric field of 14.35 V/cm and a sampling time of 128 μs , in aqueous solution. For each sample, the mean diameter, standard deviation and polydispersity index (PDI) were reported. Zeta potential was measured in diluted samples to assure an adequate and constant ionic strength. Each sample was measured in triplicate.

2.3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Size, shape and topography were evaluated with a JEOL JSM 6510LV microscope operating at 20 kV, using secondary electron signals. Samples were sputtered with a gold thin layer of approximately 15 nm using a Denton Vacuum DESK IV system.

2.3.3. FT-IR spectroscopy

The IR spectra of raw materials and lyophilized samples were acquired using a PerkinElmer System 2000 spectrometer with an ATR platform (Pike Technologies), by applying attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FT-IR) spectroscopy. The spectra were acquired with 40 scans, in an operating range of 4000 – 400 cm^{-1} and a resolution of 0.4 cm^{-1} .

2.3.4. UV-Vis spectroscopy

Absorption spectra was obtained with a Thermo Genesys 10S spectrophotometer in the 200–800 nm range, using a 1-cm quartz cuvette. Nanoparticle suspensions were measured through UV-Vis analysis in order to monitor the conjugation reactions.

2.3.5. *In vitro* drug release kinetics

The kinetics of MTX release was determined by UV-Vis spectroscopy at 304 nm. Briefly, 10 mg of nanoparticles were dispersed in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 5.3 and 7.4, respectively, and placed in a dialysis bag (14,000 Da MWCO). The closed bag was placed in a tube with 10 mL of PBS as the release medium (pH 5.3 and pH 7.4). The tube was maintained under slow stirring at 37 °C. Aliquots of 500 µL were collected at different time points (1, 2, 3, 24, 48, 72 and 96 h) and the volume was replaced with fresh PBS for further correction. The drug release was quantified by UV-Vis.

2.3.6. Cell culture

The RAW 264.7 murine macrophage cell line was cultured in sterile RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA), supplemented with antibiotics (100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin) and 10 % fetal bovine serum. The cells were incubated at 37 °C in an incubator with humidified air (85 % humidity) and 5 % CO₂.

2.3.7. *In vitro* cellular uptake study

Nanoparticle uptake by macrophage cells was evaluated. Cells were cultured in RPMI 1640 medium and seeded in 48-well tissue culture plates (100,000 cells/well). After 24 h, the medium was removed, and the cells were incubated with 200 µL of each treatment (¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA, ¹⁷⁷Lu-DOTA-PLGA(MTX) and ¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX)) for 3 h at 37 °C before washing them twice with phosphate-buffered saline (PBS). Then, cells were incubated twice with 500 µL of glycine buffer (50 mM, pH 2.8) for 5 min before collecting the solution in test tubes for measurement (this treatment recovers the nanoparticles bound to the cell membrane; solutions from both washes were combined). Cells were then incubated twice with 500 µL of 1 M NaOH (1M) for 5 min, and the solution was collected in test tubes

for measurement (this treatment recovers the nanoparticles internalized within the cell; solutions from both washes were combined). Blocking studies were carried out in parallel. The cells were pre-incubated with a concentration 500 times greater than added in the treatment with hyaluronic acid (HA; 0.1 g/mL) for 10 min before addition of the treatments. Radioactivity was measured in samples collected from cells treated with radiolabeled nanoparticles using a NaI(Tl) well detector (NML Inc. USA). The initial activity of each treatment was considered 100 %.

2.3.8. Cell viability assay

Cell viability was assessed in RAW 264.7 cells by using the XTT (2, 3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt; 0.1 mg/mL) assay kit (Roche, Germany). Briefly, RAW 264.7 cells were seeded in 96-well culture plates (10,000 cells/well) and incubated for 24 h. Afterwards, the cells were incubated with 200 μ L of each treatment (MTX, PLGA(MTX), HA-PLGA, HA-PLGA(MTX), $^{177}\text{LuCl}_3$, ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX), ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA and ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX). Treatments with ^{177}Lu had approximately 3 kBq/well, and those with MTX had 48.5 ng. The viability was evaluated at 24, 48 and 120 h after treatment exposure. The cell proliferation percentage in each well was evaluated by the spectrophotometric measurement of cell viability at 450 nm in a microplate absorbance reader (EpochTM, BioTek Instruments, USA). Sample results were evaluated via the ANOVA test and Bonferroni correlation. The absorbance from untreated cells was considered as 100% viability.

2.4. Statistical analysis

Data was analyzed using OriginPro 8.6 software. Statistical analysis was performed using an univariate ANOVA test followed by the Bonferroni mean comparison (α : 0.05).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The current treatment for RA is focused on achieving the highest level of anti-inflammatory activity, while minimizing joint damage. Due to their variety in physicochemical properties,

nanoparticles have been investigated as carriers and drug delivery systems, where macrophages could be considered as a specific target due to its central role in inflammatory disease. Active targeting offers suitable advantages with regard to passive targeting by the enhancement of nanoparticle uptake and optimization of sustained drug delivery (Dolati *et al.*, 2016).

3.1. Chemical characterization

3.1.1. Size of nanoparticles

PLGA nanoparticles were synthesized via the oil-in-water (o/w) emulsification-solvent evaporation method. In the first step, the PLGA polymer was dispersed in organic phase. This mixture was added to an aqueous solution containing a stabilizing agent with posterior evaporation of the solvent in order to induce polymer precipitation as nanoparticles. Table 1 shows the size behavior during nanoparticle loading and conjugation. The MTX was incorporated into the mixture through the organic solvent phase in order to increase surface area contact with PLGA, maximizing the entrapment efficiency. The PVA solution was used as stabilizer, obtaining a well-dispersed and stable nanoparticle emulsion. Characterization by DLS showed that addition of MTX did not have a significant influence over the hydrodynamic diameter of nanoparticles; mono-modal distribution remained after drug loading (Fig. 2a). Nanoparticle functionalization with hyaluronic acid has been described in medical applications, in order to yield cell binding in joint tissue. The HA was crosslinked to PLGA nanoparticle surface via the carbodiimide reaction. The changes in physicochemical properties are an evidence of adequate surface modifications, because changes in zeta potential have been described when nanoparticles are conjugated to biomolecules (Monopoli *et al.*, 2012). As was observed in PLGA(MTX) nanoparticles, the MTX entrapped in the nanoparticle matrix had no influence over hydrodynamic size with regard to HA-PLGA nanoparticles, showing that MTX does not play a role in the HA conjugation reaction, remaining entrapped in the polymeric core.

Table 1. Characteristic distribution parameters in nanoparticulate system mean diameter, SD, PDI and Z potential.

Sample	Diameter (nm) ± SD	PDI	Z potential (mV)
PLGA	152.9± 53.3	0.197	- 19.0
PLGA(MTX)	166.1± 46.31	0.151	- 21.9
HA-PLGA	161.4± 20.13	0.197	- 22.2
HA-PLGA(MTX)	167.6± 57.48	0.328	- 18.6

SEM images demonstrated adequate dispersion of polymeric nanoparticles, with spheroidal shapes that correlated with DLS measurements. Figure 2b shows an example of PLGA nanoparticle distribution found in the analysis. The functionalization with chelating agent DOTA had no effect over size distribution, shape and/or the aggregation state of DOTA-HA-PLGA nanoparticles figure 2c, Stoichiometric analysis showed a proportion of 0.16 nmol of DOTA (9.6×10^{16} molecules) per mg of nanoparticles.

The synovium forms a double barrier between plasma and synovial fluid. In rheumatoid arthritis, the increased and discontinuous angiogenesis induces modifications in permeability, which enable passive macromolecular accumulation, whilst interstitial changes restrict synovial permeability to smaller molecules.

Horisawa et al. evaluated the size dependency of the D,L-lactide-glycolide copolymer (PLGA) particulates for an intraarticular delivery system through phagocytosis in the rat synovium after directly administering it into the joint cavity. Results showed that fluoresceinamine-bound PLGA (FA-PLGA) microspheres (26.5 μm), administered into the joint cavity, were surrounded by macrophages in the synovium, whereas the FA-PLGA nanospheres (265 nm) were rapidly phagocytosed by the macrophages and transferred into the underlying tissue of the synovium (Horisawa *et al.*, 2002). Senda et al. suggested that synovial cells possess the ability to phagocytose latex particles with sizes close to 240 nm (Senda *et al.*, 1999), whereas Howie et al. reported that the response of macrophages to particles larger than 5 μm in diameter was approximately the upper limit for biological phagocytosis (Howie *et al.*, 1993).

The proposed nanoparticulate system would allow the permanence of modified nanoparticles in the joint cavity, primarily due to the molecular weight and size (< 200 nm). Additionally, particle targeting via covalent modifications over the particle surface with the HA corona influences the interaction between surfaces of inflammatory cells, stimulating specific and selective uptake. Additionally, nanoparticles are internalized through CD44-mediated endocytosis processes including pinocytosis, phagocytosis or endocytosis and transported, with eventual formation of lysosomes and consequent delivery of methotrexate in a target-specific manner.

Insert figure 2

3.1.2. FT-IR

The PLGA nanoparticle spectrum (Supplemental figure 1) shows characteristic bands from the polymeric matrix and stabilized core of PLGA (Stevanović *et al.*, 2007). The PLGA-loaded nanoparticles showed evidence of methotrexate entrapment. The intense band centered at 3272 cm^{-1} provides evidence of the contribution of (O-H)_v and (N-H)_v groups from PLGA nanoparticles and the MTX primary amine, respectively. The bands found at 2916 and 2846 cm^{-1} are attributed to the (C-H)_v; these bands correspond to the interactions between the skeletal carbon of PLGA and MTX. The vibration corresponding to (C=O)_v of carbonyl at 1722 cm^{-1} was shifted to a higher energy, suggesting a strong interaction between MTX and the polymeric nanoparticle matrix. Additional characteristic bands were observed, including the 1422 cm^{-1} mode corresponding to (C-N)_v, 1366 cm^{-1} (C-C)_v, (C-O)_v and (O-H)_δ from MTX, and 1240 cm^{-1} assigned to (C-H)_δ. Finally, bands at 1087 and 1049 cm^{-1} , corresponding to (C-O)_v, are also observed (Supplemental figure 1).

The surface modification of PLGA nanoparticles with HA using a carbodiimide reaction was confirmed by the presence of characteristic bands, suggesting the formation of an amide bound, which is absent in PLGA nanoparticles. Raw material spectra (Supplemental figure 2) were consistent with previously-reported analysis (Alkrad *et al.*, 2003). The HA-PLGA nanoparticle spectrum showed characteristic bands. However, a significant increase in intensity was observed at 3286 cm^{-1} , corresponding to the overlapping between the (N-H)_v

vibration of the hyaluronic acid molecule and the (O-H)_v of PLGA nanoparticles. Additionally, a positive contribution due to an increase in H-bonding from surface folding, is possible. A well-differentiated band at 2923 cm⁻¹, from aliphatic chains (C-H)_v, was observed. At 1729 and 1638 cm⁻¹, characteristic bands from the (C=O)_v of the ester group were observed, with contribution from the (C-N)_v of amide I. These bands suggest the formation of a covalent bond between PLGA and HA. At 1422 cm⁻¹, the band corresponding to (N-H)_δ and (C-N)_v of amide III are seen, as well as the band at 1366 cm⁻¹, corresponding to (C-C)_v, (C-O)_v and (C-H)_δ, with a C=O combination (Barth *et al.*, 2007; Stevanović *et al.*, 2007; Alkrad *et al.*, 2003). Finally, bands at 1240, 1085, 1023 and 835 cm⁻¹, are found, corresponding to (C-H)_δ. Vibrations are also present in the spectrum. Moreover, characteristic vibrational modes, specifically from HA, were found at 1561 cm⁻¹, corresponding to (N-H)_δ and (C-N)_v in the amide II region found in the hyaluronic acid. In agreement with the evidence observed, we suggest that the surface modification of PLGA nanoparticle with HA results from a complex interaction driven principally by covalent, H-bonding and hydrophilic interactions.

The spectrum of HA-PLGA(MTX) nanoparticles (Figure 3) shows similar characteristics to that of HA-PLGA nanoparticles. This is because of the overlapping of several bands, which makes the identification of MTX frequencies from other vibrations difficult. Also, the steric impedance decreases the degrees of freedom of the MTX that is encapsulated in the polymer matrix so that its vibrations are very difficult to detect.

The HA-PLGA(MTX) nanoparticle spectrum shows an intense and wide band at 3340 cm⁻¹, corresponding to the overlapping between the (N-H)_v vibration of HA and the (O-H)_v of PLGA nanoparticles. At 2973, 2874 and 2706 cm⁻¹, the bands are due to the (C-H)_v groups. A significant decrease in intensity was probably due to interactions between hydrophilic forces on the nanoparticle surface, allowing the favorable thermodynamic orientation of polymer side groups, whereas the polymer chain backbone and hydrophobic groups are oriented to the nanoparticle core. The band at 1637 cm⁻¹ corresponds to (C=O)_v of the ester in PLGA nanoparticles, with contribution from the (C-N)_v of amide I. This band confirms the PLGA conjugation with HA. The band at 1562 cm⁻¹ corresponds to the (N-H)_δ and (C-N)_v of

amide II, present in the hyaluronic acid, and confirms the surface modification of PLGA nanoparticles. The bands at 1481, 1379 and 1255 cm^{-1} correspond to $(\text{N-H})_{\delta}$, $(\text{C-O})_{\nu}$ and $(\text{C-C})_{\nu}$ vibrations from amide III, respectively. Lastly, bands at 1184, 1045 and 1005 cm^{-1} are related with $(\text{C-H})_{\delta}$ and $(\text{C-O})_{\nu}$, present in MTX, PLGA nanoparticles and HA (Park *et al.*, 2002).

The DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticle spectrum shows a band at 3350 cm^{-1} , corresponding to $(\text{N-H})_{\nu}$ and $(\text{O-H})_{\nu}$; at 2996 and 2949 cm^{-1} , corresponding to $(\text{C-H})_{\nu}$; at 1753 cm^{-1} , corresponding to $(\text{C=O})_{\nu}$; at 1643 cm^{-1} , corresponding to $(\text{C=O})_{\nu}$ and amide I $(\text{C-N})_{\nu}$; at 1560 cm^{-1} , corresponding to $(\text{N-H})_{\delta}$ and amide II $(\text{C-N})_{\nu}$; at 1425 cm^{-1} , corresponding to $(\text{N-H})_{\delta}$, $(\text{C-O})_{\nu}$ and amide III $(\text{C-C})_{\nu}$; at 1388 cm^{-1} , corresponding to $(\text{C-O})_{\nu}$ and $(\text{N-H})_{\delta}$; at 1169, 1090 and 1043 cm^{-1} , corresponding to $(\text{C-H})_{\delta}$ and $(\text{C-O})_{\nu}$ vibrations. Finally, bands near 944 and 750 cm^{-1} confirm the presence of $(\text{C-S})_{\nu}$ corresponding to the cysteine present in the chelating agent DOTA (Luna-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Polymer clusters from nanoparticles are arranged in a regular chain of repeating units, where absorption band frequencies depend on the nature of surface irregularities produced by the assembly array. The observed spectra may be interpreted as the result of superposition of vibrational modes from different chemical and conformational entities, as well as steric interactions on nanoparticle cores and surfaces.

Insert figure 3

3.1.3. UV-Vis

The MTX entrapment was followed spectrophotometrically by UV-Vis. Figure 4a showed evidence of MTX loading. First, the PLGA nanoparticle spectrum shows a characteristic increase in absorbance in the UV region, with a particular band near 250-280 nm (Vangara, Liu and Palakurthi, 2013). The MTX spectrum indicates strong transitions in the UV region with bands well-defined at 258 nm, 304 nm and 351 nm (Ayyappan *et al.*, 2010). The PLGA(MTX) nanoparticles generated a complex spectrum, with apparent additivity from

PLGA and MTX in a certain region. A well-defined band with significant increase in intensity was observed near 260 nm, which is a result of the overlapping between $n \rightarrow \pi^*$ transitions from common carbonyl groups of PLGA and MTX. Specific evidence of MTX entrapment was observed through the presence of a characteristic band near 304 nm, which demonstrated that MTX was loaded.

The HA conjugation to PLGA nanoparticles was also demonstrated (Figure 4b). The HA spectrum shows a well-defined band at 252 nm, corresponding to carbonyl groups of the HA molecule. When HA is conjugated, the resulting HA-PLGA NP spectrum presents a bathochromic shift to 270 nm, due to the exchange of the oxygen atom and the nitrogen atom of ethylene diamine (EDA), generating a new amide bond. The chelating agent DOTA was also attached to the nanoparticle surface by the HATU reaction. The DOTA molecule showed a spectrum with a characteristic band attributed to carbonyl groups near 250 nm (Aranda-Lara *et al.*, 2016). Functionalization of HA-PLGA nanoparticles with DOTA showed a complex spectrum with the presence of similar bands identified in the HA-PLGA and DOTA spectrums, demonstrating adequate functionalization.

3.2. ^{177}Lu radiolabelling

The radiochemical purity of the multifunctional ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticle was $96 \pm 2 \%$, determined by ITLC. Radiolabeling of HA-PLGA modified nanoparticles was carried out using the chelating agent DOTA, which has been used for peptide, antibodies, steroids and small molecule radiolabeling, with high thermodynamic stability and kinetic inertness, also suitable for use as a therapeutic radionuclide for targeting purposes (Baneree *et al.*, 2011). Chelating anchorage to the nanoparticle surface and posterior radiolabeling does not have significant influence over the hydrodynamic radio. The molecular weight of chelating agents was negligible with regard to nanoparticle size.

Insert figure 4

3.3. Methotrexate (MTX) loading in PLGA nanoparticles

The phenomenon of adsorption in PLGA nanoparticles showed a linear increase of the entrapped drug in the polymeric matrix as a function of the increase in the amount of methotrexate. Maximum entrapment efficiency was found near 95 %, with a corresponding loading efficiency of 6 % (see [figure 5](#)). The amount of methotrexate associated to the polymeric matrix of nanoparticles is the result of physicochemical properties of the interacting materials, as well as the specific surface area of PLGA nanoparticles and affinity between MTX and the polymeric matrix. Due to methotrexate accessibility during nanoparticle formation, an increase in the polymer mass during emulsification increases the drug loading efficiency.

Insert figure 5

3.4. *In vitro drug release profile*

To evaluate the potential of HA-PLGA(MTX) nanoparticles as a drug carrier, the *in vitro* release of MTX at two different pH values (7.4 and 5.3), was evaluated. [Figure 6](#) shows that the polymeric nanoparticles preserve their stability at physiologic pH, with a maximum release of MTX near 25 % of the loaded drug. The profile is characterized by a bi-phasic response. The initial and fast phase (“burst”) reaches at least 16 % of the drug- releasing capacity after 3 hours. The slow phase continues with the release of less than 5 % of the total drug content in the posterior 70 hours. Evidences suggests that the mechanism is driven by MTX diffusion through filled pores from HA and consequent diffusion through the polymer matrix (HA-PLGA), corresponding with bi-phasic behavior. When nanoparticles are exposed to an acidic pH, an increase in the accumulative amount of the released drug was observed, suggesting a significant modification in the releasing mechanisms; during the first 3 h, there are no significant changes in the releasing profile corresponding to physiologic pH. Thereafter, the mechanism could be driven by a combination between a diffusion process and the surface erosion of the HA corona, resulting in the consequent bulk erosion of the polymeric matrix, reaching a release of 70 % at 80 h. A mathematical model (growth/sigmoidal) predicts that 100 % of drug is achieved close to 100 h. However, *in vivo*

tests are required to evaluate the influence of the chemical and biological environment on the nanoparticle payload.

Insert figure 6

3.5. *In vitro* cellular uptake study

Macrophages, abundant in the inflamed synovial membrane, possess broad pro-inflammatory potential and contribute considerably to inflammation and joint destruction. Due to their successful response to anti-rheumatic therapy, selective delivery of nanomedicine to active macrophages by binding to a specific receptor could switch off their complex connections with other cells to ameliorate the RA condition while maintaining the biological functions of the resting macrophages (Chen *et al.*, 2017).

It is known that the interactions between HA and CD44 are subject to tight regulations such that the receptor is normally maintained in a quiescent state, showing little appreciable HA binding. For example, although freshly-isolated peripheral blood monocytes and lymphocytes express CD44, they do not bind to HA. During inflammation, however, the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor R (TNF-R) induces sulfurylation and subsequent conformational changes of CD44, which transforms it into a form with much greater HA affinity (Kamat *et al.*, 2010).

To demonstrate the specific uptake of ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) and ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX) nanoparticles via the HA receptor, uptake and internalization assays in cells were carried out. For therapeutic intervention, specific binding to inflammatory cells and subsequent internalization is one of the most critical steps in order to obtain a desirable effect. The cell-surface receptor CD44 in macrophages is a potentially-rewarding target in joint disease. **Figure 7a** shows the results for the uptake assay on RAW 264.7 cells. Passive uptake (non-specific uptake) was determined using the ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX) treatment. A significant difference, with an eight-fold increase in nanoparticle uptake, was observed when hyaluronic acid was present (^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA and ^{177}Lu -

DOTA-HA-PLGA(MTX)). The amount of methotrexate in nanoparticles does not affect CD44 recognition. When cells were previously treated with HA in order to block CD44 receptors, the uptake decreased significantly with regard to the group of unblocked receptors (~40 %). It is known that extracellular HA is typically endocytosed into lysosomes (Kamat et al., 2010) and the internalization assay (Figure 7b) showed a linear and positive correlation with regard to nanoparticle uptake. At least 10 % of associated activity was found in cytosolic compartment. The internalization behavior in blocked cells was similar to that of unblocked cells, demonstrating that passive uptake was carried out by a surface phenomenon between nanoparticles and the cell surface, whereas internalization is driven by CD44-mediated uptake with consequent internalization and intracellular metabolism. These results prove that the presence of HA in the nanoparticles was crucial for uptake and the specific recognition of the nanosystem (^{177}Lu -HA-PLGA(MTX)) for CD44 receptors.

Insert Figure 7

3.6. Cell viability assay

The effect of the treatment with $^{177}\text{LuCl}_3$, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA, ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX) and ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles, as well as MTX, HA-PLGA, PLGA(MTX) and HA-PLGA(MTX) nanoparticles (Figure 8) was evaluated in RAW 264.7 cells and analyzed by the ANOVA test, followed by the Bonferroni test for media comparison (significance level set at $p \leq 0.05$).

The response to MTX was characterized by a reduction of 50 % in cell viability, with a recovery in proliferation phase after 48 h. Methotrexate is characterized by cellular uptake mediated by folate carrier FC receptors. When cells were exposed to free MTX, cell proliferation showed a significant inhibition of 50 % at 24 and 48 h, whereas PLGA(MTX) and HA-PLGA(MTX) reached a maximum cytotoxic effect of 42 % and 32 % at 24 h, respectively, and 31 % and 20 % at 48 h, respectively. The differences in cell survival could be explained as follows: the free MTX generated a “bolus” exposure, increasing the availability in a short period of time. However, in agreement with the release profile, at 48 h

only a concentration close to 50 % of entrapped MTX has been released. This means that local concentration of free MTX was less, but with a constant rate of appearance from the nanoparticulate systems. Consequently, the time of exposure to the free drug increases according to the rate phenomena of release driven by endo-lysosomal activity. Previous studies in which MTX was injected into the joint in single small doses failed to produce clinical efficacy and have been explained by the rapid clearance of MTX from the knee joint and insufficient exposure of proliferating cells in the joint to the drug (Burt *et al.*, 2009).

The group exposed to $^{177}\text{LuCl}_3$ showed a characteristic response to radiation exposure, with an exponential decrease in cell viability, reaching 95 % in cell inhibition at around 120 h of exposure. It is important to note that, due to the physical behavior at 120 h, only 40 % of radiation decay was achieved. The increase in cell damage by radiation could be explained by the increase of oxidative stress produced by radiolysis in the surrounding media and inside the cell.

In the HA-PLGA and HA-PLGA(MTX) groups, the response at 120 h was superior to 75 % in cell viability. Increases in cell viability have been reported in nanoparticulate drug delivery systems based on hyaluronic acid, due to the fact that HA is the main component of the extracellular matrix and can provide cell adherence, with consequent stimulation over cell culture proliferation (Mondalek *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

The group exposed to $^{177}\text{Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX)}$ was significantly inhibited when compared to $^{177}\text{Lu-DOTA-PLGA(MTX)}$ and PLGA(MTX) ($p < 0.05$), which was attributed to the increase in cell uptake and internalization as a result of the presence of HA.

Insert Figure 8

The present study demonstrates the development of a multifunctional system based on polymeric PLGA nanoparticles conjugated to hyaluronic acid for methotrexate delivery, a drug used as the gold standard in RA treatment. Additionally, the system was conjugated to the DOTA chelating agent and posteriorly radiolabeled with ^{177}Lu , for radiosynovectomy.

Actually, beta-emitters have a mean energy and range in tissue from 0.34 MeV with 0.33 mm of range (^{169}Er) to 2.27 MeV and 3.6 mm of range (^{90}Y). ^{90}Y is administrated as citrate or colloidal silicate, especially in knee, and ^{186}Re has been used in hip, shoulder, ankle, elbow and wrist (Torres B.M.B, Ayra P.F.E, Garcia R.E, Cornejo D.N, 2006).

Recently, ^{177}Lu has emerged as a pivotal radionuclide, due to its suitable nuclear decay characteristics. It has many advantages when compared to other therapeutic radionuclides (^{198}Au , ^{90}Y , ^{32}P , ^{186}Re , ^{169}Er , etc.), for the potential treatment of RA, such as the emission of β^- particles, their energies and abundance ($t_{1/2} = 6.71$ days, $E\beta [\text{max}] = 497$ keV, $E\gamma = 113$ keV [6.4%], 208 keV [11%] and 0.7 mm range in tissue) (Shinto *et al.*, 2015).

Synoviortesis based on radiocolloidal formulation increase uptake at the surface of the synovial tissue. The additional advantage of the colloidal state is CD44 targeting with HA to increase the therapeutic effect through the antiproliferative response. Shinto *et al.* reported that the intra-articular injection of ^{177}Lu -HA (dose of 333 ± 46 MBq) in the knee produced pain relief and improved mobility in all patients treated (Shinto *et al.*, 2015).

In order to assess its therapeutic potential, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles need to be tested on *in vivo* models to elucidate the physiological kinetics as well as dosimetric evaluation of radiolabeled nanoparticles in normal and abnormal synovial tissue.

4. CONCLUSION

Herein, we have reported the proper preparation of a multifunctional chemo/radiotherapy agent based on a polymeric nanoparticulate system, Spectroscopic characterization demonstrates the adequate surface modification by HA and successful conjugation to DOTA as a chelating agent for ^{177}Lu . The *in vitro* release kinetics and *in vitro* cytotoxicity assays on RAW 264.7 cells demonstrated an enhancement in nanoparticle uptake and the cytotoxic effect mediated by HA binding and consequent internalization. These results suggest that ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) is a potential drug carrier for further specific targeted applications in anti-rheumatic therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the “Universidad Autónoma del Estado de México” (Project No. 4288/2017/CI) and the International Atomic Energy Agency (CRP-F22064, Contract No.18358). It was performed as part of the activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, LANIDER- CONACyT”.

REFERENCES

Abolmaali, S. S., Tamaddon, A. M. and Dinarvand, R. (2013) ‘A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis’, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(5), pp. 1115–1130. doi: 10.1007/s00280-012-2062-0.

Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S. and Neubert, R. (2003) ‘Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), pp. 545–550. doi: 10.1016/S0731-7085(02)00682-9.

Aranda-Lara, L., Ferro-Flores, G., Azorín-Vega, E., Ramírez, F. de M., Jiménez-Mancilla, N., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C. and Isaac-Olivé, K. (2016) ‘Synthesis and evaluation of Lys 1 (α,γ -Folate)Lys 3 (¹⁷⁷ Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer’, *Applied Radiation and Isotopes*, 107, pp. 214–219. doi: 10.1016/j.apradiso.2015.10.030.

Ayyappan, S., Sundaraganesan, N., Aroulmoji, V., Murano, E. and Sebastian, S. (2010) ‘Molecular structure, vibrational spectra and DFT molecular orbital calculations (TD-DFT and NMR) of the antiproliferative drug Methotrexate’, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(1), pp. 264–275. doi: 10.1016/j.saa.2010.05.021.

Banerjee, S., Pillai, M. R. A. and Knapp, F. F. (Russ) (2015) ‘Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications’,

Chemical Reviews, 115(8), pp. 2934–2974. doi: 10.1021/cr500171e.

Barth, A. (2007) ‘Infrared spectroscopy of proteins’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), pp. 1073–1101. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.

Burt, H. M., Tsallas, A., Gilchrist, S. and Liang, L. S. (2009) ‘Intra-articular drug delivery systems: overcoming the shortcomings of joint disease therapy’, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1), pp. 17–26. doi: 10.1517/17425240802647259.

Chen, M., Daddy J.C., K. A., Xiao, Y., Ping, Q. and Zong, L. (2017) ‘Advanced nanomedicine for rheumatoid arthritis treatment: focus on active targeting’, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(10), pp. 1141–1144. doi: 10.1080/17425247.2017.1372746.

Dolati, S., Sadreddini, S., Rostamzadeh, D. and Ahmadi, M. (2016) ‘ScienceDirect Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment’, 80, pp. 30–41.

Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B. E., Santos-Cuevas, C. L., de María Ramírez, F., Azorín-Vega, E. P. and Meléndez-Alafort, L. (2015) ‘Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (177)Lu and Conjugated to Peptides.’, *Current radiopharmaceuticals*, 8(2), pp. 150–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771363>.

Horisawa, E., Kubota, K., Tuboi, I., Sato, K., Yamamoto, H., Takeuchi, H. and Kawashima, Y. (2002) ‘Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium.’, *Pharmaceutical research*, 19(2), pp. 132–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883639>.

Howie, D. W., Manthey, B., Hay, S. and Vernon-Roberts, B. (1993) ‘The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles.’, *Clinical orthopaedics and related research*, (292), pp. 352–7.

Jaimes-Aguirre, L., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B. E., Medina, L. A., López-Téllez, G., Gibbens-Bandala, B. V. and Izquierdo-Sánchez, V. (2017) ‘Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L- γ -glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin’, *Materials Science and Engineering C*, 76. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.145.

Kamat, M., El-boubbou, K., Zhu, D. C., Lansdell, T., Lu, X. and Li, W. (2010) ‘Hyaluronic Acid Immobilized Magnetic Nanoparticles for Active Targeting and Imaging of

Macrophages', pp. 2128–2135.

Khan, Z. A., Tripathi, R. and Mishra, B. (2012) 'Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(2), pp. 151–169. doi: 10.1517/17425247.2012.642362.

Liang, L. S., Salo, P. T., Hart, D. A. and Burt, H. M. (2009) 'Intra-articular treatment of inflammatory arthritis with microsphere formulations of methotrexate: pharmacokinetics and efficacy determination in antigen-induced arthritic rabbits', *Inflammation Research*, 58(8), pp. 445–456. doi: 10.1007/s00011-009-0009-7.

Luna-Gutiérrez, M., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B. E., Santos-Cuevas, C. L., Jiménez-Mancilla, N., De León-Rodríguez, L. M., Azorín-Vega, E. and Isaac-Olivé, K. (2013) 'A Therapeutic System of ¹⁷⁷Lu-labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells', *J. Mex. Chem. Soc.*, 57(3), pp. 212–219.

Mondalek, F. G., Ashley, R. A., Roth, C. C., Kibar, Y., Shakir, N., Ihnat, M. A., Fung, K., Grady, B. P., Kropp, B. P. and Lin, H. (2010) 'Enhanced angiogenesis of modified porcine small intestinal submucosa with hyaluronic acid-poly (lactide- co -glycolide) nanoparticles : From fabrication to preclinical validation', pp. 712–719. doi: 10.1002/jbm.a.32748.

Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A. and Dawson, K. A. (2012) 'Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials', *Nature Nanotechnology*, 7(12), pp. 779–786. doi: 10.1038/nnano.2012.207.

Pandey, S., Mahtab, A., Rai, N., Rawat, P., Ahmad, F. J. and Talegaonkar, S. (2017) 'Emerging Role of CD44 Receptor as a Potential Target in Disease Diagnosis: A Patent Review', *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 11(2). doi: 10.2174/1872213X11666170907111858.

Park, S.-N., Park, J.-C., Kim, H. O., Song, M. J. and Suh, H. (2002) 'Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking', *Biomaterials*, 23(4), pp. 1205–1212. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00235-6.

Senbanjo, L. T. and Chellaiah, M. A. (2017) 'CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.

Senda, H., Sakuma, E., Wada, I., Wang, H. J., Maruyama, H. and Matsui, N. (1999) 'Ultrastructural study of cells at the synovium-cartilage junction: response of synovial cells of the rat knee joint to intra-articularly injected latex particles.', *Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy*, 74(5), pp. 525–35.

Shin, J. M., Kim, S.-H., Thambi, T., You, D. G., Jeon, J., Lee, J. O., Chung, B. Y., Jo, D.-G. and Park, J. H. (2014) 'A hyaluronic acid–methotrexate conjugate for targeted therapy of rheumatoid arthritis', *Chemical Communications*, 50(57), p. 7632. doi: 10.1039/c4cc02595d.

Shinto, A. S., Kamaleswaran, K. K., Chakraborty, S., Vyshakh, K., Thirumalaisamy, S. G., Karthik, S., Nagaprabhu, V. N., Vimalnath, K. V, Das, T. and Banerjee, S. (2015) 'Radiosynovectomy of Painful Synovitis of Knee Joints Due to Rheumatoid Arthritis by Intra-Articular Administration of Lu-Labeled Hydroxyapatite Particulates: First Human Study and Initial Indian Experience', *World Journal of Nuclear Medicine*, 14(2). doi: 10.4103/1450-1147.153908.

Sparks, J. A., Barbhuiya, M., Karlson, E. W., Ritter, S. Y., Raychaudhuri, S., Corrigan, C. C., Lu, F., Selhub, J., Chasman, D. I., Paynter, N. P., Ridker, P. M. and Solomon, D. H. (2017) 'Investigating methotrexate toxicity within a randomized double-blinded, placebo-controlled trial: Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial-Adverse Events (CIRT-AE) Study', *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(1), pp. 133–142. doi: 10.1016/j.semarthrit.2017.02.003.

Stevanović, M. M., Jordović, B. and Uskoković, D. P. (2007) 'Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007. doi: 10.1155/2007/84965.

Torres B.M.B, Ayra P.F.E, Garcia R.E, Cornejo D.N, & Y. H. (2006) 'Perfiles de Dosis Absorbida vs Profundidad de Tejido Sinovial para El Y-90 y El P-32 Empleados en Tratamiento de Radiosinoviortesis', *American congress of the IRPA, Mexico*, pp. 1–11.

Available at:
http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/030/38030456.pdf?r=1

Vangara, K. K., Liu, J. L. and Palakurthi, S. (2013) 'Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of sn-38 to ovarian cancer', *Anticancer Research*, 33(6),

pp. 2425–2434.

Vilchis-Juárez, A., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B., Díaz-Nieto, L., Luna-Gutiérrez, M., Jiménez-Mancilla, N., Pedraza-López, M. and Gómez-Oliván, L. (2014) ‘Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice’, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(3). doi: 10.1166/jbn.2014.1721.

Wang, Y., Wei, Y. T., Zu, Z. H., Ju, R. K., Guo, M. Y., Wang, X. M., Xu, Q. Y. and Cui, F. Z. (2011) ‘Combination of hyaluronic acid hydrogel scaffold and PLGA microspheres for supporting survival of neural stem cells’, *Pharmaceutical Research*, 28(6), pp. 1406–1414. doi: 10.1007/s11095-011-0452-3.

Figure Captions

Figure 1. Schematic synthesis of a) PLGA(MTX) nanoparticles, b) HA-PLGA or HA-PLGA(MTX) nanoparticles, c) DOTA-PLGA(MTX) and d) DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles.

Figure 2. Size distribution of nanoparticulate systems: a) (PLGA NPs, HA-PLGA and HA-PLGA(MTX)); SEM images of b) PLGA nanoparticles and c) DOTA-HA-PLGA nanoparticles.

Figure 3. FT-IR spectra of a) PLGA(MTX) nanoparticles, b) HA-PLGA(MTX) nanoparticles and c) DOTA-HA-PLGA(MTX) nanoparticles.

Figure 4. UV-Vis spectra of a) PLGA nanoparticles, MTX and PLGA(MTX) nanoparticles; b) HA, PLGA nanoparticles, HA-PLGA nanoparticles and DOTA-HA-PLGA nanoparticles.

Figure 5. Entrapment and loading efficiency of methotrexate (MTX) in PLGA nanoparticles.

Figure 6. *In vitro* release profile of HA-PLGA(MTX) nanoparticles at pH 5.3 and 7.4.

Figure 7. Cellular uptake of ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) and ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX) nanoparticles by blocked HA-receptor RAW 264.7 cells and non-blocked receptor RAW 264.7 cells.

Figure 8. Cell viability of RAW 264.7 cells after exposure to $^{177}\text{LuCl}_3$, ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA, ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX), ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX), (MTX), HA-PLGA, PLGA(MTX) and HA-PLGA(MTX) at 24 h, 48 h and 120 h.

Figure 1

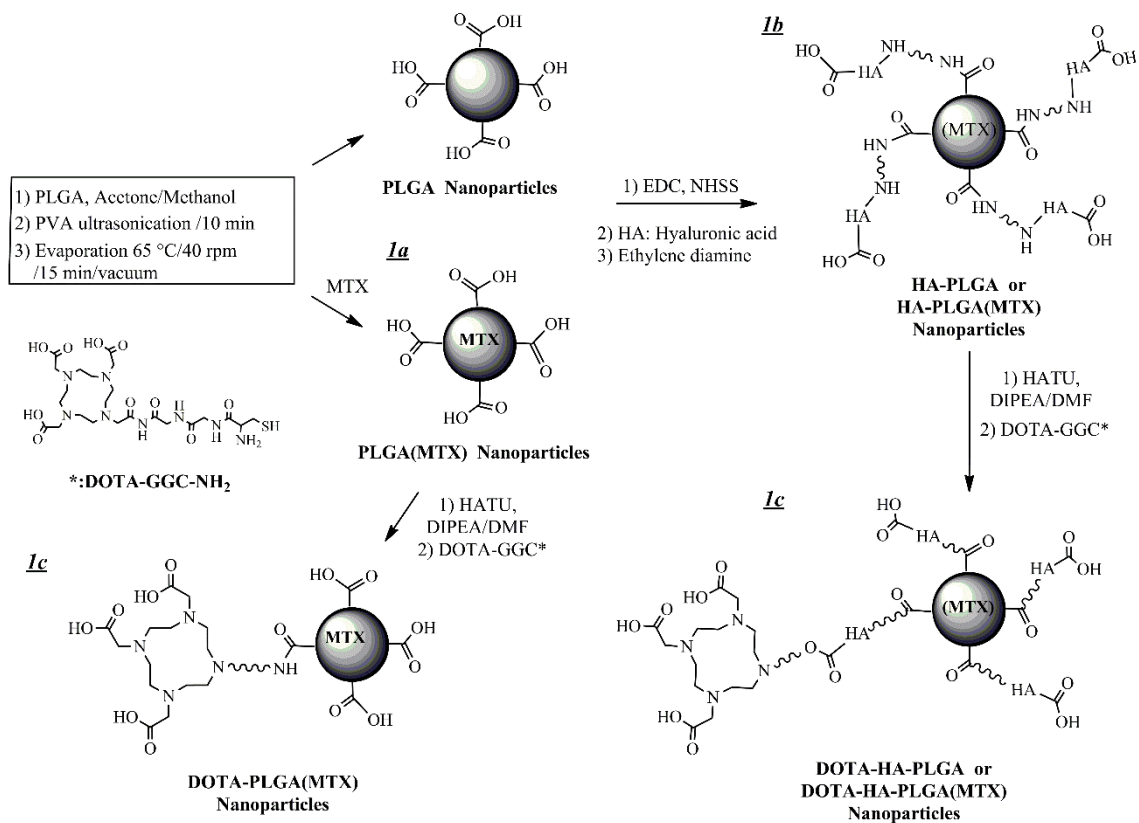


Figure 2

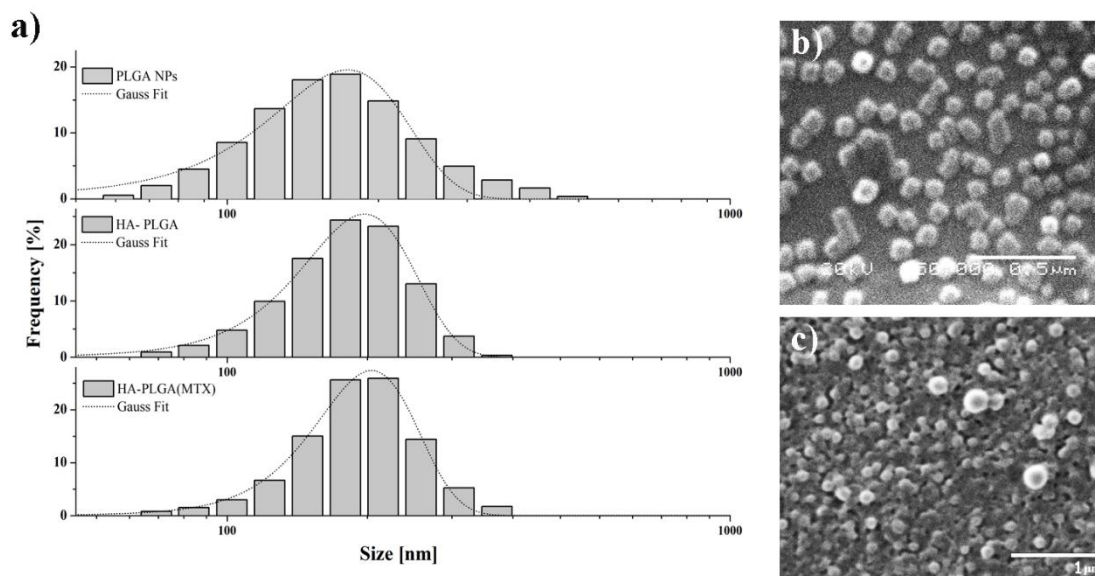


Figure 3

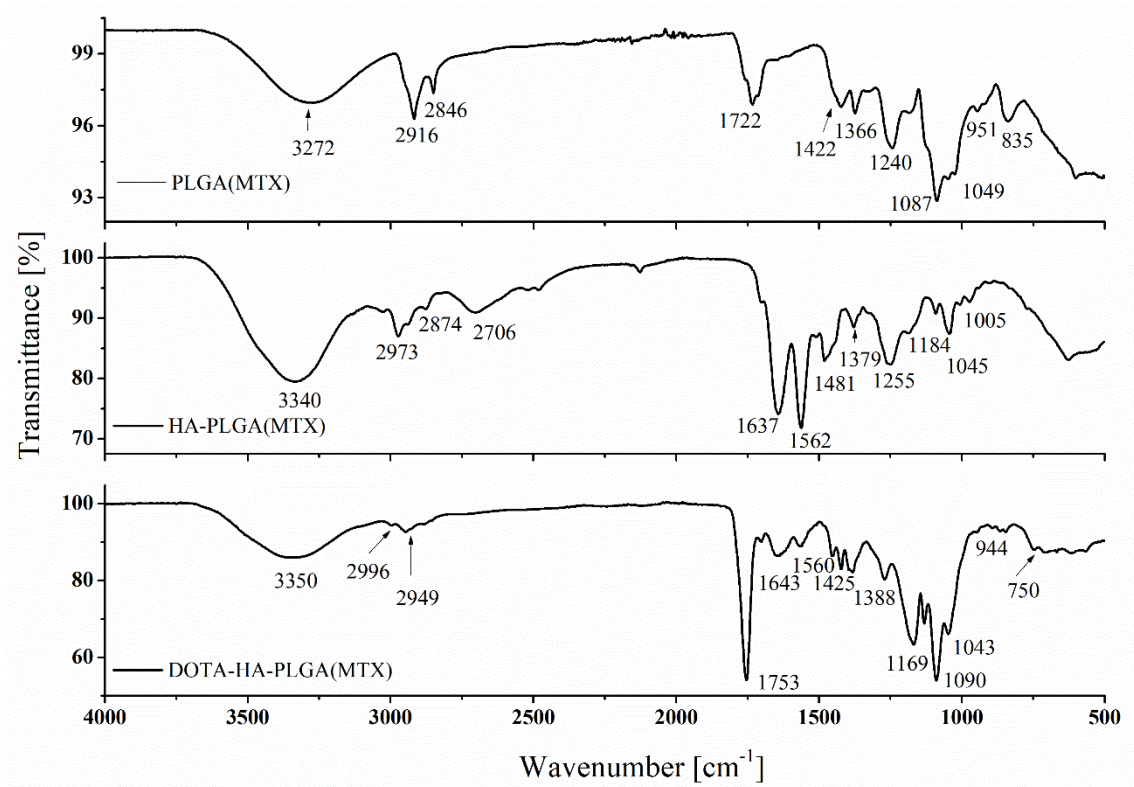


Figure 4

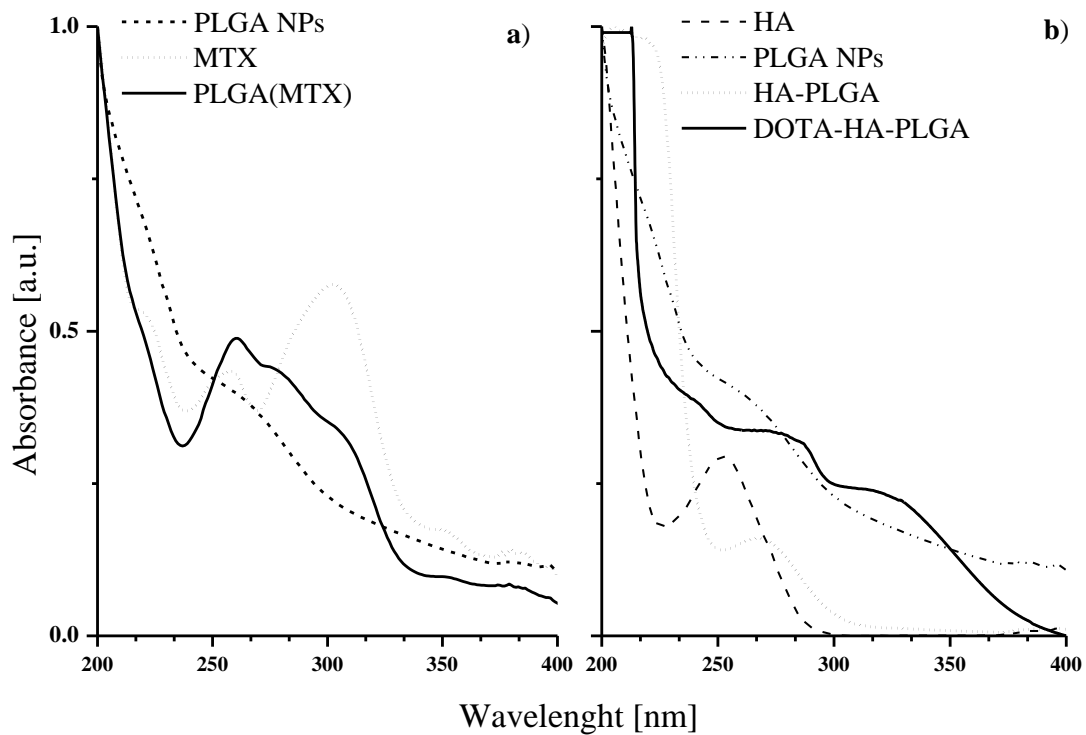


Figure 5

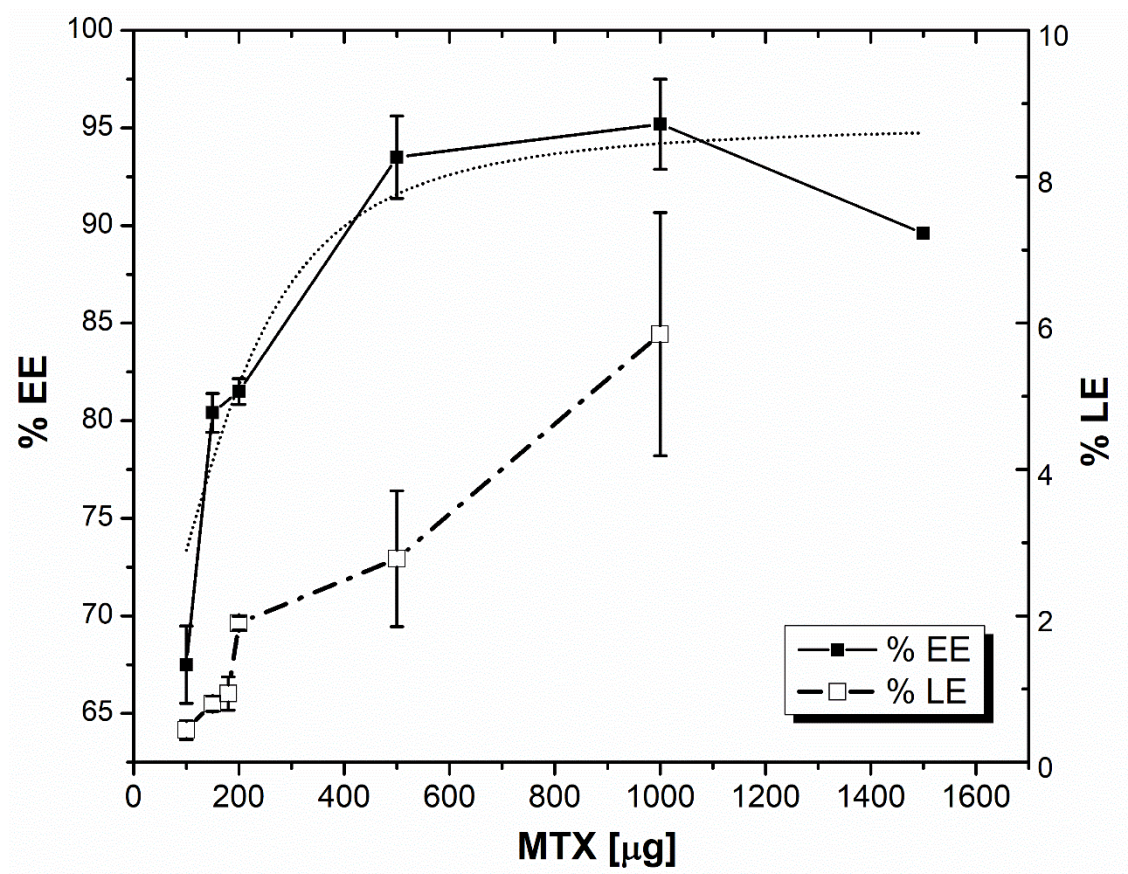


Figure 6

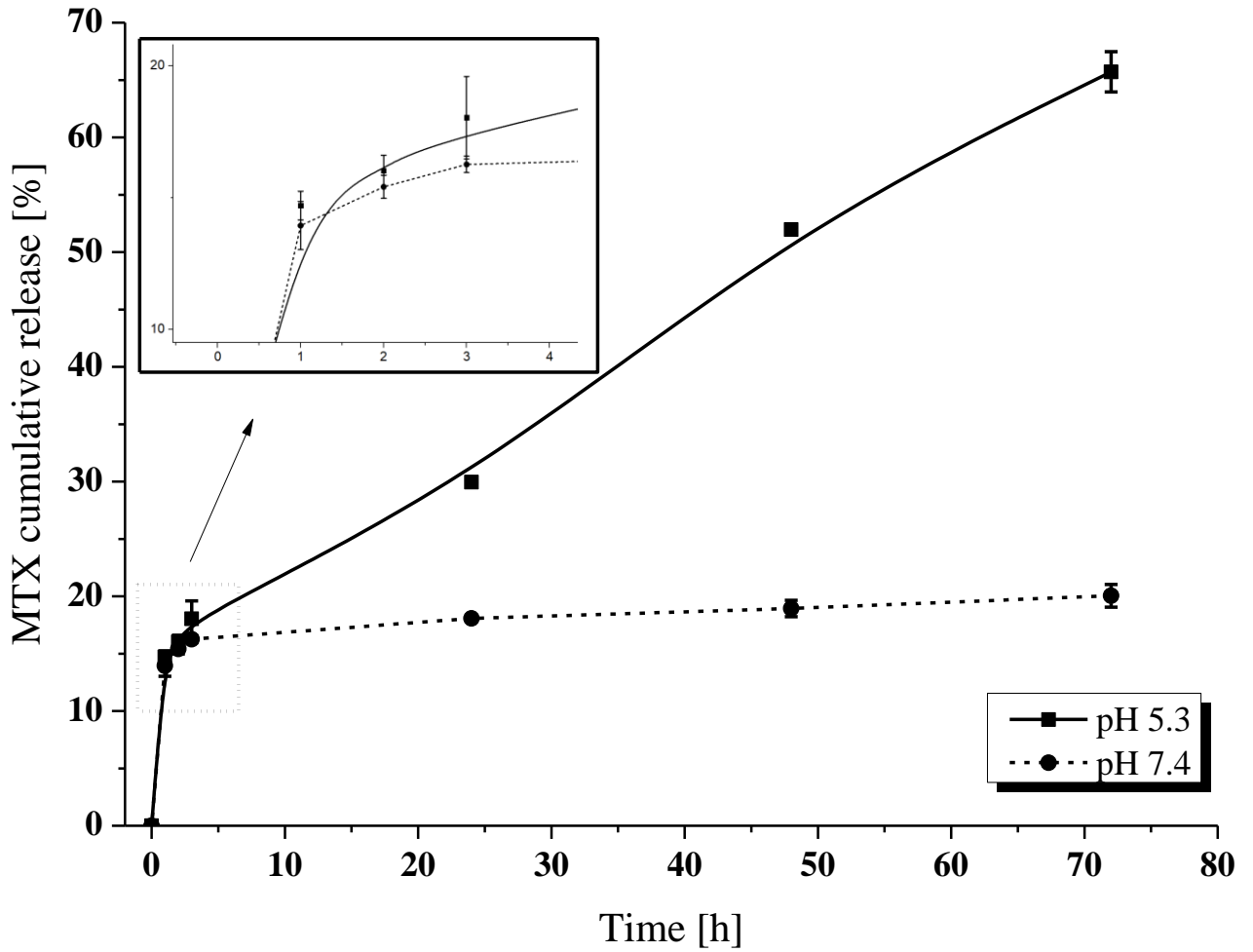


Figure 7

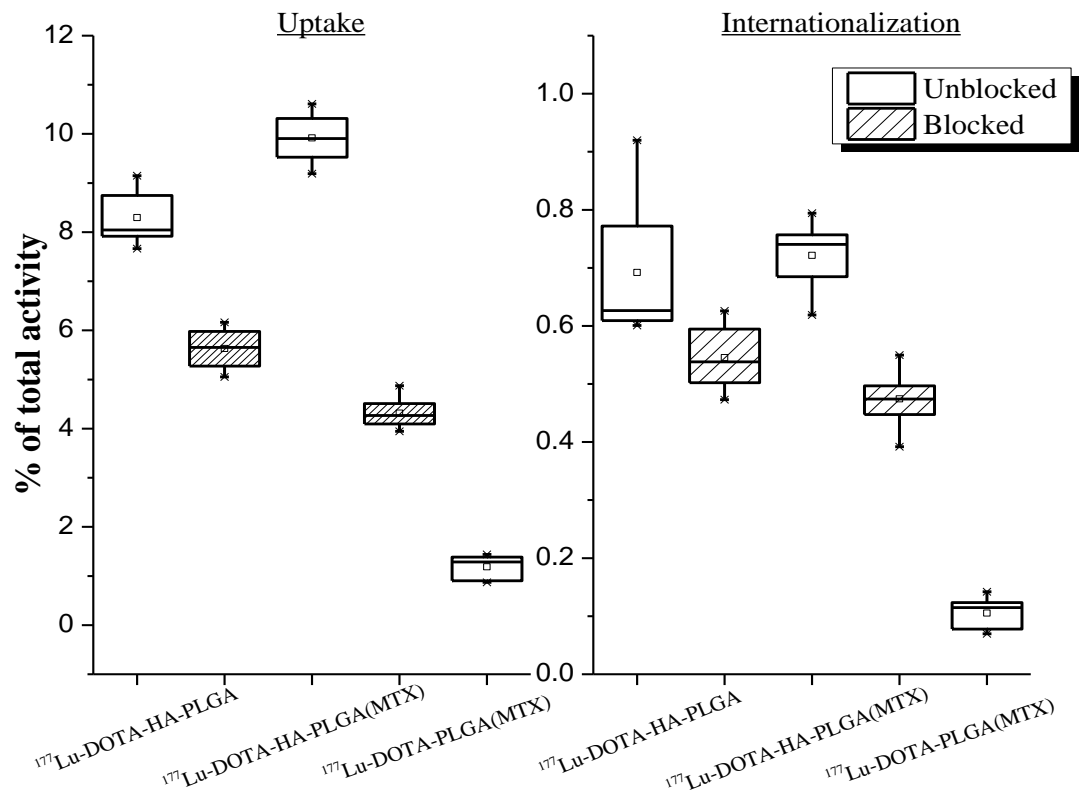
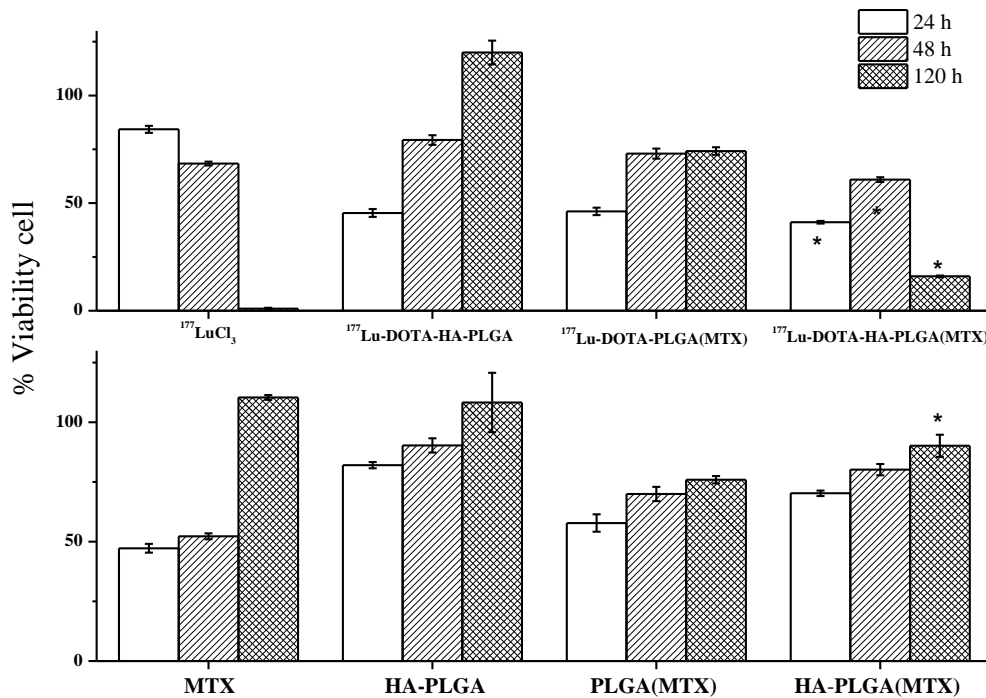
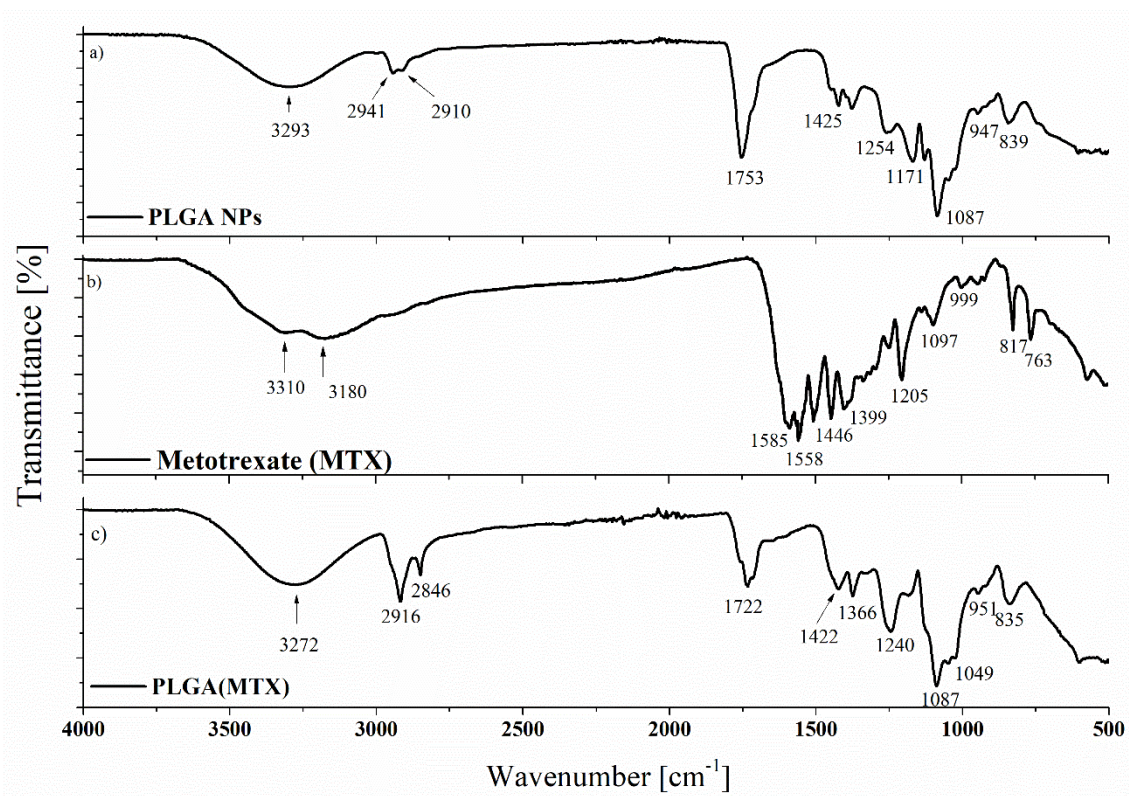


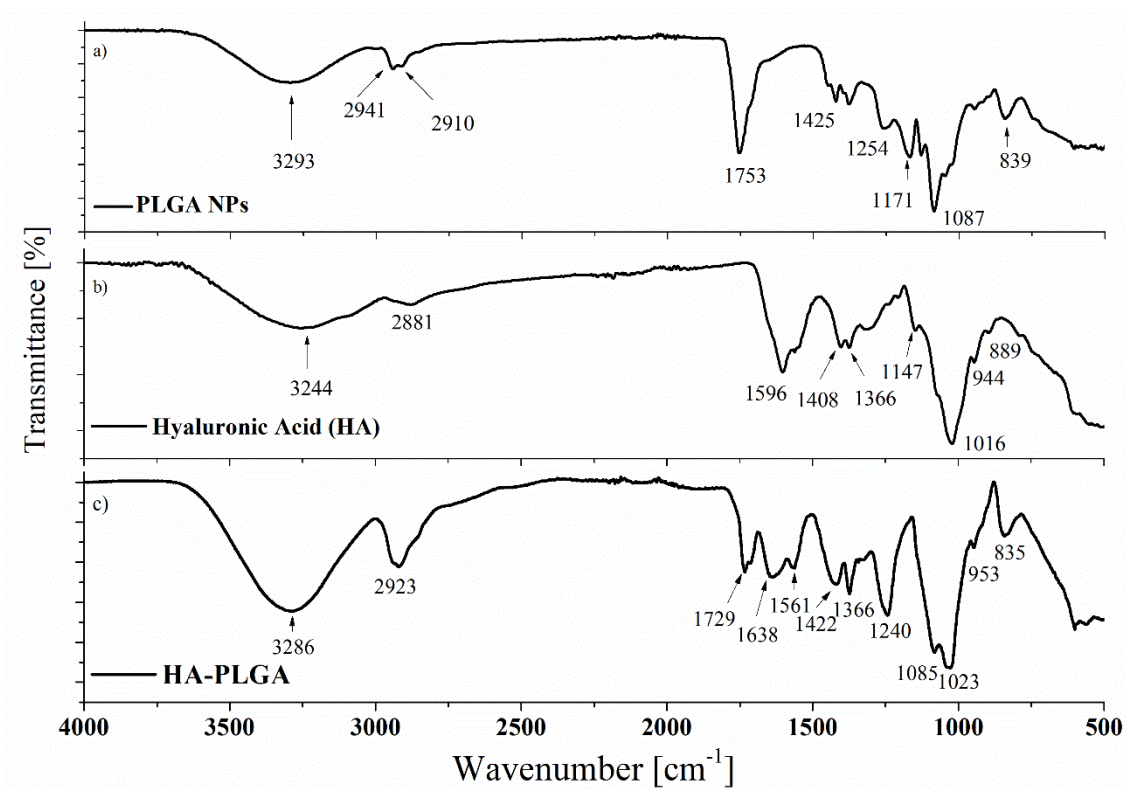
Figure 8
















Supp. Figure 1. The FT-IR spectra of a) PLGA nanoparticles, b) methotrexate (MTX) and c) PLGA nanoparticles loaded with methotrexate.



Supp. Figure 2. The FT-IR spectra of a) PLGA nanoparticles, b) hyaluronic acid (HA), and c) HA-PLGA nanoparticles.



8.2. Registro de patente

 Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial																																																									
Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad o de Registro de Diseño Industrial																																																									
<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Homoclave del formato</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">IMPI-00-009</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Fecha de publicación del formato en el DOF</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">24 / 05 / 2018</td></tr> </table>	Homoclave del formato	IMPI-00-009	Fecha de publicación del formato en el DOF	24 / 05 / 2018	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Folio y Fecha de Recepción</td></tr> <tr><td style="text-align: center;"> INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisonal de Patentes </td></tr> <tr><td>Solicitud Expediente: MX/a/2018/006934</td></tr> <tr><td>Fecha: 7/JUN/2018 Hora: 13:16:56</td></tr> <tr><td>Folio: MX/E/2018/041816 775416</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">  MX/E/2018/041816 </td></tr> </table>	Folio y Fecha de Recepción	INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisonal de Patentes	Solicitud Expediente: MX/a/2018/006934	Fecha: 7/JUN/2018 Hora: 13:16:56	Folio: MX/E/2018/041816 775416	 MX/E/2018/041816																																														
Homoclave del formato																																																									
IMPI-00-009																																																									
Fecha de publicación del formato en el DOF																																																									
24 / 05 / 2018																																																									
Folio y Fecha de Recepción																																																									
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisonal de Patentes																																																									
Solicitud Expediente: MX/a/2018/006934																																																									
Fecha: 7/JUN/2018 Hora: 13:16:56																																																									
Folio: MX/E/2018/041816 775416																																																									
 MX/E/2018/041816																																																									
<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Datos generales de la solicitud</td></tr> <tr><td>Marcar con una X sólo una opción</td></tr> <tr><td><input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención</td></tr> <tr><td><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad</td></tr> <tr><td><input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:</td></tr> <tr><td><input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial</td></tr> </table>	Datos generales de la solicitud	Marcar con una X sólo una opción	<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención	<input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad	<input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:	<input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Datos generales del o de los solicitante(s)</td></tr> <tr> <td> <table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas físicas</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s):</td></tr> <tr><td>Primer apellido:</td></tr> <tr><td>Segundo apellido:</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión):</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table> </td> <td> <table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas morales</td></tr> <tr><td>R-C (opcional): UAE5303211I2</td></tr> <tr><td>Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Domicilio del o de los solicitante(s)</td></tr> <tr><td>Código postal: 50000</td></tr> <tr><td>Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Número exterior: 100</td></tr> <tr><td>Número interior:</td></tr> <tr><td>Colonia: CENTRO</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Municipio o demarcación territorial: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Localidad: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Entre calles (opcional):</td></tr> <tr><td>País: MEXICO</td></tr> <tr><td>Calle posterior (opcional):</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s) ENRIQUE</td></tr> <tr><td>Primer apellido: MORALES</td></tr> <tr><td>Segundo apellido: AVILA</td></tr> <tr><td>Nacionalidad: MEXICANA</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr> <td>    </td> <td> Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx </td> </tr> </table> </td> </tr> </table>	Datos generales del o de los solicitante(s)	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas físicas</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s):</td></tr> <tr><td>Primer apellido:</td></tr> <tr><td>Segundo apellido:</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión):</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>	Personas físicas	CURP (opcional):	Nombre(s):	Primer apellido:	Segundo apellido:	Nacionalidad:	Teléfono (lada, número, extensión):	Correo electrónico (opcional):	<input type="radio"/> Continúa en anexo	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas morales</td></tr> <tr><td>R-C (opcional): UAE5303211I2</td></tr> <tr><td>Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>	Personas morales	R-C (opcional): UAE5303211I2	Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO	Nacionalidad:	Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561	Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Domicilio del o de los solicitante(s)</td></tr> <tr><td>Código postal: 50000</td></tr> <tr><td>Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Número exterior: 100</td></tr> <tr><td>Número interior:</td></tr> <tr><td>Colonia: CENTRO</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Municipio o demarcación territorial: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Localidad: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Entre calles (opcional):</td></tr> <tr><td>País: MEXICO</td></tr> <tr><td>Calle posterior (opcional):</td></tr> </table>		Domicilio del o de los solicitante(s)	Código postal: 50000	Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE	<small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small>	Número exterior: 100	Número interior:	Colonia: CENTRO	<small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small>	Municipio o demarcación territorial: TOLUCA	Localidad: TOLUCA	Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO	Entre calles (opcional):	País: MEXICO	Calle posterior (opcional):	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s) ENRIQUE</td></tr> <tr><td>Primer apellido: MORALES</td></tr> <tr><td>Segundo apellido: AVILA</td></tr> <tr><td>Nacionalidad: MEXICANA</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>		Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)	CURP (opcional):	Nombre(s) ENRIQUE	Primer apellido: MORALES	Segundo apellido: AVILA	Nacionalidad: MEXICANA	Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561	Correo electrónico (opcional):	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo	<table border="1"> <tr> <td>    </td> <td> Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx </td> </tr> </table>		  	Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx
Datos generales de la solicitud																																																									
Marcar con una X sólo una opción																																																									
<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención																																																									
<input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad																																																									
<input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:																																																									
<input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial																																																									
Datos generales del o de los solicitante(s)																																																									
<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas físicas</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s):</td></tr> <tr><td>Primer apellido:</td></tr> <tr><td>Segundo apellido:</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión):</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>	Personas físicas	CURP (opcional):	Nombre(s):	Primer apellido:	Segundo apellido:	Nacionalidad:	Teléfono (lada, número, extensión):	Correo electrónico (opcional):	<input type="radio"/> Continúa en anexo	<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Personas morales</td></tr> <tr><td>R-C (opcional): UAE5303211I2</td></tr> <tr><td>Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Nacionalidad:</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>	Personas morales	R-C (opcional): UAE5303211I2	Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO	Nacionalidad:	Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561	Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo																																								
Personas físicas																																																									
CURP (opcional):																																																									
Nombre(s):																																																									
Primer apellido:																																																									
Segundo apellido:																																																									
Nacionalidad:																																																									
Teléfono (lada, número, extensión):																																																									
Correo electrónico (opcional):																																																									
<input type="radio"/> Continúa en anexo																																																									
Personas morales																																																									
R-C (opcional): UAE5303211I2																																																									
Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO																																																									
Nacionalidad:																																																									
Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561																																																									
Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com																																																									
<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo																																																									
<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Domicilio del o de los solicitante(s)</td></tr> <tr><td>Código postal: 50000</td></tr> <tr><td>Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Número exterior: 100</td></tr> <tr><td>Número interior:</td></tr> <tr><td>Colonia: CENTRO</td></tr> <tr><td><small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small></td></tr> <tr><td>Municipio o demarcación territorial: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Localidad: TOLUCA</td></tr> <tr><td>Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO</td></tr> <tr><td>Entre calles (opcional):</td></tr> <tr><td>País: MEXICO</td></tr> <tr><td>Calle posterior (opcional):</td></tr> </table>		Domicilio del o de los solicitante(s)	Código postal: 50000	Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE	<small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small>	Número exterior: 100	Número interior:	Colonia: CENTRO	<small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small>	Municipio o demarcación territorial: TOLUCA	Localidad: TOLUCA	Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO	Entre calles (opcional):	País: MEXICO	Calle posterior (opcional):																																										
Domicilio del o de los solicitante(s)																																																									
Código postal: 50000																																																									
Calle: INSTITUTO LITERARIO ORIENTE																																																									
<small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes S/N, Boulevard Avila Camacho, Calles, Carreter, etc.)</small>																																																									
Número exterior: 100																																																									
Número interior:																																																									
Colonia: CENTRO																																																									
<small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sincón, etc.)</small>																																																									
Municipio o demarcación territorial: TOLUCA																																																									
Localidad: TOLUCA																																																									
Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO																																																									
Entre calles (opcional):																																																									
País: MEXICO																																																									
Calle posterior (opcional):																																																									
<table border="1"> <tr><td style="text-align: center;">Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)</td></tr> <tr><td>CURP (opcional):</td></tr> <tr><td>Nombre(s) ENRIQUE</td></tr> <tr><td>Primer apellido: MORALES</td></tr> <tr><td>Segundo apellido: AVILA</td></tr> <tr><td>Nacionalidad: MEXICANA</td></tr> <tr><td>Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561</td></tr> <tr><td>Correo electrónico (opcional):</td></tr> <tr><td style="text-align: right;"><input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo</td></tr> </table>		Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)	CURP (opcional):	Nombre(s) ENRIQUE	Primer apellido: MORALES	Segundo apellido: AVILA	Nacionalidad: MEXICANA	Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561	Correo electrónico (opcional):	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo																																															
Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)																																																									
CURP (opcional):																																																									
Nombre(s) ENRIQUE																																																									
Primer apellido: MORALES																																																									
Segundo apellido: AVILA																																																									
Nacionalidad: MEXICANA																																																									
Teléfono (lada, número, extensión): 7222262371 EXT 11561																																																									
Correo electrónico (opcional):																																																									
<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo																																																									
<table border="1"> <tr> <td>    </td> <td> Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx </td> </tr> </table>		  	Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx																																																						
  	Contacto: Avistol a 550, Puente Santa María Tlaxepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. Teléfono: (01155) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dpi@impi.gob.mx																																																								

gob mx
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Domicilio de l o de los inventor(es) o diseñador(es)	
Código postal: 5C200	
Calle: <small>(Ej. Av. Aviación, Insurgentes, Sur, Bóveda, Avila Camacho, Calles, Corredor, etc.)</small> CUAUHTEMOC	
Número exterior: 23	Número interior:
Colonia: <small>(Ej. Jardines, Aviación, Juárez, Residencial, Huiliza, Francisco I. Madero, Sección, etc.)</small> PUEBLO NUEVO	
Municipio o demarcación territorial: TOLUCA	Localidad: PUEBLO NUEVO
Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO	Entre calles (opcional)
País: MEXICO	Calle posterior (opcional)

Datos generales del o de los apoderado(s)	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s): ROGERIO	RFC (opcional):
Primer apellido: FAMIREZ	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido: GIL	Correo electrónico (opcional): innovacion.uaem@gmail.com
<input type="radio"/> Continúa en anexo	

Domicilio para oír y recibir notificaciones	
Código postal: 50000	
Calle: <small>(Ej. Av. Aviación, Insurgentes, Sur, Residencial, Avila Camacho, Calles, Corredor, etc.)</small> INSTITUTO LITERARIO ORIENTE	
Número exterior: 100	Número interior:
Colonia: <small>(Ej. Jardines, Aviación, Juárez, Residencial, Huiliza, Francisco I. Madero, Sección, etc.)</small> CENTRO	
Municipio o demarcación territorial: TOLUCA	Localidad: TOLUCA
Entidad Federativa: ESTADO DE MEXICO	Entre calles (opcional)
País: MEXICO	Calle posterior (opcional)

Datos generales de los autorizados para oír y recibir notificaciones			
Nombre(s):	Primer apellido:	Segundo apellido:	CURP (opcional):
MAFIA DEL ROSARIO	VILCHIS	BERNAL	
<input type="radio"/> Continúa en anexo			

Datos de la solicitud	
Denominación o título de la invención, modelo de utilidad o diseño industrial: LA DOTA-HA-P-GA (MTX) COMO UN NUEVO NANORADIOFÁRMACO PARA TERAPIA DUAL DE PROCESOS INFLAMATORIOS QUE SOBREEXPRESAN RECEPTORES CD44	
Fecha de divulgación previa (DD / MM / AAAA):	/ /

Divisional de la solicitud	
No. Expediente en trámite:	Figura jurídica:
Fecha de presentación (DD / MM / AAAA):	/ /

PCT	
No. de solicitud internacional:	Fecha de presentación internacional (DD / MM / AAAA):
	/ /

Prioridad o prioridades reclamada(s)		
País (oficina) de origen:	Fecha de presentación (DD/MM/AAA):	Número de serie:
	/ /	
<input type="radio"/> Continúa en anexo		

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

ROGERIO RAMIREZ GIL

 Nombre y firma del solicitante o su apoderado.

¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX) COMO UN NUEVO NANORADIOFÁRMACO PARA TERAPIA DUAL DE PROCESOS INFLAMATORIOS QUE SOBREENPRESAN RECEPTORES CD44

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de transporte y liberación de metotrexato (MTX), preparado a partir de nanopartículas poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) conjugadas con ácido hialurónico (HA)/DOTA y radiomarcadas con ¹⁷⁷Lu, como una alternativa de terapia dual de sinoviortesis (radioterapia y quimioterapia). El sistema propuesto presenta selectividad y especificidad, hacia células que sobreexpresan receptores CD44 y que incluyen a macrófagos presentes en enfermedades articulares crónico degenerativas, como la artritis reumatoide (AR). Se demostró mediante estudios fisicoquímicos la composición estructural del sistema ¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX) así como su actividad biológica *in vitro* en la línea celular RAW 264.7 que sobre-expresa receptores CD44, mostrando alta afinidad, selectividad y un perfil citotóxico adecuado para proceder al desarrollo de una formulación farmacéutica para su administración intraarticular.

ANTECEDENTES

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que afecta entre el 0.4 y 1 % de la población a nivel mundial, su prevalencia aumenta con la edad ocurriendo principalmente entre los 40 y 70 años y siendo las mujeres de dos a tres veces más susceptibles a padecerla que los hombres. Tiene relevante importancia socioeconómica ya que es causa importante de discapacidad y en pacientes adultos se le relaciona con

enfermedades cardiovasculares que conducen a un aumento en la mortalidad y una reducción de 5 a 10 años en la esperanza de vida (Gouveia et al. 2015; Poh et al. 2017; Shin et al. 2014).

El régimen terapéutico que se sigue hoy en día para los pacientes con AR incluye fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), glucocorticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), fármacos biológicos, sistemas de nanopartículas y procesos como la sinoviortesis (Dolati et al. 2016). Dentro de esta última categoría se encuentra una alternativa que consiste en la administración intraarticular de radionúclidos emisores β^- (radiosinoviortesis, RSO), en forma de partículas o coloides (1-20 μm), en donde la emisión de radiación β^- tiene la capacidad de disminuir el proceso inflamatorio y generar ablación sobre la membrana sinovial inflamada (pannus) con posterior fibrosis (Klett et al. 2007; Mödder 2012). Los radionúclidos más utilizados para RSO son ^{90}Y , ^{186}Re , ^{169}Er , ^{32}P y actualmente ^{177}Lu .

Por sus propiedades nucleares el ^{177}Lu ($t_{1/2}=6.7$ d con emisión de partículas beta $E_{\text{max}}=0.497$ MeV) se utiliza como un radionúclido eficaz en aplicaciones terapéuticas y puede ser quelado eficientemente por el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA); el ^{177}Lu también emite radiación gamma (208 keV) haciendo posible la obtención de imágenes *in vivo* de su biodistribución (Vilchis-Juárez et al. 2014).

En 2014 Chakraborty y col. (Chakraborty et al. 2014) evaluaron el primer uso clínico de partículas de hidroxiapatita (HA) con tamaños de 1 a 10 micras y marcadas con ^{177}Lu (^{177}Lu -HA) para el tratamiento de artritis reumatoide. Se obtuvieron resultados de biodistribución prometedores en ratas Wistar con articulaciones de rodilla afectadas con artritis. Los estudios clínicos llevados a cabo en articulaciones de rodilla de 10 pacientes con AR demostraron la efectividad de ^{177}Lu -HA (333 ± 46 MBq) en el control del dolor, mejoría funcional y prevención del avance de la enfermedad.

Shin y col. (Shin et al. 2014) evaluaron el conjugado de ácido hialurónico (HA) unido a metotrexato (MTX) mediante un enlace éster para la terapia dirigida de artritis reumatoide. En los resultados el HA-MTX se captó selectivamente por macrófagos de la línea celular RAW 264.7 a través de la unión específica entre los receptores CD44 y la molécula HA. Los

estudios de biodistribución *in vivo* demostraron una acumulación selectiva en el sitio de inflamación en un modelo de ratones CIA.

Homma y col. prepararon un conjugado para administración intraarticular de MTX unido a ácido hialurónico (HA) a través del péptido (Asn-Phe-Phe) escindible por enzimas lisosomales y un espaciador PEG. El conjugado mostró efectos antiproliferativos sobre fibroblastos sinoviales humanos estimulados por TNF- α (HFLS) y efectos antiinflamatorios en tejido articular de rodilla en un modelo de AR inducida en ratas (Homma et al. 2009).

Recientemente se comparó la eficacia y la seguridad del conjugado HA-MTX (MW > 1900 kDa, administración intraarticular) con el MTX vía oral en modelos de rata artrítica. Se concluyó que el HA-MTX tiene una ventana terapéutica más amplia que el MTX oral. La efectividad terapéutica se optimiza ya que la concentración de MTX administrado se reduce drásticamente utilizando el conjugado polimérico intraarticular en lugar de MTX por vía oral (Tamura et al. 2016b).

En 2004 Liang y col. sintetizaron microesferas de ácido (poli-L-láctico) (PLLA) cargadas con MTX (30 – 100 μ m) para administración intraarticular por el método de evaporación del disolvente. Las microesferas cargadas con MTX demostraron biocompatibilidad en conejos inyectados intraarticularmente y disminuyeron la eliminación de MTX de la cavidad articular al retenerse en la articulación (Liang et al. 2004b).

Lee y col., diseñaron nanopartículas de RGD-MTX-PLGA-Au (100 – 115 nm) para el tratamiento de artritis reumatoide. Se administraron por vía intravenosa en ratones CIA artríticos inducidos por colágeno y las imágenes de absorbancia NIR *in vivo* mostraron la acumulación selectiva de las nanopartículas en la región inflamada. Después de la irradiación NIR (1,59 W/cm², 10 min), la temperatura de la pata inflamada aumentó a 48 °C, lo que condujo a la liberación controlada de MTX desde las nanopartículas. Al comparar el tratamiento convencional de MTX con el de las nanopartículas de RGD-MTX-PLGA-Au, éste tuvo una mayor eficacia terapéutica con una dosificación mucho más pequeña de MTX. La relación molar entre NP y MTX fue de 1/930. Estos resultados demostraron que el tratamiento quimio-fototérmico dirigido mediante sistemas de

nanopartículas maximizan la eficacia terapéutica y minimizan los efectos secundarios relacionados con la dosificación en el tratamiento de la AR (Lee et al. 2013).

Genç y Büyüktiryaki reportaron la preparación de microcápsulas de ácido hialurónico (HA) y alginato de sodio (SA) (160, 400 y 800 μm) para encapsular MTX mediante un encapsulador industrial. La liberación controlada de MTX fue dependiente del tamaño de partícula. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* en células 5RP7 (línea celular de cáncer de fibroblastos de rata) demostraron que las microcápsulas de MTX tienen un efecto citotóxico mayor que el MTX libre (Genç & Büyüktiryaki 2014).

Liang y col., compararon la farmacocinética y la distribución de MTX libre y microesferas (30 – 100 μm) de ácido (poli D,L-láctico) (PLA) cargadas con MTX (10 mg), empleando un modelo de administración intraarticular en rodilla de conejo. Los resultados mostraron que la concentración de MTX en tejido sinovial fue mayor tras la inyección de microesferas comparado con el MTX libre. El MTX libre se eliminó rápidamente de la cavidad articular, mientras que las microesferas se mantuvieron retenidas en el espacio articular con posterior eliminación controlada del MTX (Liang et al. 2005).

Las nanopartículas poliméricas (100 – 200 nm) de ácido poli(láctico-co-glicólico) modificadas con el espaciador PEG-NH₂ y conjugadas con HA vía EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) con aplicaciones antitumorales (Yadav et al. 2007b), demostró su capacidad anti proliferativa *in vivo* en modelos tumorales de ascitis de Ehrlich, con una adecuada retención en el tejido tumoral y rápida eliminación de los tejidos normales.

Zille y col., evaluaron la toxicidad de la inyección intraarticular en ratas sanas de nanopartículas de PLA y ácido (poli D, L-láctico-glicólico) (PLGA) encapsulando Dextran-FITC y conjugadas mediante un enlace éster con ácido hialurónico (HA) para el tratamiento de la AR y /o osteoartritis (OA). Los resultados *in vivo* indicaron que las nanopartículas funcionalizadas son biocompatibles y son internalizadas por las células articulares en la rodilla por lo que concluyeron que las nanopartículas de PLGA-HA y sus productos de degradación no inducen modificaciones importantes de las funciones de los tejidos articulares en la rodilla de ratas sanas (Zille et al. 2010).

Lee y col., sintetizaron copolímeros de PLGA conjugados químicamente con HA (98.4 - 539.4 nm) mediante el método de solubilización asistida por PEG en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) como vehículos micelares específicos para doxorubicina (DOX). Los resultados muestran que los copolímeros HA-g-PLGA cargados con DOX presentan una mayor captación celular y una mayor citotoxicidad que la DOX libre en células de cáncer HCT-116 que sobreexpresan el receptor CD44 para HA, sugiriendo que las células las absorben a través de endocitosis mediada por el receptor CD44 (Lee et al. 2009).

Vangara y col. sintetizaron nanopartículas (265.6 ± 3.8 nm) mediante el método de emulsión- evaporación del disolvente, el sistema de ácido (poli D,L-láctico-glicólico)-polietilenglicol modificadas con HA mediante una reacción con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida se cargó con SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptotecina) como una alternativa de terapia para cáncer de ovario. La captación del sistema PLGA-PEG-HA fue de 8 a 16 veces mayor en líneas celulares CD44-positivas (SKOV-3 y OVCAR-8), respecto a células CD44-negativas (CHO); y la citotoxicidad fue significativamente más alta para las nanopartículas conteniendo la molécula de reconocimiento biológico HA respecto a las que no están conjugadas con HA. De este estudio se concluye que las nanopartículas PLGA-PEG-HA son un sistema eficiente para la liberación de SN-38 útil para la terapia contra cáncer de ovario (Vangara et al. 2013).

Las partículas con un tamaño inferior a 400 nm permiten la retención selectiva en tejido articular por efecto del peso molecular; su funcionalización con el ácido hialurónico estimula la captación específica y selectiva en células proinflamatorias (positivas al receptor CD44).

En éste contexto, no se ha reportado un nano-sistema radiomarcado multifuncional polimérico modificado con moléculas de reconocimiento biológico, que permita el direccionamiento activo, con el consecuente incremento en la captación celular y que permita una liberación controlada de un fármaco modulador de la enfermedad.

El metotrexato es el fármaco de elección y la base terapéutica de la artritis reumatoide. La radiosinovioartrosis es una alternativa terapéutica, donde el radionúclido Lutecio-177 se ha empleado exitosamente.

De esta forma, se presenta un nuevo nanoradiofármaco heterofuncional de nanopartículas poliméricas (167.6 ± 57.8 nm) radiomarcadas con Lutecio-177, para la liberación controlada de metotrexato, como una alternativa de terapia combinada para la ablación de células pro-inflamatorias

MÉTODO DE PREPARACIÓN

La preparación de las nanopartículas se realiza por la técnica de emulsificación con evaporación de solvente, para ello una solución de PLGA en acetona (15 mg/mL) se mezcla con una solución de metotrexato (1 mg/mL), adicionando metanol para obtener la fase orgánica; a la mezcla final se le adiciona alcohol polivinílico (PVA, 0.25%) como surfactante. La mezcla se homogeneiza por agitación vigorosa, posteriormente se procede a la evaporación de los solventes orgánicos (67 °C/20 min/vacío). Finalmente, las nanopartículas se purifican con un sistema de diálisis (MW 30,000) (figura 1a).

La modificación superficial de las nanopartículas de PLGA con ácido hialurónico (HA) se realiza en fase acuosa empleando 0.01 g de nanopartículas liofilizadas, las cuales se disuelven en 1 mL de una solución de HA (1.25 mM). Los grupos carboxilo se activan con EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y se estabilizan con N-hidroxisulfosuccimida (NHSS) para su posterior reacción con etilendiamina (EDA, 374 ng/ μ L) como agente entrecruzante, obteniendo las nanopartículas de PLGA modificadas con HA (figura 1b).

Con el fin de realizar el radiomarcado, las nanopartículas liofilizadas de HA-PLGA(MTX) se modificaron con DOTA-GGC-NH₂ (Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético-Gly-Gly-Cys-NH₂), 1.1 mg de HA-PLGA(MTX) se mezclan con 100 μ L de HATU (2:1 p/p respecto a las NP) en 100 μ L de DMF; 100 μ L de DIPEA (0.3 %), para su activación (15 min). Posteriormente se adicionan 100 μ L de DOTA (0.01 mg/ μ L) y se mantiene en agitación 1h a temperatura ambiente (figura 1c). Finalmente 100 μ l de nanopartículas DOTA-HA-PLGA(MTX) (1 mg / 250 μ L H₂O) se diluyen en 50 μ L de buffer de acetato 1M pH 7.0. Se adicionan 10 μ L de solución ¹⁷⁷LuCl₃ (111 MBq) y 1 mL de ácido ascórbico (10 mg/mL) (figura 1d).

La capacidad de absorción de MTX en el sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA mostró un aumento lineal de la capacidad de carga en función del aumento de la cantidad de MTX, con un máximo de eficiencia de atrapamiento de 95% y una eficiencia de carga del 60%.

Las nanopartículas de HA-PLGA(MTX) mostraron una forma predominantemente esférica con diámetro promedio de $167.6 \text{ nm} \pm 57.48 \text{ nm}$, índice de polidispersión de 0.328 y potencial zeta de -18.6 mV , parámetros determinados por dispersión dinámica de luz.

La figura 2, muestra el espectro obtenido del sistema final DOTA-HA-PLGA(MTX), donde se observan señales características de la formación de los enlaces amida en las regiones de amida I a 1560 cm^{-1} (-NH-, CN), de la amida II en 1425 cm^{-1} (-NH-, -CO-, y -C-C-), y de amida III a 1388 cm^{-1} (-CO-, -NH-), mientras que a 3350 cm^{-1} aparecen señales correspondientes a (-NH-, -OH-). Adicionalmente, las bandas cercanas a 944 y 750 cm^{-1} confirman la presencia del enlace (-C-S-) correspondiente a la cisteína del DOTA-GGC.

El perfil de liberación de metotrexato de las nanopartículas poliméricas mostró un comportamiento bifásico al evaluarse a pH 7.4 y 5.3. Se observó mayor estabilidad a pH fisiológico, con una cantidad máxima de fármaco libre cercana al 25% del fármaco cargado. Cuando las nanopartículas están expuestas a pH ácido (5.3), se observó un aumento en la cantidad acumulada de fármaco liberado, lo que sugiere una modificación significativa en los mecanismos de liberación. Se alcanza una liberación superior de 70% a 80 h, el modelado a través de un ajuste de crecimiento sigmoideo predice la liberación del 100% de MTX aproximadamente a las 100 horas. Los experimentos de liberación demuestran que la capacidad de liberación del metotrexato dependerá de los mecanismos de internalización celular y la actividad endo-lisosomal que permitirá las condiciones ácidas necesarias para la liberación del fármaco.

Los ensayos de las propiedades bioquímicas del conjugado consistieron en pruebas *in vitro* de captación y viabilidad celular en la línea celular RAW 264.7. El sistema conjugado muestra alta afinidad y selectividad asociada al reconocimiento de la sobre-expresión de receptores CD44. El sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) se comparó contra ^{177}Lu -DOTA-PLGA(MTX), demostrando que la presencia de ácido hialurónico incrementa en más de 8 veces la captación del sistema particulado (figura 3). Adicionalmente, el ensayo en células con receptores bloqueados muestra captación dependiente de receptores de ácido hialurónico (CD44) (figura 4).

El estudio de citotoxicidad permitió demostrar la capacidad antiproliferativa del sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX), el cual es capaz de generar una reducción del 75 % de la viabilidad celular a las 48 h de exposición. De acuerdo a los estudios de liberación, a las 48 h cerca del 50 % de la concentración de metotrexato aún se mantiene en la matriz polimérica, deduciendo en las primeras horas de exposición la mayor cantidad de daño es resultado de la radiohidrólisis en el medio circundante y dentro de las células.

Integrando la información obtenida, se demuestra la capacidad del sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) por unirse selectiva y específicamente a receptores de ácido hialurónico, así como su efecto citotóxico debido a la combinación de daño producido de manera conjunta por el radionúclido ^{177}Lu y el fármaco metotrexato.

El sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) se obtiene con las siguientes características:

- Sistema polimérico nanoparticulado con un tamaño promedio de $167.6 \text{ nm} \pm 57.48 \text{ nm}$, índice de polidispersión de 0.328.
- Eficiencia de atrapamiento de metotrexato en la matriz polimérica de PLGA máxima del 95% y una eficiencia de carga del 60%
- Funcionalización eficiente con ácido hialurónico comprobada mediante espectroscopía IR y UV-Vis
- Pureza radioquímica mayor al 95 %
- Liberación controlada de MTX
- Capacidad del sistema para ser captado significativamente *in vitro* y de forma específica por células que sobreexpresan el receptor CD44 presente en procesos inflamatorios crónicos, como la artritis reumatoide (AR).
- Además de la captación específica el sistema presenta un efecto citotóxico *in vitro* mayor que la concentración equivalente de MTX libre.

REFERENCIAS

- Abbasi, I.A., 2012. Preliminary studies on ^{177}Lu -labeled sodium pyrophosphate (^{177}Lu -PYP) as a potential bone-seeking radiopharmaceutical for bone pain palliation. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(6), pp.763–769.
- Abolmaali, S.S., Tamaddon, A.M. & Dinarvand, R., 2013. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(5), pp.1115–1130. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-012-2062-0>.
- Aletaha, D. et al., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), pp.2569–2581.
- Alkrad, J.A. et al., 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), pp.545–550.
- Aranda-Lara, L. et al., 2016. Synthesis and evaluation of Lys 1 (α,γ -Folate)Lys 3 (^{177}Lu -DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer. *Applied Radiation and Isotopes*, 107, pp.214–219. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804315302244>.
- Ayyappan, S. et al., 2010. Molecular structure, vibrational spectra and DFT molecular orbital calculations (TD-DFT and NMR) of the antiproliferative drug Methotrexate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(1), pp.264–275. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142510002726>.
- B, I.T.B.M. & E, I.A.P.F., 2006. Perfiles de Dosis Absorbida vs Profundidad de Tejido Sinovial para El Y-90 y El P-32 Empleados en Tratamiento de Radiosinoviotesis. , pp.1–11.
- Banerjee, S., Pillai, M.R.A. & Knapp, F.F. (Russ), 2015. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications.

Chemical Reviews, 115(8), pp.2934–2974. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500171e>.

Barth, A., 2007a. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), pp.1073–1101. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272807001375>.

Barth, A., 2007b. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), pp.1073–1101.

Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P., 2012. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp.24–36. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>.

Burt, H.M. et al., 2009. Intra-articular drug delivery systems: overcoming the shortcomings of joint disease therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1), pp.17–26. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425240802647259>.

Chakraborty, S. et al., 2014. Preparation, evaluation, and first clinical use of ¹⁷⁷Lu-labeled hydroxyapatite (HA) particles in the treatment of rheumatoid arthritis: utility of cold kits for convenient dose formulation at hospital radiopharmacy. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 57(7), pp.453–462. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3202>.

Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies Alkrad, J.A. et al., 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), pp.545–550.

Chen, B., Miller, R.J. & Dhal, P.K., 2014. Hyaluronic acid-based drug conjugates: state-of-the-art and perspectives. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(1), pp.4–16.

Chen, M. et al., 2017. Advanced nanomedicine for rheumatoid arthritis treatment: focus on active targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(10), pp.1141–1144. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2017.1372746>.

- Chronopoulou, L. et al., 2013. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, pp.310–317. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.063>.
- Clares, B. et al., 2012. Drug Delivery to Inflammation Based on Nanoparticles Surface Decorated with Biomolecules. *Current Medicinal Chemistry*, 19, pp.3203–3211.
- Costa, E., Arancibia, A. & Aiache, J.M., 2004. Sistemas matriciales. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(2), pp.259–265.
- Dhal, P.K., Gianolio, D.A. & Miller, R.J., 2012. Polymer Based Therapies for the Treatment of Chronic Pain. In *Pain Management - Current Issues and Opinions*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/pain-management-current-issues-and-opinions/polymer-based-therapies-for-the-treatment-of-chronic-pain>.
- Dolati, S. et al., 2016. ScienceDirect Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. , 80, pp.30–41.
- Van Essen, M. et al., 2006. Tyr 3] Octreotate in Patients with Paraganglioma , Melanoma. *The Journal of Nuclear Medicine*, 47(10), pp.1599–1606.
- Feldmann, M. et al., 2005. Anti-TNF therapy: Where have we got to in 2005? *Journal of Autoimmunity*, 25(SUPPL.), pp.26–28.
- Ferro-Flores, G. et al., 2015. Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (177)Lu and Conjugated to Peptides. *Current radiopharmaceuticals*, 8(2), pp.150–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771363>.
- Forrer, F. et al., 2005. Treatment with 177Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with 90Y-DOTATOC. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(8), pp.1310–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085587>.
- Gains, J.E. et al., 2011. 177Lu-DOTATATE Molecular Radiotherapy for Childhood

Neuroblastoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(7), pp.1041–1047.

Genç, L. & Büyüktiryaki, S., 2014. Preparation and characterization of methotrexate-loaded microcapsules. *Pharmaceutical Development and Technology*, 19(1), pp.42–47.

Gouveia, V.M. et al., 2015. Non-Biologic Nanodelivery Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Journal of biomedical nanotechnology*, 11(10), pp.1701–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502635>.

Higaki, M. et al., 2005. Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(8), pp.1132–1136.

Homma, A. et al., 2009. Novel hyaluronic acid-methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(13), pp.4647–4656.

Homma, A. et al., 2010. Synthesis and optimization of hyaluronic acid–methotrexate conjugates to maximize benefit in the treatment of osteoarthritis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(3), pp.1062–1075.

Horisawa, E. et al., 2002. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharmaceutical research*, 19(2), pp.132–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883639>.

Howie, D.W. et al., 1993. The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles. *Clinical orthopaedics and related research*, (292), pp.352–7.

Jaimes-Aguirre, L. et al., 2017. Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L-γ-glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. *Materials Science and Engineering C*, 76.

Jaimes-Aguirre, L. et al., 2016. Polymer-Based Drug Delivery Systems, Development and Pre-Clinical Status. *Current Pharmaceutical Design*, 22(19), pp.2886–2903.

- Kamat, M. et al., 2010. Hyaluronic Acid Immobilized Magnetic Nanoparticles for Active Targeting and Imaging of Macrophages. , pp.2128–2135.
- Khan, Z.A., Tripathi, R. & Mishra, B., 2012. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(2), pp.151–169. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2012.642362>.
- Kim, Y.J. et al., 2010. Ionic complex systems based on hyaluronic acid and PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand for treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials*, 31(34), pp.9057–9064.
- Klett, R. et al., 2007. Radiosynoviorthesis of medium-sized joints with rhenium-186-sulphide colloid: A review of the literature. *Rheumatology*, 46(10), pp.1531–1537.
- Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C.B., 2002. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*, 21(1), pp.15–23.
- Kunikowska, J. et al., 2011. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38(10), pp.1788–1797.
- Kuo, Y.C. & Yu, H.W., 2011. Transport of saquinavir across human brain-microvascular endothelial cells by poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface poly-(γ -glutamic acid). *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), pp.365–375.
- Kwekkeboom, D.J. et al., 2008. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate: Toxicity, efficacy, and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 26(13), pp.2124–2130.
- Lai, P. et al., 2014. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, pp.154–163. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514001374>.

- Lee, H., Ahn, C. & Park, T.G., 2009. Hyaluronic Acid Copolymer Micelle Nanoparticles for Target-Specific Delivery of Doxorubicin. , pp.336–342.
- Lee, S.M. et al., 2013. Targeted chemo-photothermal treatments of rheumatoid arthritis using gold half-shell multifunctional nanoparticles. *ACS Nano*, 7(1), pp.50–57.
- Liang, L.S. et al., 2009. Intra-articular treatment of inflammatory arthritis with microsphere formulations of methotrexate: pharmacokinetics and efficacy determination in antigen-induced arthritic rabbits. *Inflammation Research*, 58(8), pp.445–456. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-009-0009-7>.
- Liang, L.S. et al., 2004a. Methotrexate loaded poly(l-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4), pp.943–956.
- Liang, L.S. et al., 2004b. Methotrexate loaded poly(l-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4), pp.943–956. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916314745>.
- Liang, L.S., Wong, W. & Burt, H.M., 2005. Pharmacokinetic study of methotrexate following intra-articular injection of methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres in rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), pp.1204–1215.
- Luna-Gutiérrez, M. et al., 2013. A Therapeutic System of ¹⁷⁷Lu-labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells. *J. Mex. Chem. Soc.*, 57(3), pp.212–219.
- Marcados, R. & Lu, C.O.N., 2015. AVANCES EN LA DOSIMETRÍA INTERNA DE NUEVOS.
- Milenic, D.E. et al., 2002. In vivo comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with ¹⁷⁷Lu for radioimmunotherapeutic applications. *Nuclear Medicine and Biology*, 29(4), pp.431–442.

- Mitragotri, S. & Yoo, J., 2011. Designing Micro- and Nano-particles for Treating Rheumatoid Arthritis. , 34(11), pp.1887–1897.
- Mitragotri, S. & Yoo, J.W., 2011. Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Archives of Pharmacal Research*, 34(11), pp.1887–1897.
- Mödder, G., 2012. Radiosynoviorthesis (Radiation Synovectomy) of knee joint. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, 9783642024, pp.935–951.
- Mondalek, F.G. et al., 2010. Enhanced angiogenesis of modified porcine small intestinal submucosa with hyaluronic acid-poly (lactide- co -glycolide) nanoparticles : From fabrication to preclinical validation. , pp.712–719.
- Monopoli, M.P. et al., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), pp.779–786. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nnano.2012.207>.
- Muthu, M.S. & Singh, S., 2009. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine (London, England)*, 4(1), pp.105–118.
- Nahar, M. et al., 2006. 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v23.i4.10. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 23(4), pp.259–318.
- Nakashima-Matsushita, N. et al., 1999. Selective expression of folate receptor β and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 42(8), pp.1609–1616.
- Necas, J. et al., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), pp.397–411.
- Pandey, S. et al., 2017. Emerging role of CD44 receptor as a potential target in disease diagnosis: A patent review. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*, 11(2), pp.77–91.
- Pandey, S. et al., 2017. Emerging Role of CD44 Receptor as a Potential Target in Disease Diagnosis: A Patent Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug*

Discovery, 11(2). Available at: <http://www.eurekaselect.com/155399/article>.

Park, S.-N. et al., 2002. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23(4), pp.1205–1212.

Persson, M. et al., 2012. New peptide receptor radionuclide therapy of invasive cancer cells: In vivo studies using ¹⁷⁷Lu-DOTA-AE105 targeting uPAR in human colorectal cancer xenografts. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(7), pp.962–969.

Poh, S. et al., 2017. Folate-conjugated liposomes target and deliver therapeutics to immune cells in a rat model of rheumatoid arthritis. *Nanomedicine*, 12(20), pp.2441–2451. Available at: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2017-0166>.

Prabhu, R.H., Patravale, V.B. & Joshi, M.D., 2015. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.1001–1018.

Puig, L., 2014. Methotrexate: New Therapeutic Approaches. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 105(6), pp.583–589.

Rajagopalan, P.T.R. et al., 2002. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), pp.13481–6.

Rios de la Rosa, J.M. et al., 2017. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages. *Advanced Healthcare Materials*, 6(4), pp.1–11.

Senbanjo, L.T. & Chellaiah, M.A., 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00018/full>.

Senda, H. et al., 1999. Ultrastructural study of cells at the synovium-cartilage junction: response of synovial cells of the rat knee joint to intra-articularly injected latex particles.

Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy, 74(5), pp.525–35.

Shin, J.M. et al., 2014. A hyaluronic acid–methotrexate conjugate for targeted therapy of rheumatoid arthritis. *Chemical Communications*, 50(57), p.7632. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4cc02595d>.

Shinto, A.S. et al., 2015. Radiosynovectomy of Painful Synovitis of Knee Joints Due to Rheumatoid Arthritis by Intra-Articular Administration of Lu-Labeled Hydroxyapatite Particulates: First Human Study and Initial Indian Experience. *World Journal of Nuclear Medicine*, 14(2).

Smith, C.J. et al., 2003. Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH₂: An in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(2), pp.101–109.

Sparks, J.A. et al., 2017. Investigating methotrexate toxicity within a randomized double-blinded, placebo-controlled trial: Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial-Adverse Events (CIRT-AE) Study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(1), pp.133–142. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049017216304371>.

Stevanović, M.M., Jordović, B. & Uskoković, D.P., 2007. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007.

Tamura, T. et al., 2016a. Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee: efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), p.79.

Tamura, T. et al., 2016b. Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee: efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), p.79. Available at: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-0971-8>.

- Tian, Henghe, Cronstein, B.N., 2007. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), pp.168–173.
- Tian, H. & Cronstein, B.N., 2007. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), pp.168–173.
- Urquhart, J., 2001. Controlled drug delivery: Therapeutic and pharmacological aspects. *Journal of Internal Medicine, Supplement*, 249(741), pp.357–376.
- Vachon, E. et al., 2006. CD44 is a phagocytic receptor. *Blood*, 107(10), pp.4149–4158.
- Vangara, K.K., Liu, J.L. & Palakurthi, S., 2013. Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of sn-38 to ovarian cancer. *Anticancer Research*, 33(6), pp.2425–2434.
- Vilchis-Juárez, A. et al., 2014. Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(3).
- Villanueva Ramos, T. et al., 2012. Guía de práctica clínica para prevención y tratamiento de la radiodermatitis aguda. *Dermatol Rev Mex Volumen Dermatol Rev Mex*, 5656(11), pp.3–13.
- Wang, Y. et al., 2011. Combination of hyaluronic acid hydrogel scaffold and PLGA microspheres for supporting survival of neural stem cells. *Pharmaceutical Research*, 28(6), pp.1406–1414. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-011-0452-3>.
- Yadav, A.K. et al., 2007a. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(4), pp.246–257.
- Yadav, A.K. et al., 2007b. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored

PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(4), pp.246–257. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963407001244>.

Yang, M. et al., 2017. Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 252, pp.108–124.

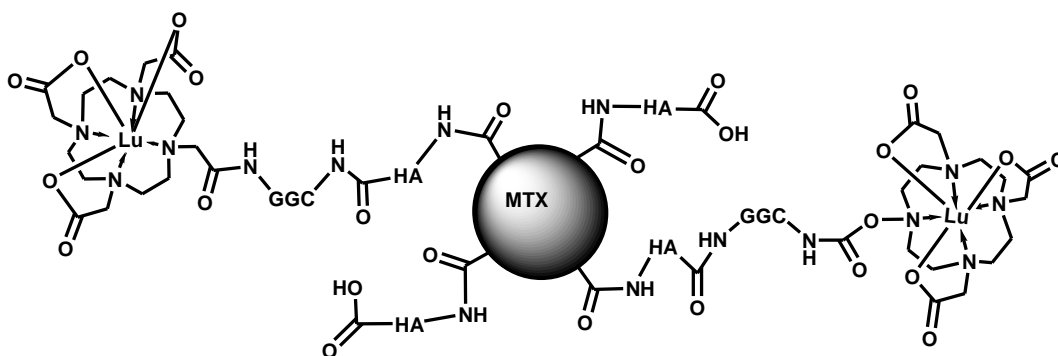
Zhu, H. et al., 2006. The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells*, 24(4), pp.928–935.

Zille, H. et al., 2010. Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. , 20, pp.235–242.

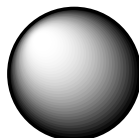
REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. Un radiofármaco heterofuncional como sistema de transporte y liberación de metotrexato (MTX) de la fórmula ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) para usarse como agente radioterapéutico y terapéutico de liberación controlada.

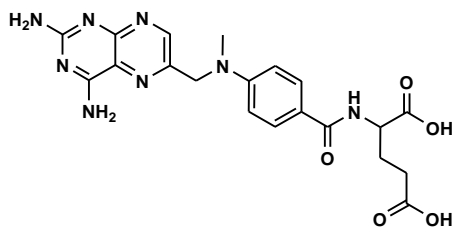


Donde las nanopartículas poliméricas de PLGA representadas como



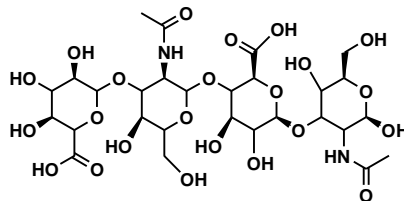
**PLGA: Ácido
poli(láctico-co-glicólico)**

Contienen en su interior el agente quimioterapéutico metotrexato (MTX)



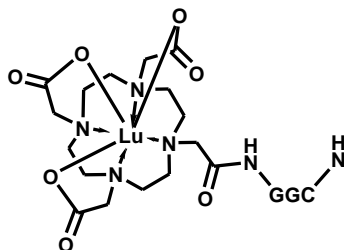
Metotrexato

y en su superficie se encuentran funcionalizadas con moléculas de ácido hialurónico representado como HA:



) **HA; Ácido Hialurónico**

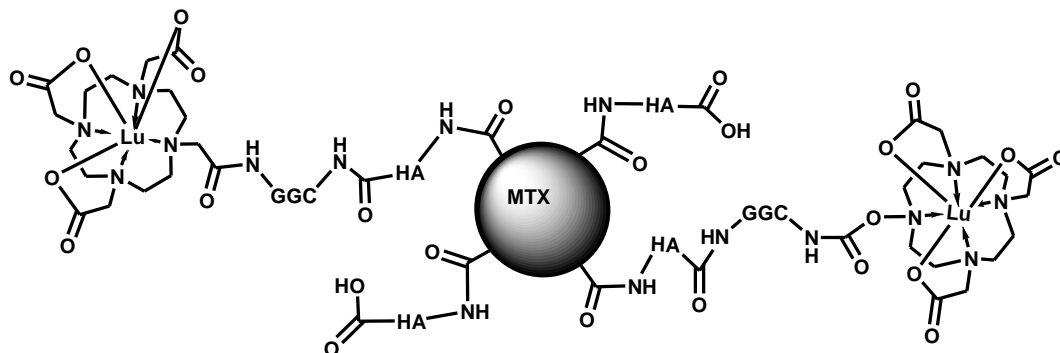
y ^{177}Lu -1,4,7,10-tetraazaciclododecil-N,N',N'',N'''-tetraacetil-Gly-Gly-Cys-NH₂ representado como:



en donde el -NH terminal es el sitio de unión a las nanopartículas de PLGA.

2. Una composición química caracterizada, como la que se reclama en la reivindicación número uno que consta de:
 - a. Nanopartículas poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) conteniendo en su interior el agente quimioterapéutico metrotexato.
 - b. Moléculas de ácido hialurónico (HA) y Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético-Gly-Gly-Cys-NH₂ en su superficie.

c. ^{177}Lu como un radionúclido emisor de partículas β^-



3. Una composición radiofarmacéutica como la que se reclama en la reivindicación número 1 para ser usada como un agente quimioterapéutico y radioterapéutico en procesos inflamatorios que generan sobre-expresión del receptor CD44.

RESUMEN

Esta invención se refiere a un nuevo agente terapéutico dual quimioterapia/radioterapia (Metotrexato/¹⁷⁷Lu) que está diseñado como un sistema de transporte y liberación de metotrexato (MTX), preparado a partir de nanopartículas poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) conjugadas con ácido hialurónico (HA) como ligando específico de direccionamiento para los receptores CD44 sobre-expresados en células inflamatorias como los macrófagos, y radiomarcado con Lu-177. El nuevo agente quimioterapéutico/radioterapéutico ¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX) presenta demostrada captación específica e internalización celular, con un adecuado perfil citotóxico *in vitro*.

El objeto de esta invención es proporcionar un nuevo agente quimioterapéutico/radioterapéutico (Metotrexato/¹⁷⁷Lu) de administración intraarticular que pueda ser captado e internalizado específicamente por células que sobre-expresen el receptor CD44, como es el caso de macrófagos activados presentes en enfermedades articulares crónico degenerativas, como la artritis reumatoide (AR).

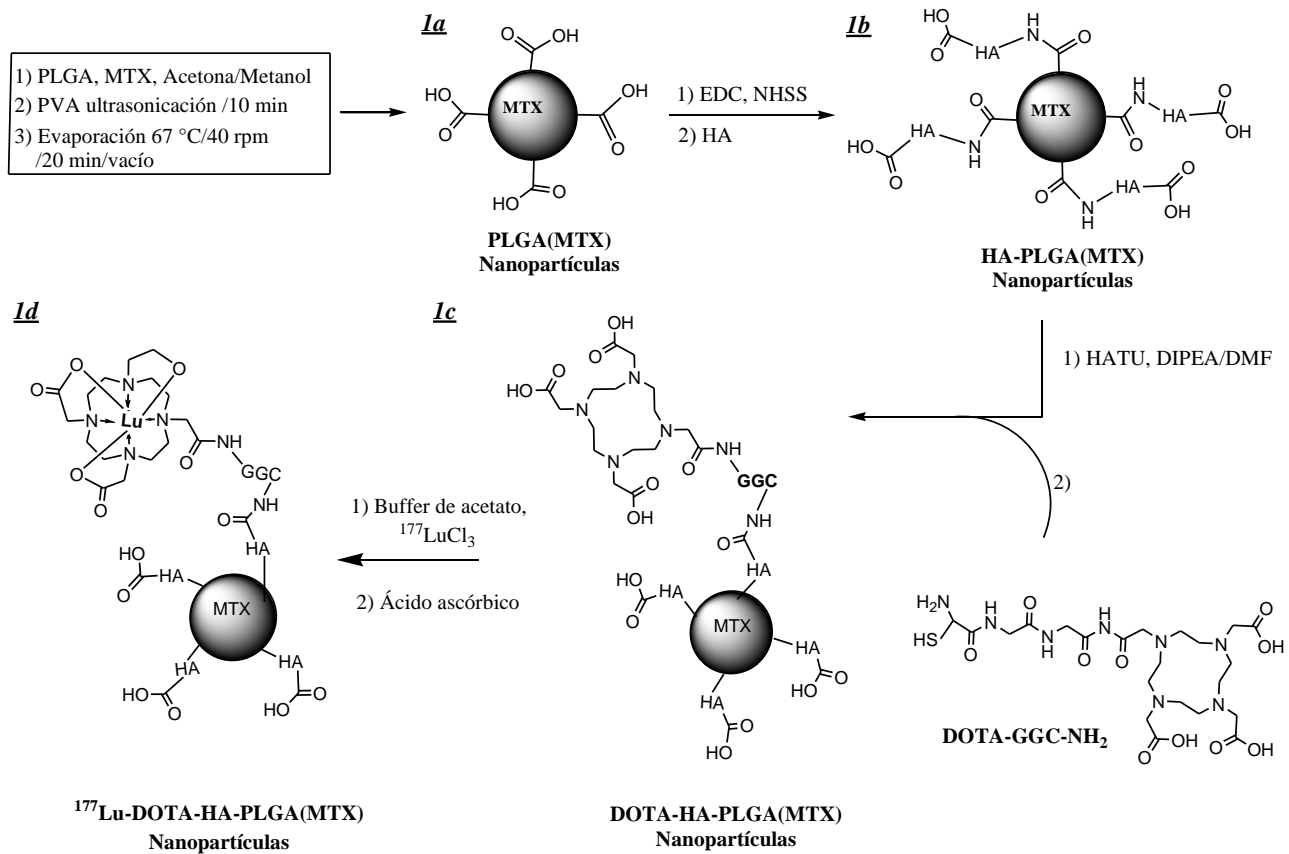


Figura 1

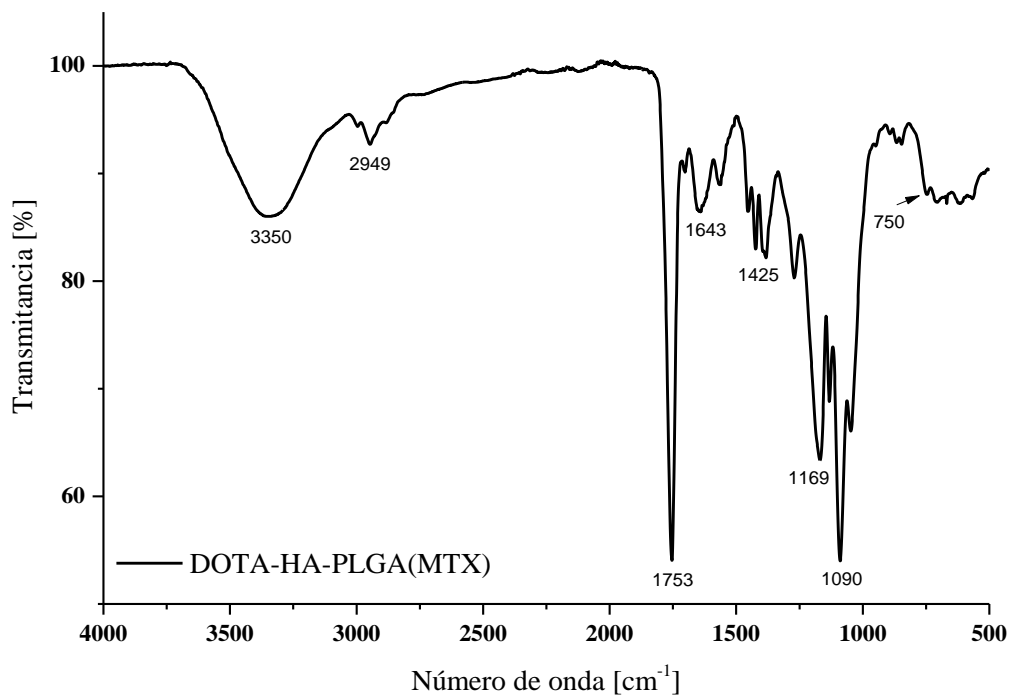


Figura 2

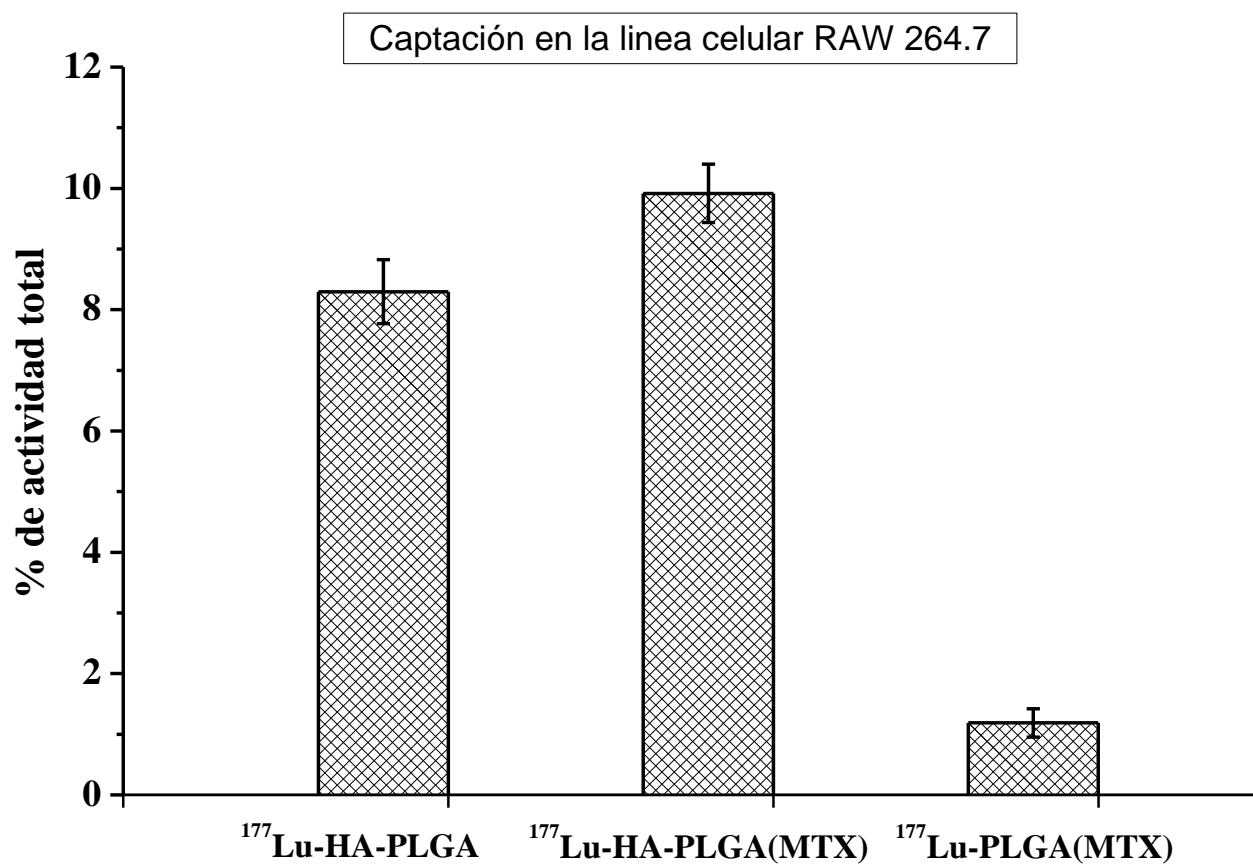


Figura 3

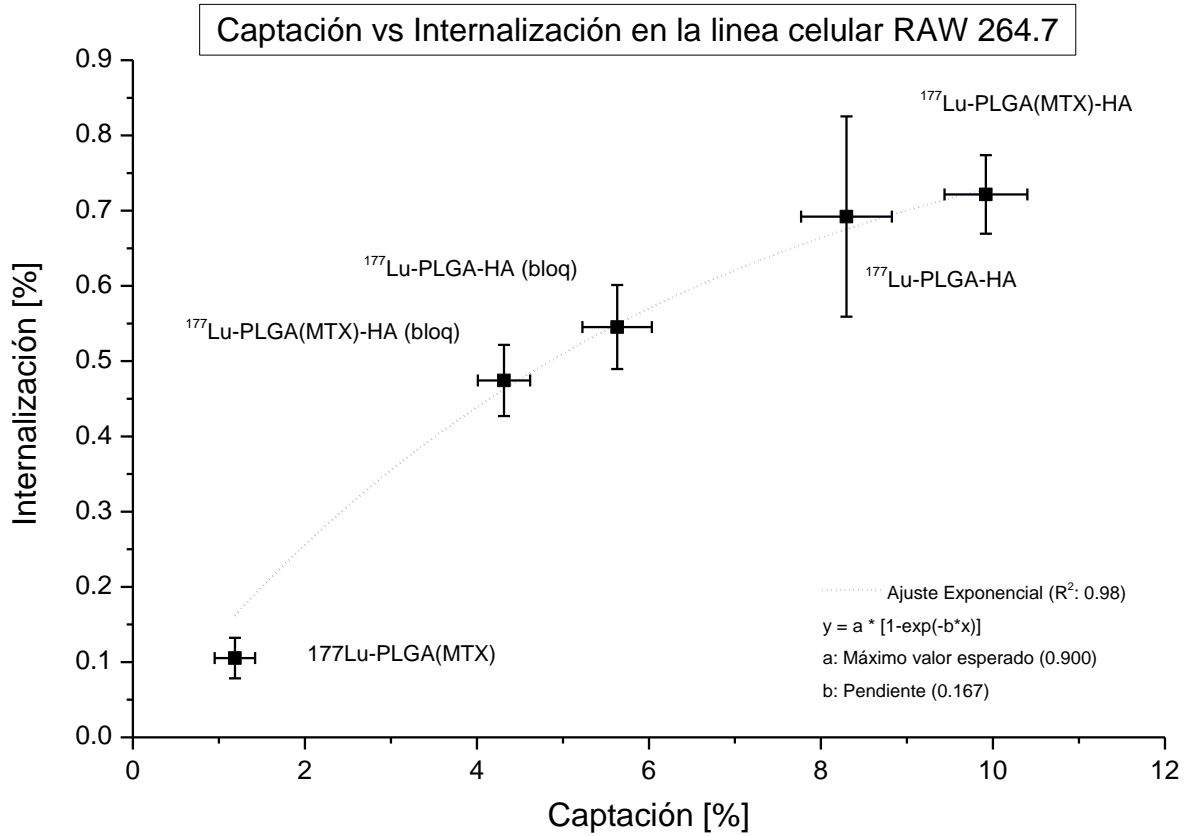


Figura 4

Resultados no publicados

SEM (Microscopia electrónica de barrido)

El tamaño y la forma de los sistemas nanoparticulados se evaluaron con un microscopio JEOL JSM 6510LV que opera a 20 kV, utilizando señales de electrones secundarios. Las muestras liofilizadas se recubrieron durante 50 segundos con una capa de oro (15 nm) usando un sistema Denton Vacuum DESK IV.

Las micrografías de nanopartículas DOTA-HA-PLGA (figura 1a) y HA-PLGA(MTX) (figura 1b) muestran una forma esférica y una correlación con el tamaño obtenido por DLS, así como una distribución homogénea de ambos sistemas.

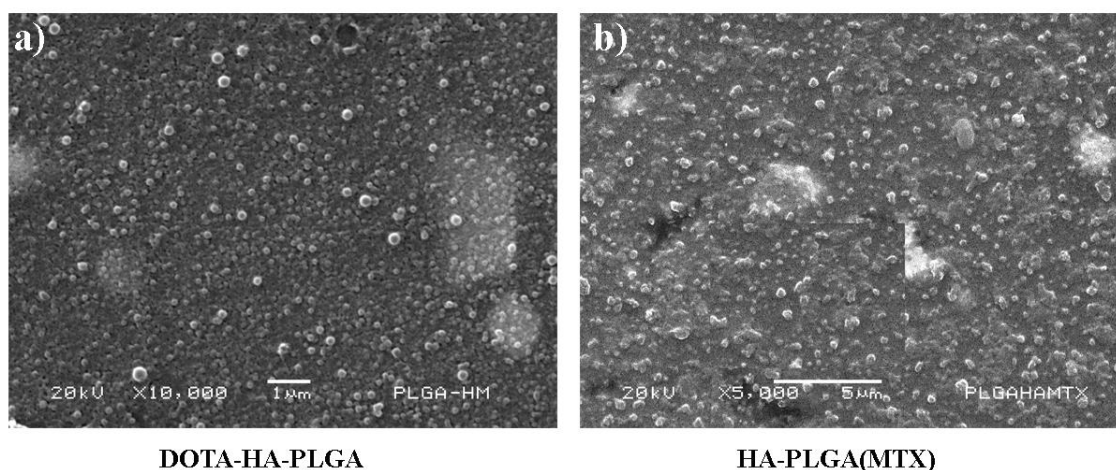


Figura 1. Micrografías de a) nanopartículas de DOTA-HA-PLGA y b) nanopartículas de HA-PLGA(MTX).

Espectroscopia FT-IR

Los espectros IR de la materia prima y muestras liofilizadas se obtuvieron con un espectrómetro PerkinElmer System 2000 con una plataforma ATR (Pike Technologies), mediante la técnica de espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FT-IR). Los espectros se realizaron con 40 exploraciones entre el rango de operación de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ y la resolución de $0,4 \text{ cm}^{-1}$.

El espectro de las nanopartículas de PLGA (ver figura 1a) muestra bandas características de la matriz polimérica y del núcleo estabilizado con PVA (Stevanović et al. 2007), mientras que las nanopartículas de PLGA cargadas con MTX (ver figura 1c) mostraron señales que evidencian de su atrapamiento. En 3272 cm^{-1} aparece una banda intensa que corresponde a la contribución de los grupos $(\text{OH})_v$ y $(\text{NH})_v$ de las nanopartículas de PLGA y de la amina primaria del MTX (ver figura 1b), respectivamente; las bandas en 2916 y 2846 cm^{-1} se atribuyen a enlaces $(\text{CH})_v$ que corresponden a las interacciones entre el esqueleto carbonado del polímero de PLGA y el MTX, una modificación significativa de la vibración correspondiente al enlace $(\text{C}=\text{O})_v$ del carbonilo con un desplazamiento de 1753 a 1722 cm^{-1} sugiere una fuerte interacción entre el MTX y la matriz polimérica de la nanopartícula, además se observaron señales características adicionales en 1422 cm^{-1} correspondiente a $(\text{CN})_v$, 1366 cm^{-1} $(\text{CC})_v$, $(\text{CO})_v$ y $(\text{OH})_\delta$ del MTX y en 1240 cm^{-1} aparece una señal asignada a $(\text{CH})_\delta$. Finalmente, también se observan en 1087 y 1049 cm^{-1} bandas correspondientes a $(\text{C-O})_v$.

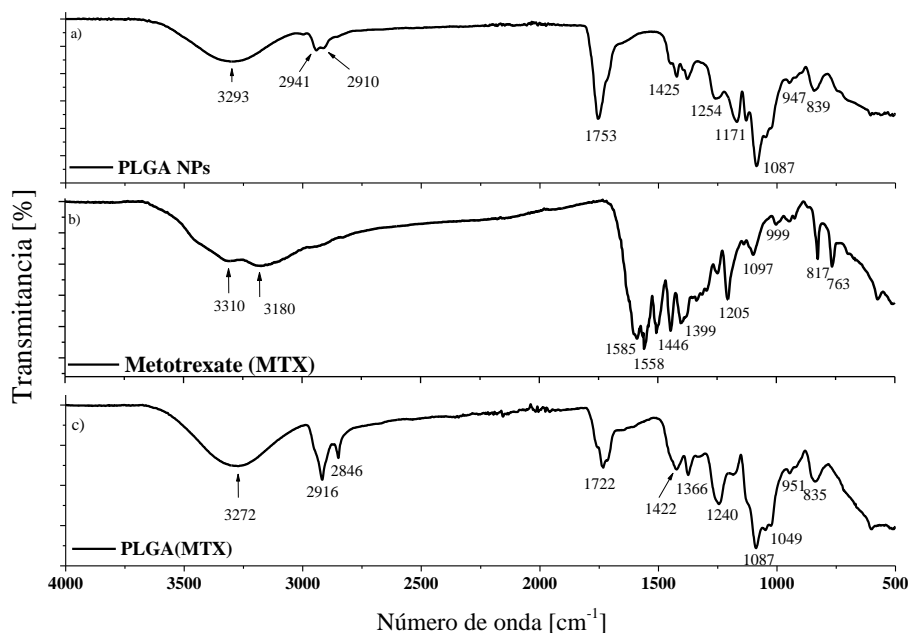


Figura 1. Espectros FT-IR de a) nanopartículas de PLGA, b) Metotrexato (MTX) y c) nanopartículas de PLGA cargadas con metotrexato.

La modificación de la superficie de las nanopartículas de PLGA con HA (ver figura 2c) mediante una reacción con carbodiimida se confirmó debido a la presencia de bandas características que sugieren la formación del enlace amida ausente en las nanopartículas de PLGA. Los espectros de la materia prima fueron consistentes con el análisis previamente informado (Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies Alkrad et al. 2003), el espectro de nanopartículas de HA-PLGA mostró bandas características, sin embargo se observó un aumento significativo en la intensidad de la banda a 3286 cm^{-1} correspondiente a la superposición entre la vibración (NH) de la molécula de ácido hialurónico y (OH)_v de las nanopartículas de PLGA, aunque también es posible una contribución adicional debido al aumento de la unión de H del plegamiento superficial.

A 2923 cm^{-1} se observó una banda bien diferenciada de cadenas alifáticas (C-H)_v. En 1729 y 1638 cm^{-1} se observaron bandas características de (C = O)_v del grupo éster con contribución de (C-N)_v de la amida I, estas bandas sugieren la formación de un enlace covalente entre PLGA y HA. A 1422 cm^{-1} aparece una banda correspondiente a (NH)_δ y (CN)_v de amida III, en 1366 cm^{-1} se observa la banda correspondiente a (CC)_v, (CO)_v y (CH)_δ, con combinación C = O (Barth 2007b; Stevanović et al. 2007; Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies Alkrad et al. 2003). Finalmente, las bandas a 1240 , 1085 , 1023 y 835 cm^{-1} corresponden a (C-H)_δ. Adicionalmente, se encontraron modos de vibración característicos específicamente de HA (ver figura 2b) a 1561 cm^{-1} correspondientes a (N-H)_δ y (C-N)_v en la región de amida II. De acuerdo con la evidencia observada, sugerimos que la modificación de la superficie de la nanopartícula de PLGA con HA resulta de interacciones complejas impulsadas principalmente por interacciones covalentes, unión a H e hidrófilas.

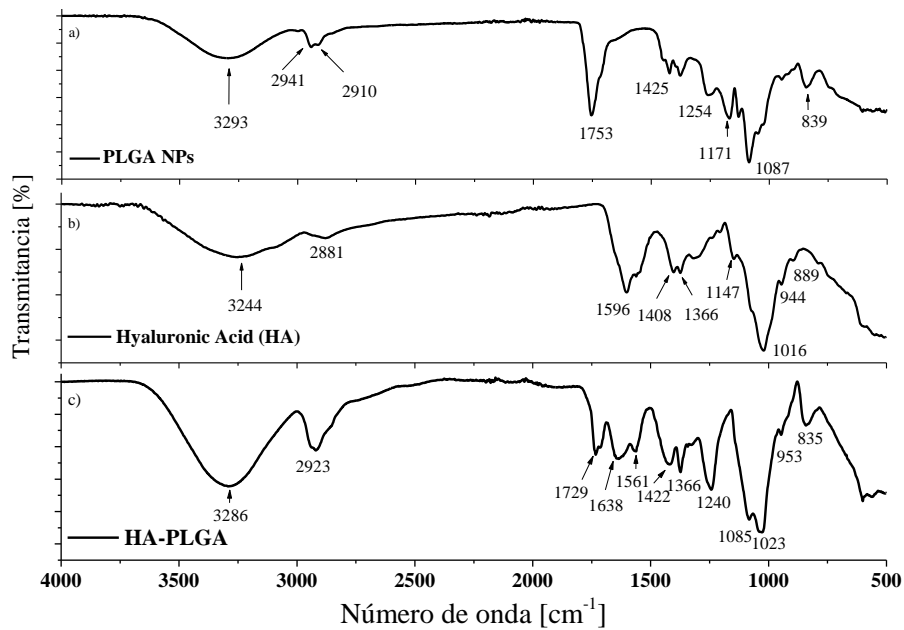


Figura 2. Espectros FT-IR de a) nanopartículas de PLGA, b) Ácido hialurónico (HA) y c) nanopartículas de HA-PLGA.

9. CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo de este trabajo se basó en preparar, caracterizar y evaluar el sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA modificadas con ácido hialurónico y radiomarcadas con Lu¹⁷⁷, para el transporte y liberación controlada de metotrexato ¹⁷⁷Lu-DOTA-HA-PLGA(MTX).

Para tal objetivo se prepararon y caracterizaron nanopartículas de PLGA empleando el método de emulsificación- evaporación del disolvente, un método ampliamente utilizado para la obtención de nanopartículas poliméricas. Se obtuvieron nanopartículas esféricas con tamaño aproximado de 152.9 por DLS y menores a 200 nm por SEM con distribuciones homogéneas. La encapsulación de metotrexato (MTX) en la matriz polimérica de PLGA se realizó empleando el mismo método y se obtuvieron eficiencias de encapsulado y de carga de 95.2 % y 6 % respectivamente.

La conjugación del ácido hialurónico (HA) y del agente quelante DOTA a la superficie de las nanopartículas de PLGA(MTX), se realizó exitosamente mediante una reacción con carbodiimida y HATU respectivamente, en donde ambas técnicas permiten la formación de enlaces amida a partir de ácidos carboxílicos activados y aminas primarias. Se comprobó la conjugación mediante técnicas de espectroscopía FT-IR y UV-Vis, en donde se pudieron apreciar las vibraciones correspondientes a los enlaces amida formados por la unión entre las cadenas de PLGA y el HA, así como señales del agente quelante; por otra parte absorbancias localizadas en el rango de 250 a 280 nm y a 304 nm correspondientes a HA, DOTA y MTX respectivamente, demostraron la formación exitosa del sistema DOTA-HA-PLGA(MTX).

El marcaje con ¹⁷⁷Lu al sistema DOTA-HA-PLGA(MTX) se realizó en medio acuoso a pH 7.0 obteniendo una pureza radioquímica de $96 \pm 2\%$ mediante ITLC.

El perfil de liberación del sistema de nanopartículas HA-PLGA(MTX) mostró una respuesta a favor de condiciones de pH ácido (5.3). Este comportamiento responde a las características propias de los polímeros utilizados PLGA y HA ya que en condiciones ácidos tienden a degradarse y por lo tanto se promueve la liberación del fármaco.

Finalmente la evaluación biológica del sistema ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) fue evaluado en células RAW 264.7 mostrando efectos citotóxicos y de captación específica a través de mecanismo de endocitosis mediada por receptores, al comparar células cuyos receptores fueron bloqueados con aquellas donde los receptores se encontraban libres.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el sistema de nanopartículas ^{177}Lu -DOTA-HA-PLGA(MTX) es un sistema potencial de transporte y liberación dirigida de MTX, a través del reconocimiento molecular de receptores de CD44 sobreexpresados en células como macrófagos presentes en enfermedades articulares crónico degenerativas, como la artritis reumatoide (AR), así como un efecto citotóxico aditivo de radio y quimioterapia, lo que lo vuelve un candidato adecuado para aplicaciones terapéuticas futuras.

10. PERSPECTIVAS

Los sistemas de nanopartículas poliméricas como el propuesto en este trabajo, brindan la posibilidad de encapsular diferentes fármacos, hacer modificaciones superficiales y mejorar con esto la efectividad del tratamiento al disminuir efectos secundarios no deseados, mejorando la entrega del fármaco a sitios específicos y en este caso generar daño combinado entre radiación y quimioterapia.

Finalmente, el siguiente paso para este proyecto es la evaluación *in vivo*, con el fin de establecer los parámetros farmacocinéticos en el organismo.

11. REFERENCIAS

- Abbasi, I.A., 2012. Preliminary studies on ^{177}Lu -labeled sodium pyrophosphate (^{177}Lu -PYP) as a potential bone-seeking radiopharmaceutical for bone pain palliation. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(6), pp.763–769.
- Abolmaali, S.S., Tamaddon, A.M. & Dinarvand, R., 2013. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(5), pp.1115–1130. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-012-2062-0>.
- Aletaha, D. et al., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), pp.2569–2581.
- Alkrad, J.A. et al., 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), pp.545–550.
- Aranda-Lara, L. et al., 2016. Synthesis and evaluation of Lys 1 (α,γ -Folate)Lys 3 (^{177}Lu -DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer. *Applied Radiation and Isotopes*, 107, pp.214–219. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804315302244>.
- Ayyappan, S. et al., 2010. Molecular structure, vibrational spectra and DFT molecular orbital calculations (TD-DFT and NMR) of the antiproliferative drug Methotrexate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(1), pp.264–275. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142510002726>.
- B, I.T.B.M. & E, I.A.P.F., 2006. Perfiles de Dosis Absorbida vs Profundidad de Tejido Sinovial para El Y-90 y El P-32 Empleados en Tratamiento de Radiosinoviortesis. , pp.1–11.
- Banerjee, S., Pillai, M.R.A. & Knapp, F.F. (Russ), 2015. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chemical Reviews*, 115(8), pp.2934–2974. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500171e>.
- Barth, A., 2007a. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), pp.1073–1101. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272807001375>.
- Barth, A., 2007b. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), pp.1073–1101.
- Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P., 2012. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp.24–36. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>.

Burt, H.M. et al., 2009. Intra-articular drug delivery systems: overcoming the shortcomings of joint disease therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1), pp.17–26. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425240802647259>.

Chakraborty, S. et al., 2014. Preparation, evaluation, and first clinical use of ¹⁷⁷Lu-labeled hydroxyapatite (HA) particles in the treatment of rheumatoid arthritis: utility of cold kits for convenient dose formulation at hospital radiopharmacy. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 57(7), pp.453–462. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3202>.

Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies Alkrad, J.A. et al., 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), pp.545–550.

Chen, B., Miller, R.J. & Dhal, P.K., 2014. Hyaluronic acid-based drug conjugates: state-of-the-art and perspectives. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(1), pp.4–16.

Chen, M. et al., 2017. Advanced nanomedicine for rheumatoid arthritis treatment: focus on active targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(10), pp.1141–1144. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2017.1372746>.

Chronopoulou, L. et al., 2013. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, pp.310–317. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.063>.

Clares, B. et al., 2012. Drug Delivery to Inflammation Based on Nanoparticles Surface Decorated with Biomolecules. *Current Medicinal Chemistry*, 19, pp.3203–3211.

Costa, E., Arancibia, A. & Aiache, J.M., 2004. Sistemas matriciales. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(2), pp.259–265.

Dhal, P.K., Gianolio, D.A. & Miller, R.J., 2012. Polymer Based Therapies for the Treatment of Chronic Pain. In *Pain Management - Current Issues and Opinions*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/pain-management-current-issues-and-opinions/polymer-based-therapies-for-the-treatment-of-chronic-pain>.

Dolati, S. et al., 2016. ScienceDirect Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. , 80, pp.30–41.

Van Essen, M. et al., 2006. Tyr 3] Octreotate in Patients with Paraganglioma , Melanoma. *The Journal of Nuclear Medicine*, 47(10), pp.1599–1606.

Feldmann, M. et al., 2005. Anti-TNF therapy: Where have we got to in 2005? *Journal of Autoimmunity*, 25(SUPPL.), pp.26–28.

Ferro-Flores, G. et al., 2015. Theranostic Radiopharmaceuticals Based on Gold Nanoparticles Labeled with (¹⁷⁷)Lu and Conjugated to Peptides. *Current*

radiopharmaceuticals, 8(2), pp.150–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771363>.

- Forrer, F. et al., 2005. Treatment with ¹⁷⁷Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with ⁹⁰Y-DOTATOC. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(8), pp.1310–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085587>.
- Gains, J.E. et al., 2011. ¹⁷⁷Lu-DOTATATE Molecular Radiotherapy for Childhood Neuroblastoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(7), pp.1041–1047.
- Genç, L. & Büyüktiryaki, S., 2014. Preparation and characterization of methotrexate-loaded microcapsules. *Pharmaceutical Development and Technology*, 19(1), pp.42–47.
- Gouveia, V.M. et al., 2015. Non-Biologic Nanodelivery Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Journal of biomedical nanotechnology*, 11(10), pp.1701–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502635>.
- Higaki, M. et al., 2005. Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(8), pp.1132–1136.
- Homma, A. et al., 2009. Novel hyaluronic acid-methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(13), pp.4647–4656.
- Homma, A. et al., 2010. Synthesis and optimization of hyaluronic acid–methotrexate conjugates to maximize benefit in the treatment of osteoarthritis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(3), pp.1062–1075.
- Horisawa, E. et al., 2002. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharmaceutical research*, 19(2), pp.132–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883639>.
- Howie, D.W. et al., 1993. The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles. *Clinical orthopaedics and related research*, (292), pp.352–7.
- Jaimes-Aguirre, L. et al., 2017. Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L-γ-glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. *Materials Science and Engineering C*, 76.
- Jaimes-Aguirre, L. et al., 2016. Polymer-Based Drug Delivery Systems, Development and Pre-Clinical Status. *Current Pharmaceutical Design*, 22(19), pp.2886–2903.
- Kamat, M. et al., 2010. Hyaluronic Acid Immobilized Magnetic Nanoparticles for Active Targeting and Imaging of Macrophages. , pp.2128–2135.
- Khan, Z.A., Tripathi, R. & Mishra, B., 2012. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(2), pp.151–169.

Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2012.642362>.

- Kim, Y.J. et al., 2010. Ionic complex systems based on hyaluronic acid and PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand for treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials*, 31(34), pp.9057–9064.
- Klett, R. et al., 2007. Radiosynoviorthesis of medium-sized joints with rhenium-186-sulphide colloid: A review of the literature. *Rheumatology*, 46(10), pp.1531–1537.
- Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C.B., 2002. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*, 21(1), pp.15–23.
- Kunikowska, J. et al., 2011. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38(10), pp.1788–1797.
- Kuo, Y.C. & Yu, H.W., 2011. Transport of saquinavir across human brain-microvascular endothelial cells by poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface poly-(γ -glutamic acid). *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), pp.365–375.
- Kwekkeboom, D.J. et al., 2008. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177Lu- DOTA0,Tyr3]octreotate: Toxicity, efficacy, and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 26(13), pp.2124–2130.
- Lai, P. et al., 2014. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, pp.154–163. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514001374>.
- Lee, H., Ahn, C. & Park, T.G., 2009. Hyaluronic Acid Copolymer Micelle Nanoparticles for Target-Specific Delivery of Doxorubicin. , pp.336–342.
- Lee, S.M. et al., 2013. Targeted chemo-photothermal treatments of rheumatoid arthritis using gold half-shell multifunctional nanoparticles. *ACS Nano*, 7(1), pp.50–57.
- Liang, L.S. et al., 2009. Intra-articular treatment of inflammatory arthritis with microsphere formulations of methotrexate: pharmacokinetics and efficacy determination in antigen-induced arthritic rabbits. *Inflammation Research*, 58(8), pp.445–456. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-009-0009-7>.
- Liang, L.S. et al., 2004a. Methotrexate loaded poly(l-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4), pp.943–956.
- Liang, L.S. et al., 2004b. Methotrexate loaded poly(l-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4), pp.943–956. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916314745>.

- Liang, L.S., Wong, W. & Burt, H.M., 2005. Pharmacokinetic study of methotrexate following intra-articular injection of methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres in rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), pp.1204–1215.
- Luna-Gutiérrez, M. et al., 2013. A Therapeutic System of ¹⁷⁷Lu-labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells. *J. Mex. Chem. Soc.*, 57(3), pp.212–219.
- Marcados, R. & Lu, C.O.N., 2015. AVANCES EN LA DOSIMETRÍA INTERNA DE NUEVOS.
- Milenic, D.E. et al., 2002. In vivo comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with ¹⁷⁷Lu for radioimmunotherapeutic applications. *Nuclear Medicine and Biology*, 29(4), pp.431–442.
- Mitragotri, S. & Yoo, J., 2011. Designing Micro- and Nano-particles for Treating Rheumatoid Arthritis. , 34(11), pp.1887–1897.
- Mitragotri, S. & Yoo, J.W., 2011. Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Archives of Pharmacol Research*, 34(11), pp.1887–1897.
- Mödder, G., 2012. Radiosynoviorthesis (Radiation Synovectomy) of knee joint. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, 9783642024, pp.935–951.
- Mondalek, F.G. et al., 2010. Enhanced angiogenesis of modified porcine small intestinal submucosa with hyaluronic acid-poly (lactide- co -glycolide) nanoparticles : From fabrication to preclinical validation. , pp.712–719.
- Monopoli, M.P. et al., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), pp.779–786. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nnano.2012.207>.
- Muthu, M.S. & Singh, S., 2009. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine (London, England)*, 4(1), pp.105–118.
- Nahar, M. et al., 2006. 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v23.i4.10. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 23(4), pp.259–318.
- Nakashima-Matsushita, N. et al., 1999. Selective expression of folate receptor β and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 42(8), pp.1609–1616.
- Necas, J. et al., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), pp.397–411.
- Pandey, S. et al., 2017. Emerging role of CD44 receptor as a potential target in disease diagnosis: A patent review. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*, 11(2), pp.77–91.

- Pandey, S. et al., 2017. Emerging Role of CD44 Receptor as a Potential Target in Disease Diagnosis: A Patent Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 11(2). Available at: <http://www.eurekaselect.com/155399/article>.
- Park, S.-N. et al., 2002. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23(4), pp.1205–1212.
- Persson, M. et al., 2012. New peptide receptor radionuclide therapy of invasive cancer cells: In vivo studies using ¹⁷⁷Lu-DOTA-AE105 targeting uPAR in human colorectal cancer xenografts. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(7), pp.962–969.
- Poh, S. et al., 2017. Folate-conjugated liposomes target and deliver therapeutics to immune cells in a rat model of rheumatoid arthritis. *Nanomedicine*, 12(20), pp.2441–2451. Available at: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nmm-2017-0166>.
- Prabhu, R.H., Patravale, V.B. & Joshi, M.D., 2015. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.1001–1018.
- Puig, L., 2014. Methotrexate: New Therapeutic Approaches. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 105(6), pp.583–589.
- Rajagopalan, P.T.R. et al., 2002. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), pp.13481–6.
- Rios de la Rosa, J.M. et al., 2017. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages. *Advanced Healthcare Materials*, 6(4), pp.1–11.
- Senbanjo, L.T. & Chellaiah, M.A., 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00018/full>.
- Senda, H. et al., 1999. Ultrastructural study of cells at the synovium-cartilage junction: response of synovial cells of the rat knee joint to intra-articularly injected latex particles. *Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy*, 74(5), pp.525–35.
- Shin, J.M. et al., 2014. A hyaluronic acid–methotrexate conjugate for targeted therapy of rheumatoid arthritis. *Chemical Communications*, 50(57), p.7632. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4cc02595d>.
- Shinto, A.S. et al., 2015. Radiosynovectomy of Painful Synovitis of Knee Joints Due to Rheumatoid Arthritis by Intra-Articular Administration of Lu-Labeled Hydroxyapatite Particulates: First Human Study and Initial Indian Experience. *World Journal of Nuclear Medicine*, 14(2).
- Smith, C.J. et al., 2003. Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-

- 14]NH₂: An in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(2), pp.101–109.
- Sparks, J.A. et al., 2017. Investigating methotrexate toxicity within a randomized double-blinded, placebo-controlled trial: Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial-Adverse Events (CIRT-AE) Study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(1), pp.133–142. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049017216304371>.
- Stevanović, M.M., Jordović, B. & Uskoković, D.P., 2007. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007.
- Tamura, T. et al., 2016a. Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee: efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), p.79.
- Tamura, T. et al., 2016b. Novel hyaluronic acid–methotrexate conjugate suppresses joint inflammation in the rat knee: efficacy and safety evaluation in two rat arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), p.79. Available at: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-0971-8>.
- Tian, Henghe, Cronstein, B.N., 2007. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), pp.168–173.
- Tian, H. & Cronstein, B.N., 2007. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), pp.168–173.
- Urquhart, J., 2001. Controlled drug delivery: Therapeutic and pharmacological aspects. *Journal of Internal Medicine, Supplement*, 249(741), pp.357–376.
- Vachon, E. et al., 2006. CD44 is a phagocytic receptor. *Blood*, 107(10), pp.4149–4158.
- Vangara, K.K., Liu, J.L. & Palakurthi, S., 2013. Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of sn-38 to ovarian cancer. *Anticancer Research*, 33(6), pp.2425–2434.
- Vilchis-Juárez, A. et al., 2014. Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(3).
- Villanueva Ramos, T. et al., 2012. Guía de práctica clínica para prevención y tratamiento de la radiodermatitis aguda. *Dermatol Rev Mex Volumen Dermatol Rev Mex*, 5656(11), pp.3–13.
- Wang, Y. et al., 2011. Combination of hyaluronic acid hydrogel scaffold and PLGA

microspheres for supporting survival of neural stem cells. *Pharmaceutical Research*, 28(6), pp.1406–1414. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-011-0452-3>.

Yadav, A.K. et al., 2007a. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(4), pp.246–257.

Yadav, A.K. et al., 2007b. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(4), pp.246–257. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963407001244>.

Yang, M. et al., 2017. Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 252, pp.108–124.

Zhu, H. et al., 2006. The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells*, 24(4), pp.928–935.

Zille, H. et al., 2010. Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. , 20, pp.235–242.