Terapia por Captura Neutrónica en Boro

Aspectos Interdisciplinarios para la Concreción de una Radioterapia Selectiva

Química del boro en BNCT

Bioq. Susana Isabel Nievas

Departamento Coordinación BNCT
GAATEN-CNEA
nievas@cnea.gov.ar

Mayo de 2018

¿Por qué el boro?

Hay una gran cantidad de **nucleídos** que tienen **mayor capacidad** que otros para **absorber neutrones térmicos**, de energías menores a 0,0025 KeV. Esta propiedad es la **sección eficaz de captura neutrónica** (σ). Como ejemplo podemos citar ^{3}He, ^{6}Li, ^{10}B, ^{157}Gd, ^{135}Xe y ^{149}Sm, entre otros.

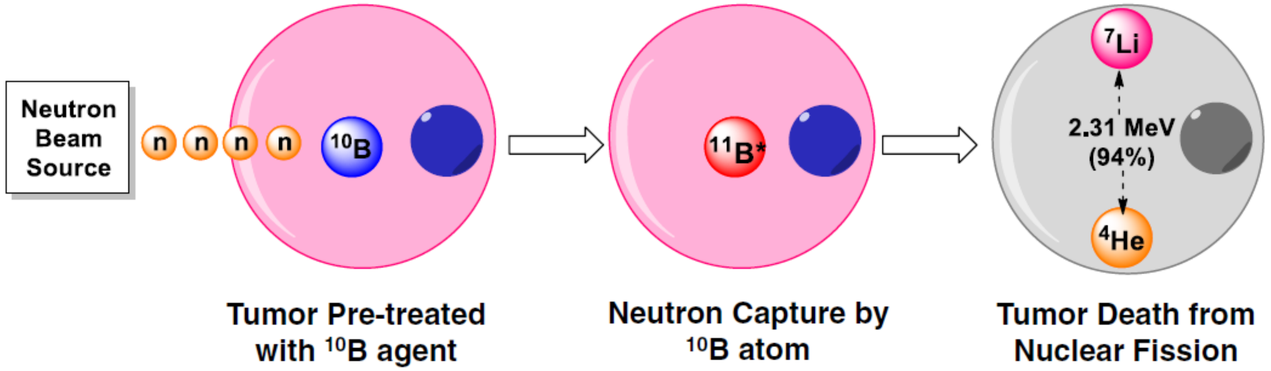
nuclide	cross section capture value[a]	nuclide	cross section capture value[a]
^{6}Li	942	H	0.332
^{10}B	3838	C	0.0037
^{113}Cd	20,000	N	1.75
^{135}Xe	2,720,000	O	<0.0002
^{149}Sm	41,500	P	0.19
^{151}Eu	59,002	S	0.52
^{157}Gd	240,000	Na	0.536
^{174}Hf	400	K	2.07

[a]Cross section capture values in barns.

¿Por qué el boro?

- El ^{10}B **no es radiactivo.**
- Está fácilmente **disponible** (es casi el 20% del boro natural).
- Las partículas emitidas por la reacción de captura $^{10}B(n, a)\ ^{7}Li$ son **de alta transferencia lineal de energía** (LET).
- Sus **trayectorias son de entre 5-9 µm**, (**diámetro de una célula).**
- El efecto de la irradiación se limita a las **células tumorales que hayan captado** suficiente cantidad de ^{10}B sin causar daño al tejido normal circundante.

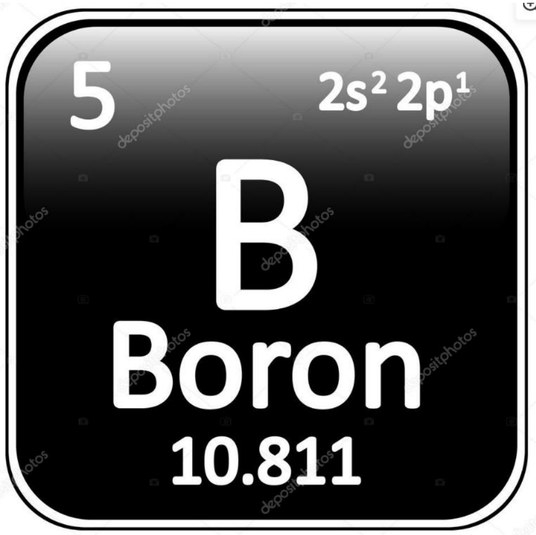
Fig. 1 Schematic representation of tumor destruction by BNCT.



Pharm Res (2015) 32:2824–2836

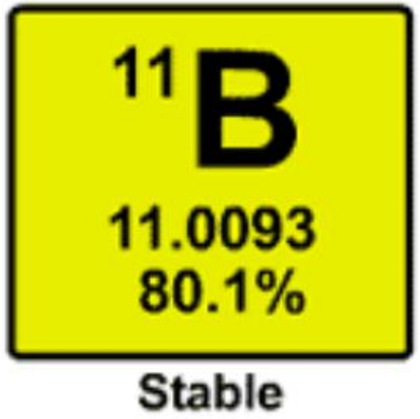
El boro (B):

- Elemento químico con **número atómico 5 en el grupo 13 y el período 2** de la tabla periódica.
- Es un **metaloide propenso a formar compuestos moleculares covalentes** similares a los que forma el carbono (C).
- El boro y el carbono son los únicos dos elementos capaces de generar **familias de compuestos químicos uniéndose a ellos mismos o a otros**.
- La química del boro permite que sea incorporado en **muchas estructuras diferentes.**
- Aunque es común en forma de ácido bórico en rocas, aguas subterráneas, aguas superficiales y plantas, **no está presente en el cuerpo humano**.



El boro (B):

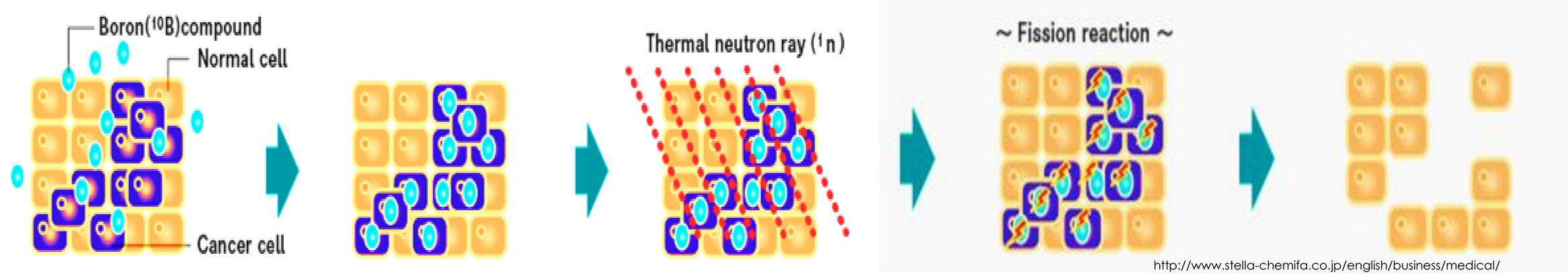
- El **boro natural existe en dos isótopos: ^{10}B y ^{11}B** en una proporción de aproximadamente **1: 4**
- Solo el **^{10}B es capaz de capturar neutrones térmicos**.
- Se necesita ^{10}B de alta pureza (^{10}B enriquecido) como materia prima para fabricar los agentes de boro que se usan en BNCT.
- Actualmente, **pocos países** son capaces de fabricar **^{10}B enriquecido** clasificando ^{10}B y ^{11}B en compuestos de boro naturales y suministrándoles en grandes cantidades.
- Los compuestos de **boro de grado farmacéutico** (GMP) se fabrican utilizando este ^{10}B enriquecido en **Japón**, la **República Checa** y otros países.



La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT)

Primera etapa

Segunda etapa



http://www.stella-chemifa.co.jp/english/business/medical/

- ✓ Es necesaria la localización específica del **^{10}B en el tejido** a destruir.
- ✓ El éxito de esta terapia dependería de la habilidad del compuesto de boro utilizado para **concentrarse selectivamente en el tumor** y de la **dosis física total absorbida** por las células tumorales.

Características de los Compuestos borados

- **Concentrarse selectivamente** dentro de las células tumorales (concentración mínima de 10^9 átomos de ^{10}B por célula o 20-35 µg ^{10}B/g de tejido)
- Lograr **una relación** en la concentración entre el tumor y el tejido normal/sangre igual o **superior a 3**.
- Poseer una **cinética apropiada** (deben ser eliminados rápidamente de la sangre y los tejidos normales pero persistir en el tumor durante la aplicación de la terapia)
- **No ser tóxicos** al alcanzar las concentraciones tumorales necesarias.

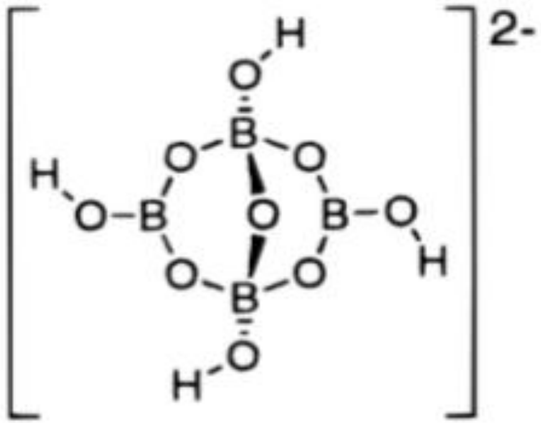
Tipos de Compuestos borados: Tres generaciones

Primera Generación	• Acido bórico y sus derivados
Segunda Generación	• BPA (Borofenilalanina) • BSH (Borocaptato de sodio)
Tercera Generación	• Compuesto con boro unido mediante un enlace estable a otro compuesto dirigido a tumor

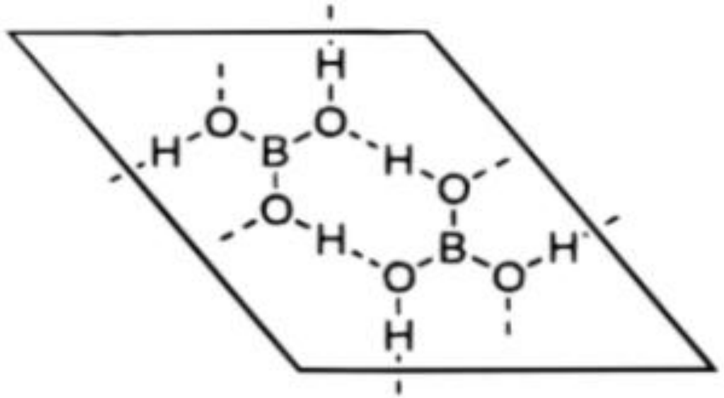
Primera Generación:

Durante los primeros ensayos realizados en tumores cerebrales en los años 50, se utilizó **ácido bórico** y algunos de sus derivados como compuestos portadores del isótopo necesario. Sin embargo estos compuestos simples resultaron ser **poco selectivos**, tenían una **retención deficiente del tumor** y alcanzaban una **relación tumor/cerebro baja**.

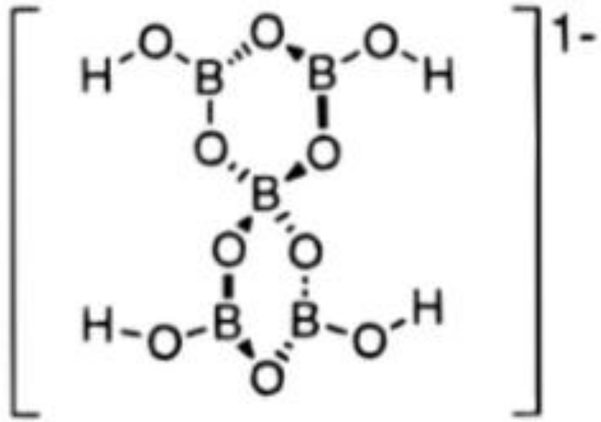
Borax ($Na_2B_4O_7 \bullet 10H_2O$)



Boric acid [$B(OH)_3$]



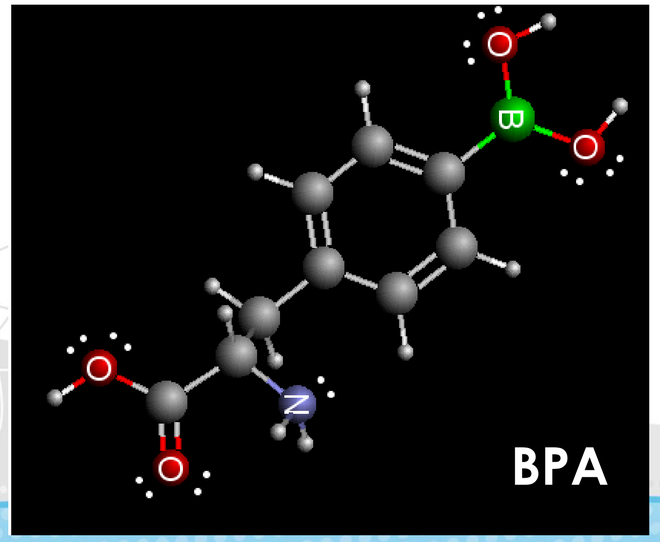
Pentaborate ($NaB_5O_8 \bullet 4H_2O$)

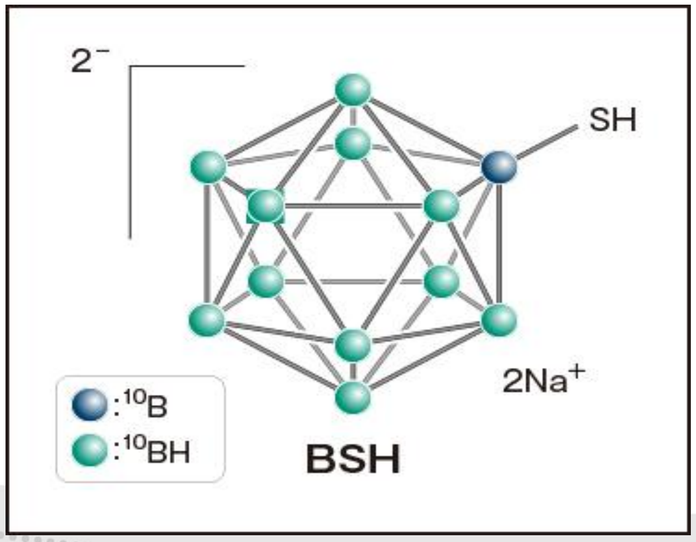


Segunda Generación:

Entrando ya en la década del 60 se sintetizaron dos nuevos compuestos: el **BPA** y el **BSH**.

Esta segunda generación de compuestos se caracterizó por tener **baja toxicidad**, una **mayor permanencia en los tumores** en comparación a otras moléculas relacionadas y una **relación en la concentración entre el tumor y el tejido normal/sangre mayor a 1**.





Tercera Generación:

Consisten principalmente en un **compuesto borado** unido mediante un enlace estable a una **molécula dirigida al tumor**.

Structure of oncotropic ^{10}B molecules

Tercera Generación:

1- Compuestos de **bajo peso molecular** que simulan **precursores químicos** requeridos para el crecimiento y la proliferación tumoral. El pequeño tamaño les permite **atravesar la membrana celular** más fácilmente y ser **retenidos intracelularmente.**

Dentro de los compuestos de bajo peso molecular podemos encontrar **aminoácidos** naturales y artificiales borados y **péptidos pequeños**.

2- Compuestos borados **análogos** de precursores de **ácidos nucleicos**, incluyendo **purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos** que han sido sintetizados y evaluados en **células** y modelos **animales**.

Tercera Generación:

3- Compuestos relacionados con **ligandos del ADN**, como compuestos borados alquilantes, **poliaminas** y **oligonucleótidos** antisentido. Todos estos tienen la ventaja de localizarse y ser **retenidos intranuclearmente**.

4- Carbohidratos **derivados del BSH** y otros compuestos que contienen moléculas como **glucosa, manosa, ribosa, galactosa, maltosa y lactosa**, algunos de ellos evaluados en estudios **in vitro e in vivo**.

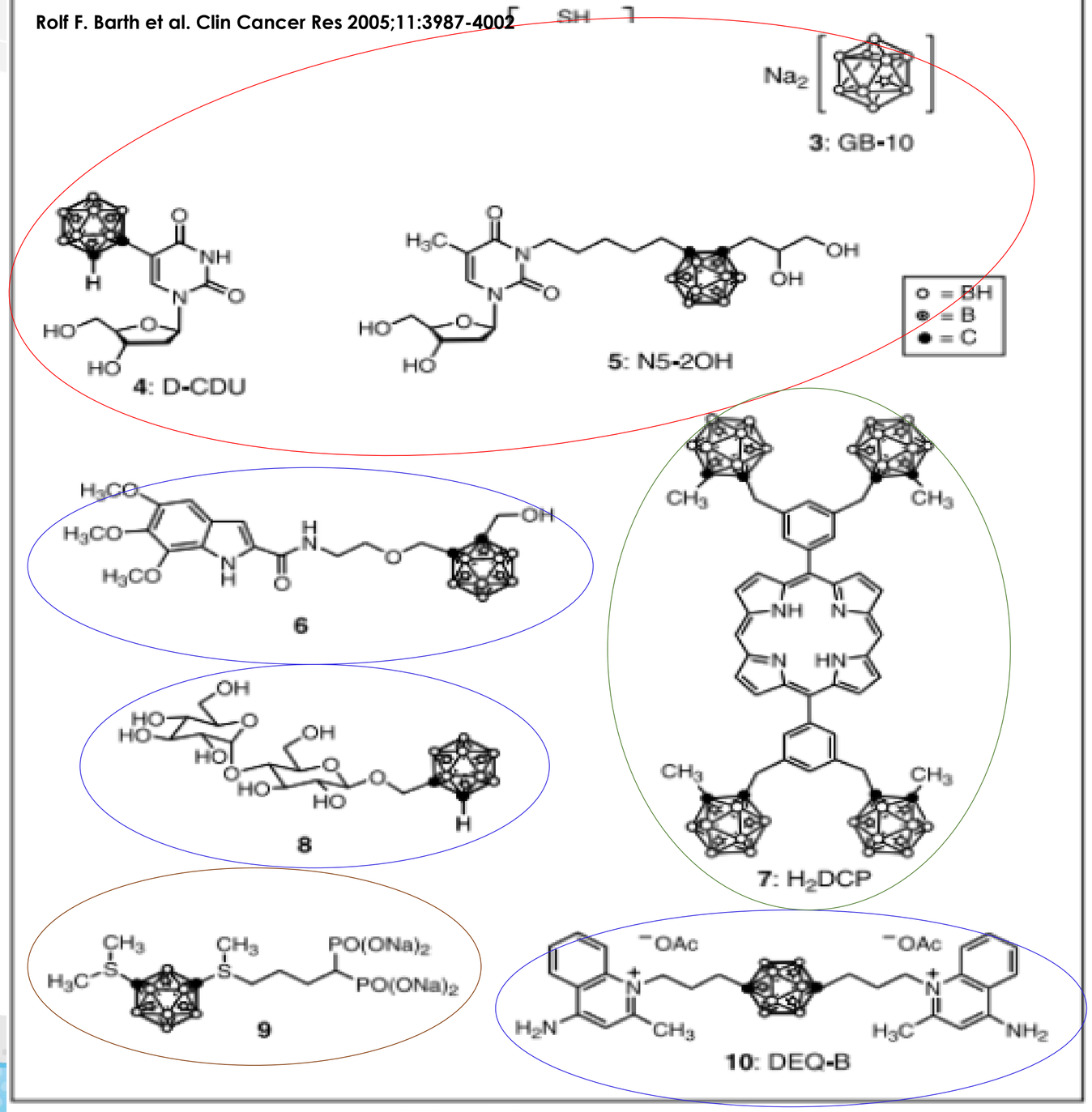
Tercera Generación:

5- **Porfirinas boradas** y moléculas relacionadas que han sido sintetizadas y evaluadas demostrando ser **fácilmente detectables y cuantificables** con microscopía de fluorescencia. Las porfirinas demostraron también tener excelentes propiedades de **localización en el tumor**. La 2,4-bis-(a,β-dihidroxietil)-deutero-porfirina IX **(BOPP)** es una porfirina que posee **40 átomos de ^{10}B** por molécula y ha sido ampliamente estudiada para la aplicación de **BNCT a tumores de cerebro y tumores de tiroides.**

Tercera Generación:

- ✓ **GB-10** se ha mostrado prometedor en **modelos animales**, como el nucleósido derivado h-5-o-carboranil-2Vdesoxiuridina (**D-CDU**) y **N5-2OH**.
- ✓ El compuesto 6, un derivado de trimetoxiindol, ha mostrado promesa **in vitro**.
- ✓ H2DCP, un derivado de porfirina, se mostró como **tumor-selectivo**.
- ✓ El derivado de maltosa (compuesto 8) ha mostrado **baja citotoxicidad y la captación de células tumorales in vitro**.
- ✓ Compuesto de bifosfonato (9) tiene la **capacidad de dirigirse a tumores**.
- ✓ El dequalinium derivado dequalinium-B (DEQ-B; compuesto 10) ha mostrado ser prometedor en estudios **in vitro**.

Rolf F. Barth et al. Clin Cancer Res 2005;11:3987-4002



Pharm Res (2015) 32:2824–2836
DOI 10.1007/s11095-015-1718-y

EXPERT REVIEW

Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy

Micah John Luderer[1] • Pilar de la Puente[1] • Abdel Kareem Azab[1]

Fig. 3 Monoclonal antibody (Cetuximab or L8A4) conjugated to a boronated polyamidoamine dendrimer.

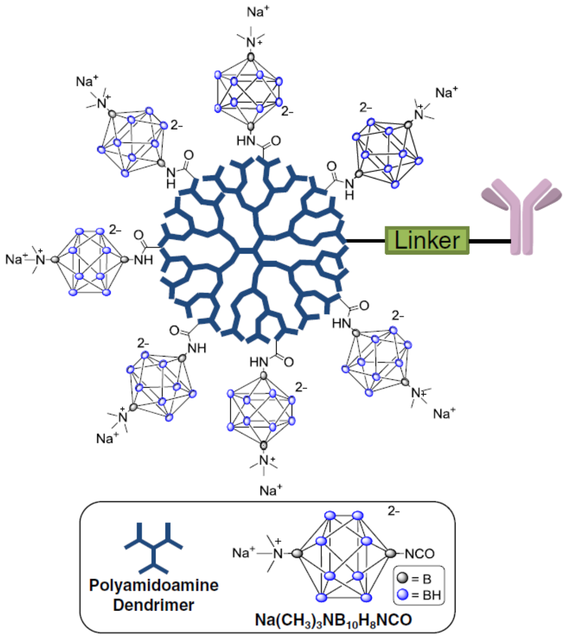
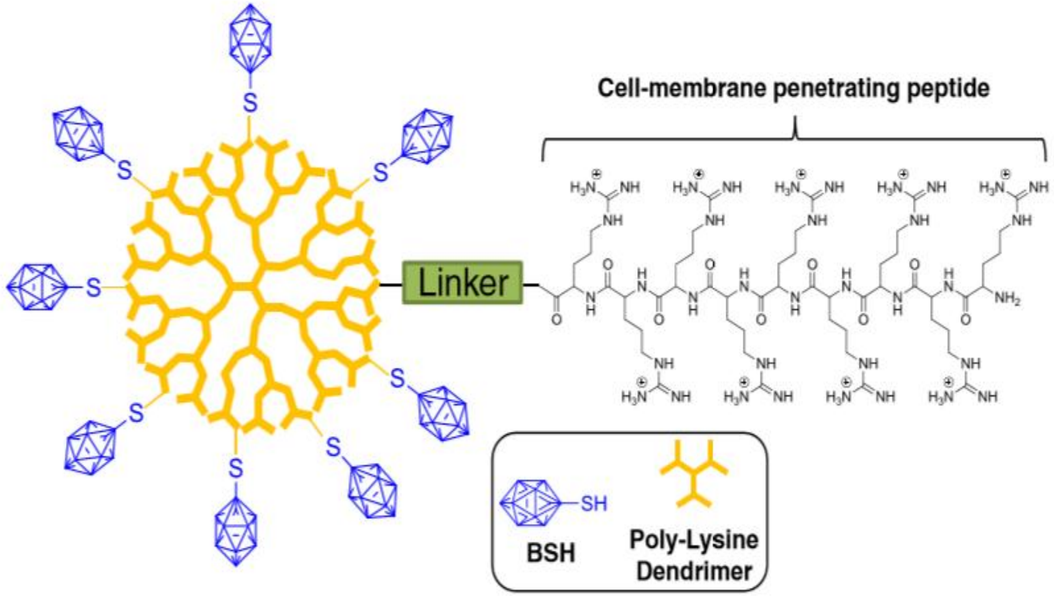


Fig. 5 Schematic representation of BSH containing dendrimer with a cell-membrane penetrating peptide.



Pharm Res (2015) 32:2824–2836
DOI 10.1007/s11095-015-1718-y

EXPERT REVIEW

Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy

Micah John Luderer[1] • Pilar de la Puente[1] • Abdel Kareem Azab[1]

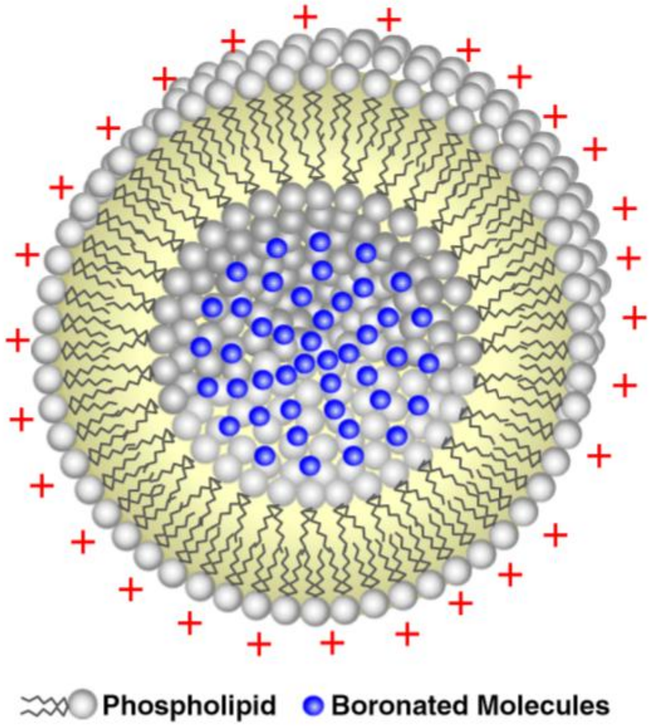
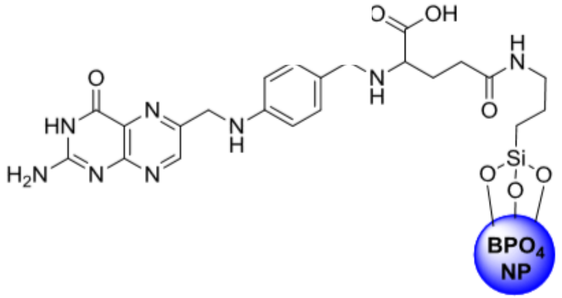
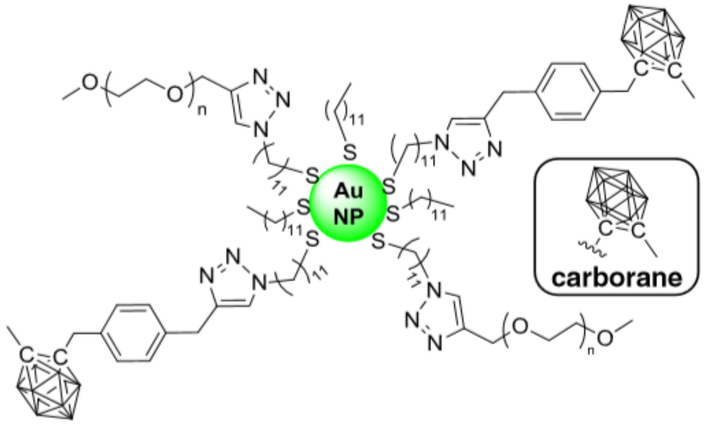


Fig. 6 Positively charged liposomes loaded with boron containing molecules.



Folic Acid functionalized BPO_4 NPs



Gold NPs functionalized with PEG and carborane

Fig. 7 Several nanoparticles investigated for BNCT: Boron phosphate nanoparticles functionalized with folic acid and gold NPs functionalized with PEG and carborane.

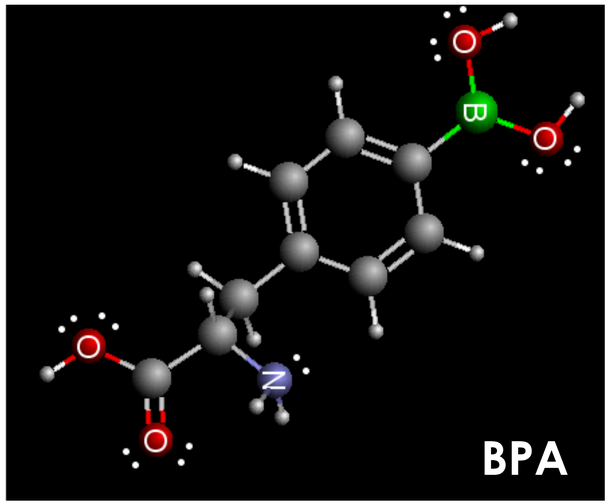
Compuesto portador de boro	Ventajas	Desventajas
BPA	Citotoxicidad mínima, experiencia en ensayos clínicos, membrana permeable.	Bajo porcentaje de composición de B, relación T/N generalmente <4, corta vida media del análogo de fructosa
BSH	Alto porcentaje de composición de boro, experiencia en ensayos clínicos, baja absorción en el tejido cerebral normal.	La carga neta dificulta la difusión de la membrana celular, la relación T/N suele ser <4.
Análogos de nucleósidos y carbohidratos	La acumulación intranuclear (incorporación de ADN) puede reducir los requisitos de dosificación para un BNCT efectivo.	La timidina quinasa-1 humana depende del ciclo celular; por lo tanto, la respuesta al tratamiento puede ser dependiente de la célula.
Aminoácidos no naturales	La penetración del núcleo aumenta la probabilidad de daño en el ADN (puede reducir los requisitos de dosificación). Relaciones T/N >4.	Solo 1 átomo de boro por molécula.
Porfirinas	Niveles de boro determinados por espectrofotometría. Agente soluble en agua, mínimamente citotóxico, de doble modalidad. Alto porcentaje de composición de boro.	Los niveles de boro intracelular no alcanzan un umbral de 20 ppm para un BNCT efectivo

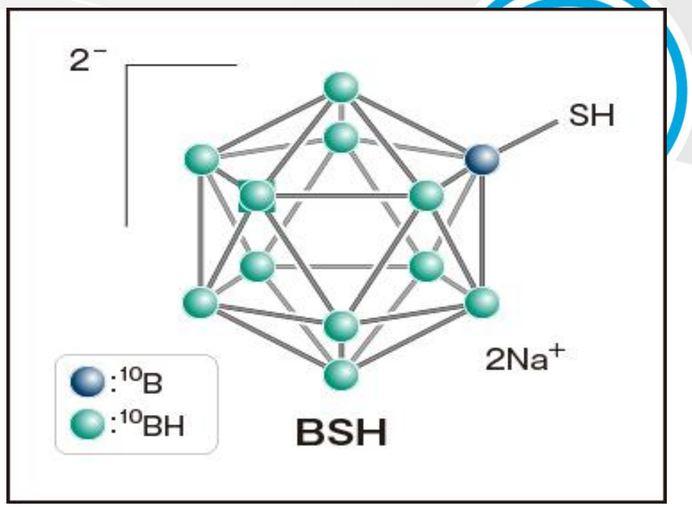
Compuesto portador de boro	Ventajas	Desventajas
Conjugados dendrímeros-anticuerpos	Posibilidad de una alta selectividad T/N basada en la expresión del epitope tumoral.	La absorción de tejido cerebral y tumoral está limitada por BHE
Polímeros catiónicos	Ofrece una carga útil alta de boro. La relación de polímero se puede ajustar para un perfil farmacocinético ideal.	El tamaño grande del polímero puede conducir a una acumulación indeseable en otros órganos.
Péptidos que penetran la membrana celular	Mejora la absorción de agentes con un alto porcentaje de composición de boro pero una acumulación intracelular deficiente.	Puede causar absorción inespecífica en otros órganos, lo cual es indeseable durante la irradiación de neutrones.
Liposomas	Vehículo estable, mínimamente citotóxico Relación de captación superior al BPA solo; los compuestos insolubles pueden encapsularse para el transporte.	Los liposomas> 40 nm probablemente no penetren la BHE. Los macrófagos pueden eliminar liposomas> 100 nm.
Nanopartículas	Síntesis fácil, NP estables. Se pueden usar fracciones direccionales. Incorporación versátil de agentes de boro.	La distribución sistémica de las NP aumenta la muerte celular fuera del objetivo durante el BNCT. Algunas NPs son demasiado grandes para cruzar la BHE.

Compuestos borados aprobados en la clínica: BPA yBSH

- Ambos han demostrado ser **no-tóxicos** en el rango de **dosis** empleado (12-90 µg/g de peso para BPA y 20-120 µg/g de peso para BSH).
- Estos compuestos **enriquecidos en ^{10}B** se han utilizado clínicamente en **Japón, Estados Unidos, Europa y Argentina**.
- Aunque no son ideales, ha sido establecida su **seguridad después de su administración IV**.

Compuestos borados aprobados en la clínica:





- **sin selectividad/especificidad**, pero mayor necesidad de AA.(Excepto en **melanoma**)
- **baja carga de B**: se necesitan altos niveles del compuesto en sangre.
- **baja toxicidad**.
- **acoplamiento** a fructosa/manitol para aumentar la **solubilidad**.
- **absorción regulada** principalmente a través del **transportador de aminoácidos LAT-1**.

- **sin selectividad / especificidad**.
- **lipofílico** / cruza BBB.
- **muy alta carga** de boro.
- **permeabilidad mejorada** y efecto de retención.
- los protocolos están bien **establecidos**.
- capacidad para **acoplarse** químicamente.
- conjugados con **carbohidratos**.

Mecanismos de incorporación celular de Compuestos borados:

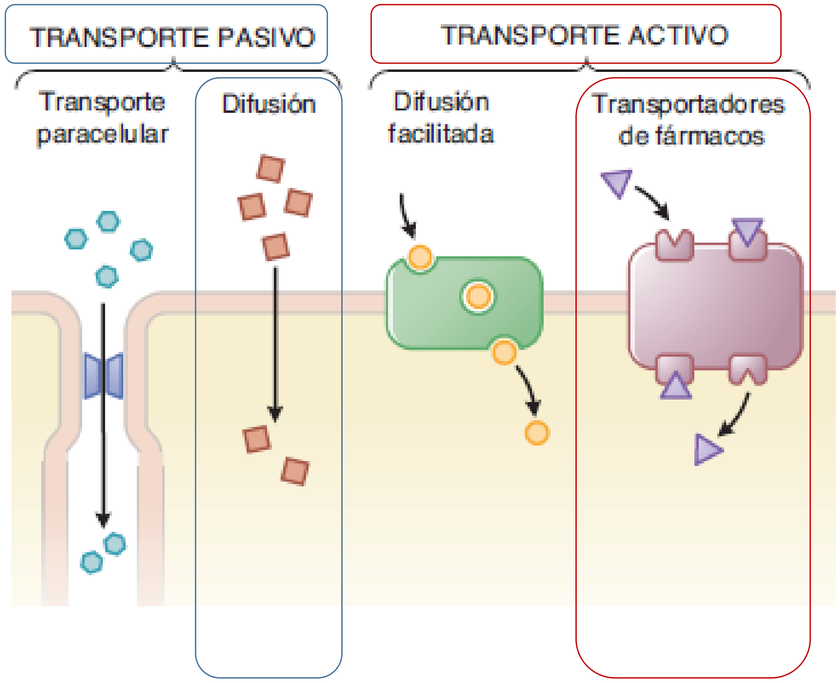
AB,BSH,GB-10 y BPA

Dra. Marcela Garabalino

División Patología de la Radiación, Departamento de Radiobiología

GAATEN, CAC, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Mecanismos de incorporación celular de compuestos borados



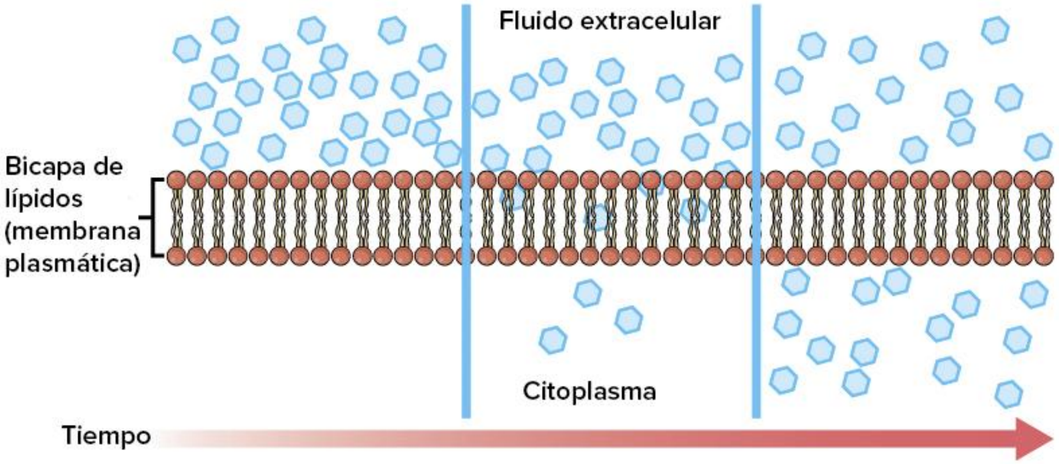
BSH
GB-10
AB

BPA

(Goodman y Gilman, 12º edición 2012)

Difusión

✓No requiere ningún gasto energético por parte de la célula
✓Consiste en la difusión de una sustancia a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración.



En el proceso de **difusión**, una sustancia tiende a moverse de una zona de alta concentración a un área de baja concentración hasta que esta sea igual a lo largo de un tiempo

Difusión

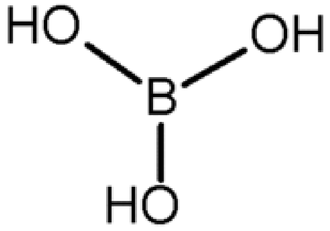
El proceso de **DIFUSIÓN** es directamente proporcional:

- ✓ Magnitud del gradiente de concentración a través de la membrana
- ✓ Coeficiente de Reparto del compuesto
- ✓ Superficie de la membrana

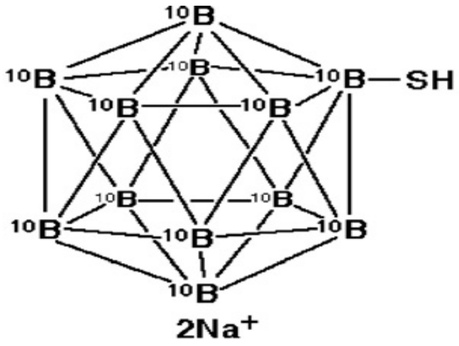
A mayor diferencia de concentración entre las regiones:

DIFUSION MAS RAPIDA

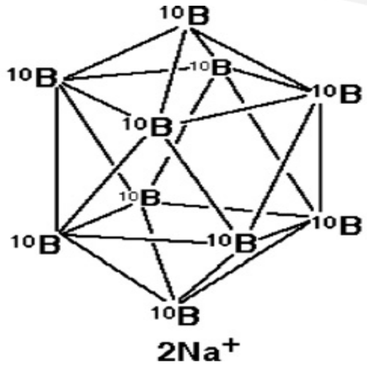
Difusión



AB



BSH



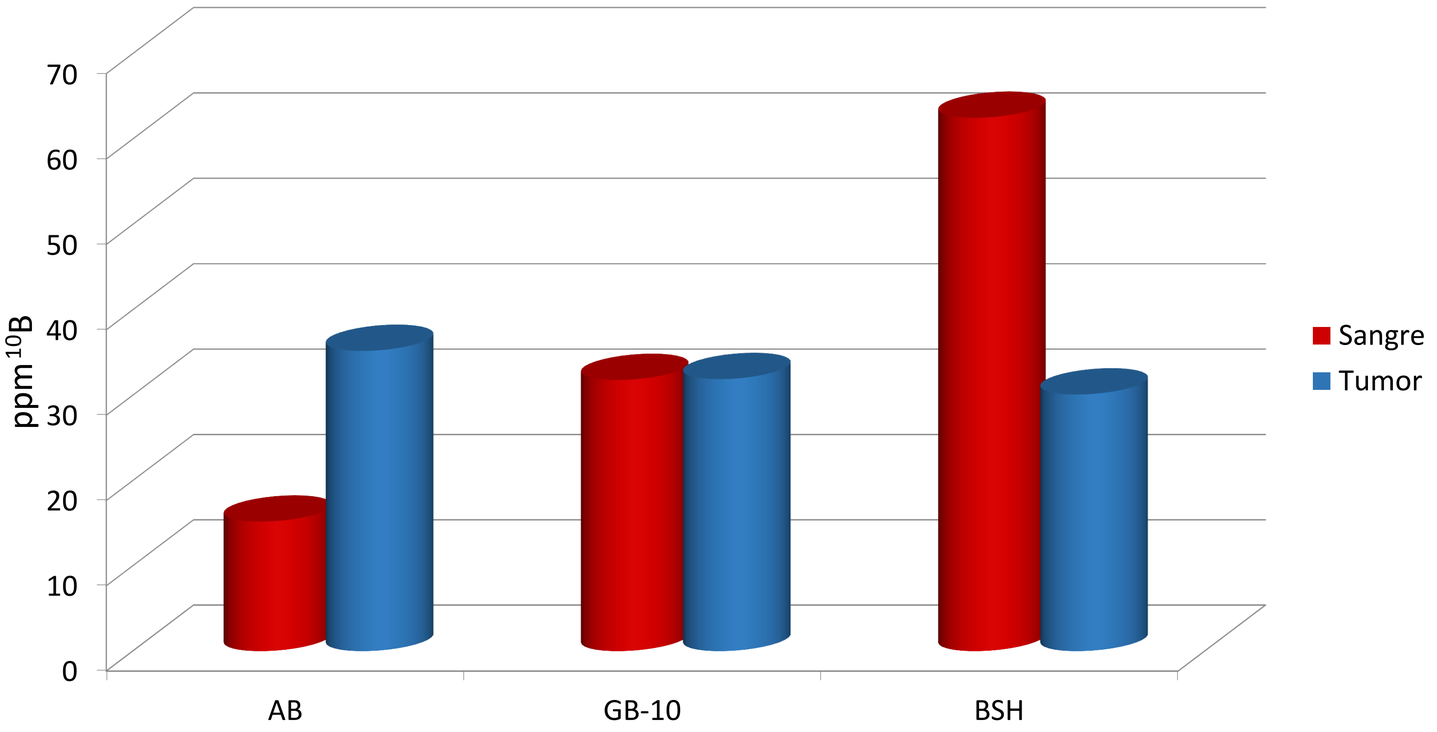
GB-10

✓Las cc estables dependen del gradiente electroquímico para el ión

✓ Diferencias de pH a través de la membrana

De este modo, puede haber distintas velocidades y direcciones de difusión para diferentes moléculas en una sola célula

Difusión



Ejemplo de Estudio de Biodistribución de B realizado en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con AB, GB-10 y BSH a una dosis de 50 mg^{10}B/Kg iv de muestras de sangre obtenidas 3 hs post la administración del compuesto borado correspondiente medidos por la técnica de ICP expresados en ppm ^{10}B (Heber et. al 2004; Garabalino et al., 2013, 2016)

Transporte activo

✓ Es el transporte de una molécula a través de una membrana en contra gradiente

✓Requiere gasto energético por parte de la célula (Ej. ATP)

Se clasifica en:

✓ **Transporte primario activo:** utiliza directamente una fuente de energía química (ej., ATP)

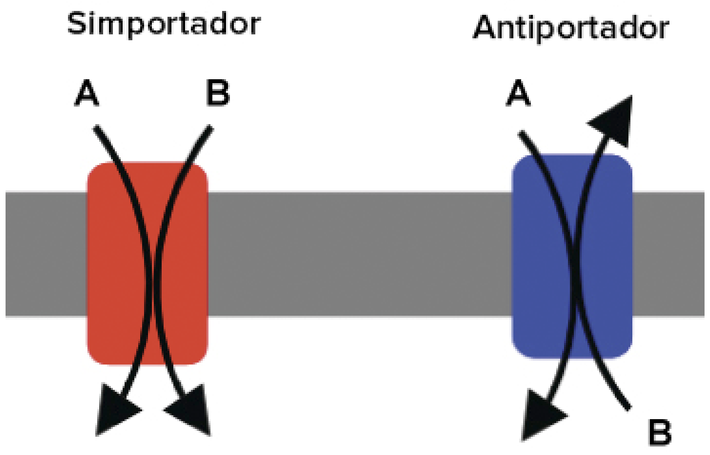
✓**Transporte secundario activo** (**cotransporte):** utiliza un gradiente electroquímico como fuente de energía proveniente de un transportador activo primario

Transporte activo secundario

Las dos moléculas transportadas pueden:

✓moverse en la misma dirección: **simportador**

✓o en direcciones opuestas: **antiportador**.



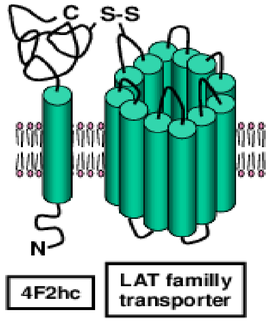
Transporte activo secundario

Sistema de transporte de aa del tipo L
(LAT: L Aminoacid Transport)

Aminoácidos:
- ✓Aromáticos
- ✓Neutros
- ✓Ramificados
- ✓Algunos esenciales

Derivados de Aminoácidos:
- ✓L-Dopa
- ✓Melfalán
- ✓Hormonas Tiroideas
- ✓ Gabapentina

- ✓Heterodímeros
- ✓Sodio independientes
- ✓Localizados en la MP
- ✓Antiportadores

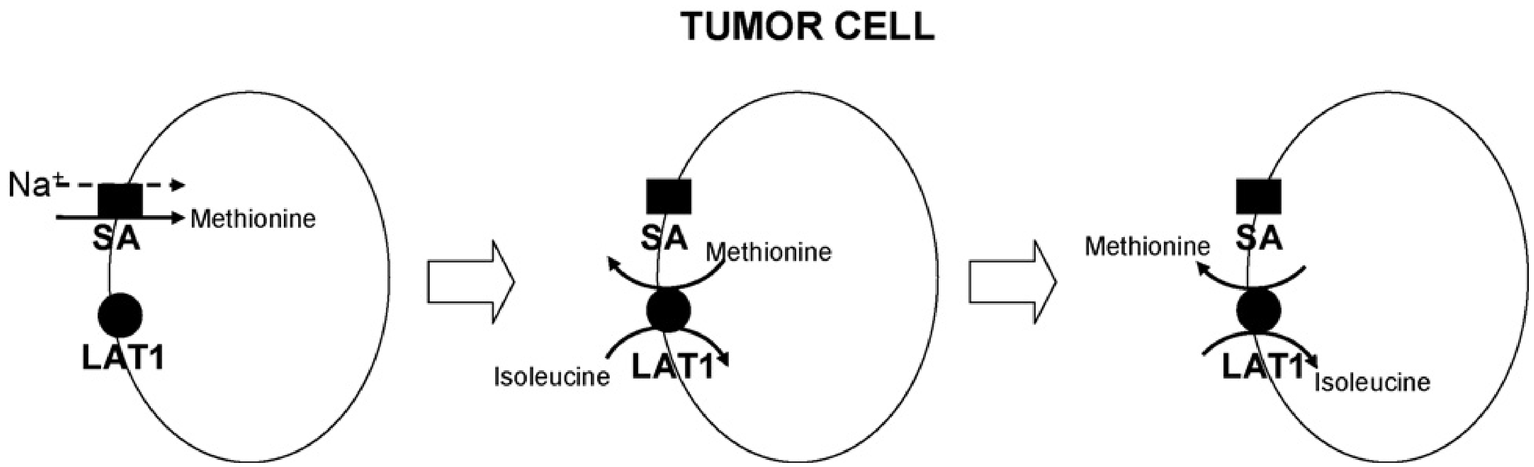


LAT-1
LAT-2
LAT-3
LAT-4

Transporte activo secundario

Mecanismo de los sistemas LAT:

Intercambiadores de aa con estequiometría 1:1



(Del Amo et al., 2008)

Cell line/specie	Technique	*Brain*		*Stomach*		*Intestine*		*Colon*		*Liver*		*Fetal liver*		*Kidney*		*Lung*		*Heart*		*Skeletal muscle*		*Spleen*		*Placenta*		*Testis*		*Thymus*		*References*
		LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	LAT1	LAT2	
MBEC4	N/W	+++																												Kageyama, 2000
Mice	N	++	+			-	++	-	-	-	-			+	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	++	-	++	-	Rossier, 1999
Mice	N	++		++		+→-				-				+	+++	+		+		+	-	++				+++		++		Nakamura,1999
Mice	W	+++				-				-		++		-								++				+++				Nakamura,1999
Mice	N	+	-	+	+	+→-	++	+→-	-	+→-	-			+→-	+															Dave, 2004
Mice	W	+++		-	++	-	++	-	+					-	++															Dave, 2004
Mice	W	++								-				-				+		-						+				Duelli, 2000
IEC-6	PCR/W					++	++																							Fraga, 2005
Rat	PCR/W					+	++	++	++																					Fraga, 2005
Rat	N	++	+			-	++	+	++	-				-	++	-		-		-	+	++		+++	++	+	++			Kanai, 1998 Segawa, 1999
Rat	N	++								-				-		-		-				+				+				Boado, 1999
Rabbit	N						+				-				+++		-		-		-									Rajan, 2000
Cow	N	++++																												Boado, 1999
Caco 2	PCR/W					+	++																							Fraga, 2005
Human	N	++				-		-		-		+++				-		-		-		-		+++		++		+		Yanagida, 2001
Human	N	++	+			-	+→-	+	-	+	+			++	+++	+	+→-	+	+	++	+	+→-	+	+++	++			+	-	Prasad, 1999 Pineda, 1999

(Del Amo et al., 2008)

Transporte del BPA

LAT-1

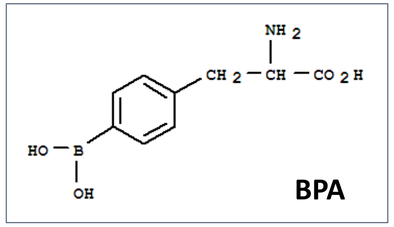
✓Transporta aa neutros, ramificados o aromáticos (Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Met, His y Phe) a **CELULAS TUMORALES**

✓Asociado con el crecimiento, proliferación y desarrollo de tejidos

✓Altamente expresado en tumores malignos y líneas celulares

LAT-2

✓Se expresan en **CELULAS NORMALES**



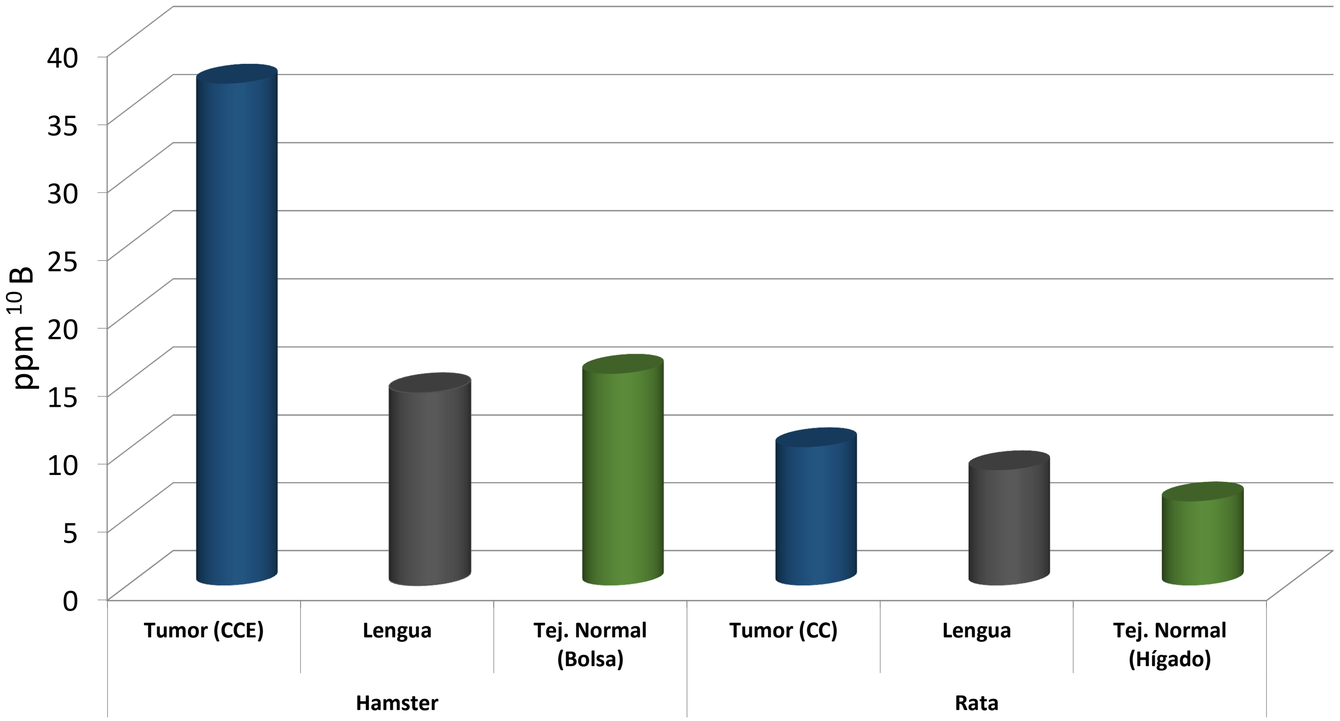
BPA -derivado de Phe:
AA arómatico, hidrofóbico neutro

Incorporación preferencial de BPA:

✓Mayor requerimiento de aa debido a su mayor actividad metabólica en CÉLULAS TUMORALES

LAT -1

Transporte del BPA



Ejemplo de Estudios de Biodistribución de B realizados en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con tumores de Carcinomas de Células Escamosas (CCE) y en el modelo experimental de metástasis hepáticas de carcinoma de colon (CC) en ratas, ambos con BPA (300 mg BPA/Kg iv). Los valores expresados en ppm ^{10}B son de muestras de tumor, lengua y tejido normal obtenidas 3 hs post la administración del compuesto borado medidos por la técnica de ICP (Kreimann et al., 2001; Garabalino et al., 2011)

¿Dónde uso el dato de la cantidad de boro que ingresó a la célula?

En la fórmula para calcular la **Dosis total absorbida**, en Gy:

$$D_t = D_{10_B} + D_{14_N} + D_F + D_{NR}$$

D_t	*Dosis total absorbida*
D_{10_B}	Dosis de ^{10}B debido a neutrones térmicos
D_{14_N}	Dosis de ^{14}N debido a neutrones térmicos
D_F	Dosis de fotones gamma
D_{NR}	Dosis de neutrones rápidos

Técnicas de medición de boro

Técnicas		Principio de funcionamiento
Basadas en Plasma	**ICP-OES** (Espectrometría de Emisión Óptica por Acoplamiento Inductivo)	La ionización de boro a iones **B^+ excitados** producen determinadas **emisiones de longitudes de onda**, a partir de las cuales se determina la presencia de **Boro**, independientemente de la isotopía (isótopo ^{10}B y isótopo ^{11}B)
	ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Inductivo)	Luego de la ionización de boro a iones **B^+ excitados**, se puede medir la **abundancia isotópica (^{10}B ó ^{11}B)** en función de la relación **masa/carga (m/z)**

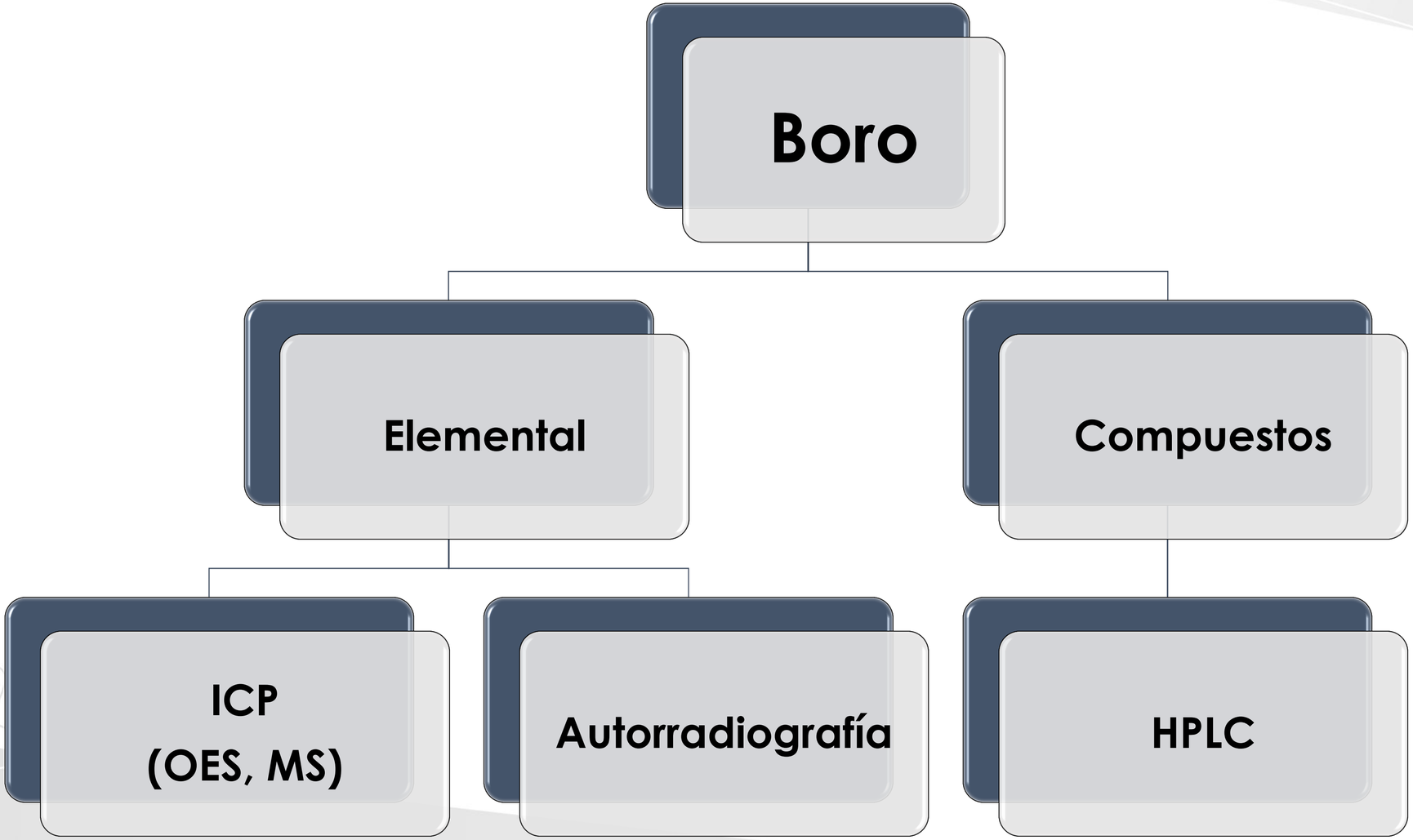
Técnicas de medición de boro

Técnicas		Principio de funcionamiento
Espectrometría de masa por ionización térmica (TIMS:Thermal Ionization Mass Spectrometry)	**PTIMS** (Espectrometría de masa por ionización térmica positiva)	Se produce la **conversión de B a cationes** alcalinos ($Na_2BO_2^+$ ó $Cs_2BO_2^+$) ó metálicos y luego **se mide la abundancia isotópica** (^{10}B ó ^{11}B) en función de la relación masa/carga (m/z)
	NTIMS (Espectrometría de masa por ionización térmica negativa)	Se produce la **conversión de B a aniones** metaboratos (BO_2^-) y luego **se mide la abundancia isotópica** (^{10}B ó ^{11}B) en función de la relación masa/carga (m/z)

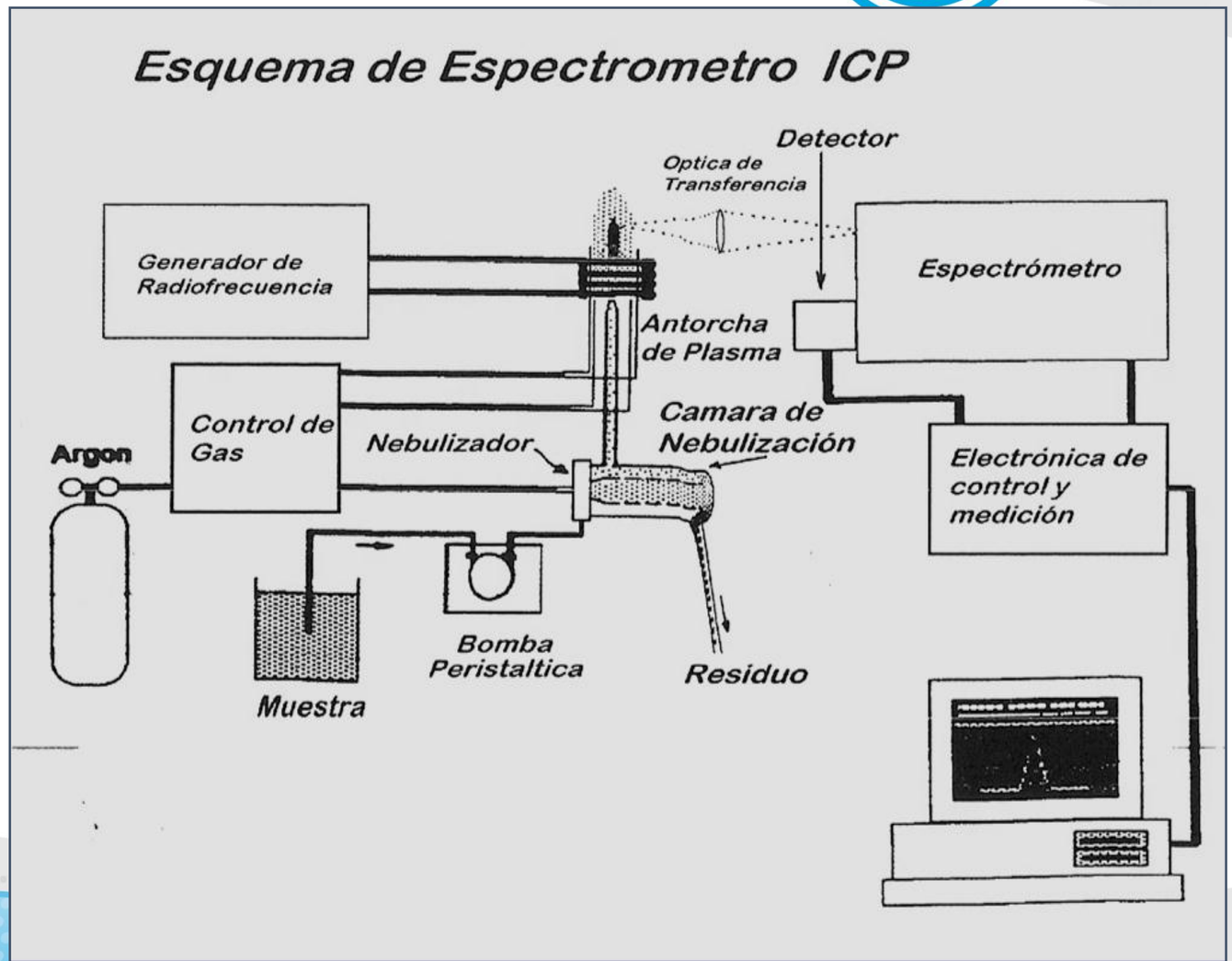
Técnicas de medición de boro

Técnicas		Principio de funcionamiento
No basadas en Plasma	**Espectrofotometría**	Se adicionan **reactivos específicos** para boro, que desarrollan un determinado **color** y a continuación se miden las **absorbancias** a las **longitudes de onda** correspondientes
	Nuclear	Se **bombardea la muestra con neutrones**, produciendo partículas α y fotones γ, midiendo luego la abundancia isotópica del ^{10}B

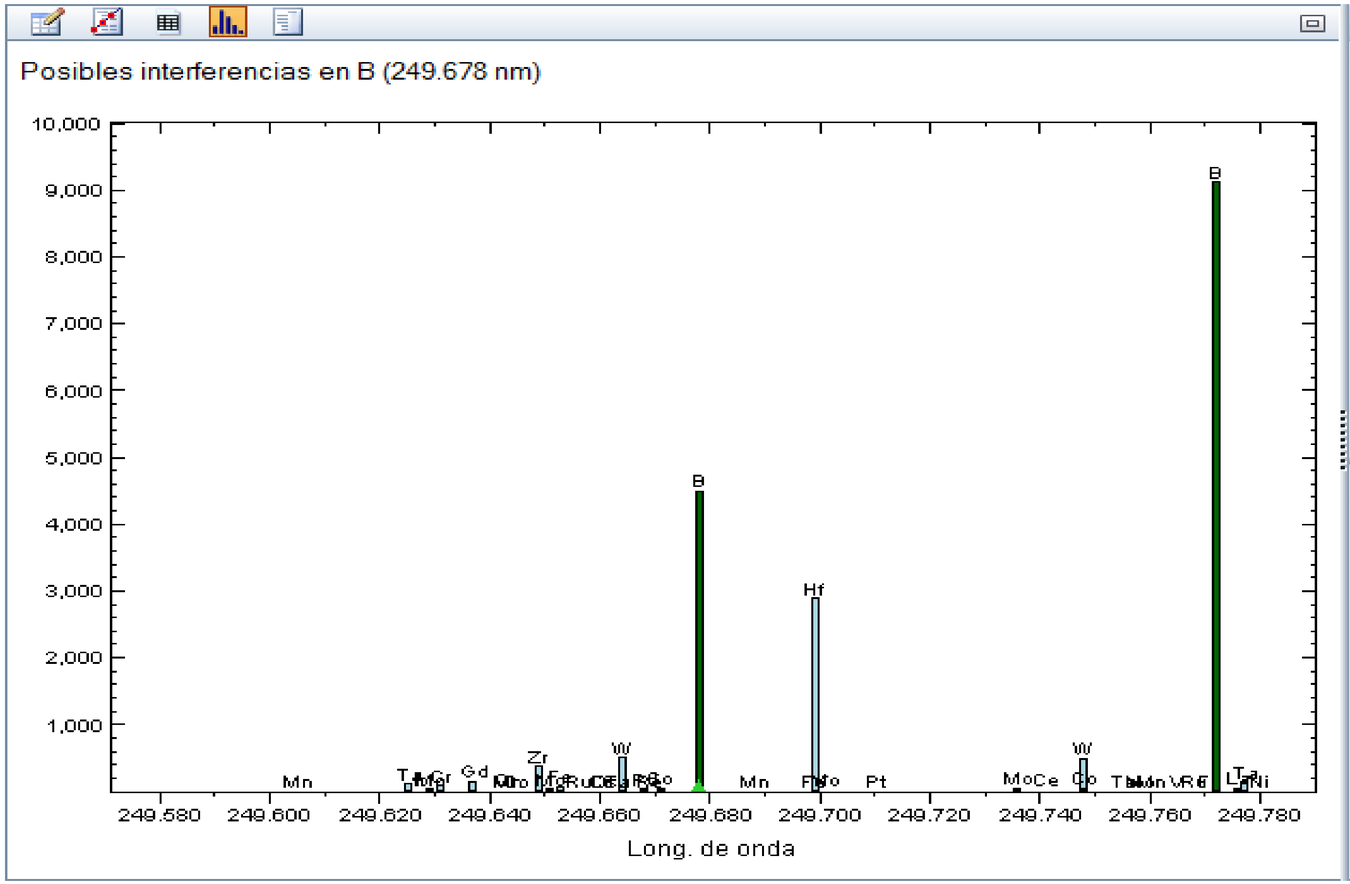
¿Cómo se mide el boro en Argentina?

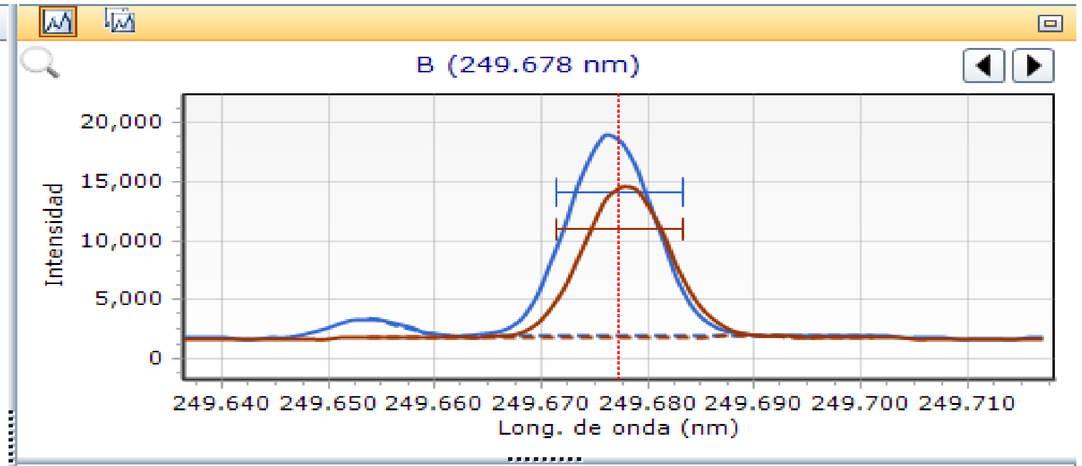


Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)



Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)





Estado del instrumento: No en línea

Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)

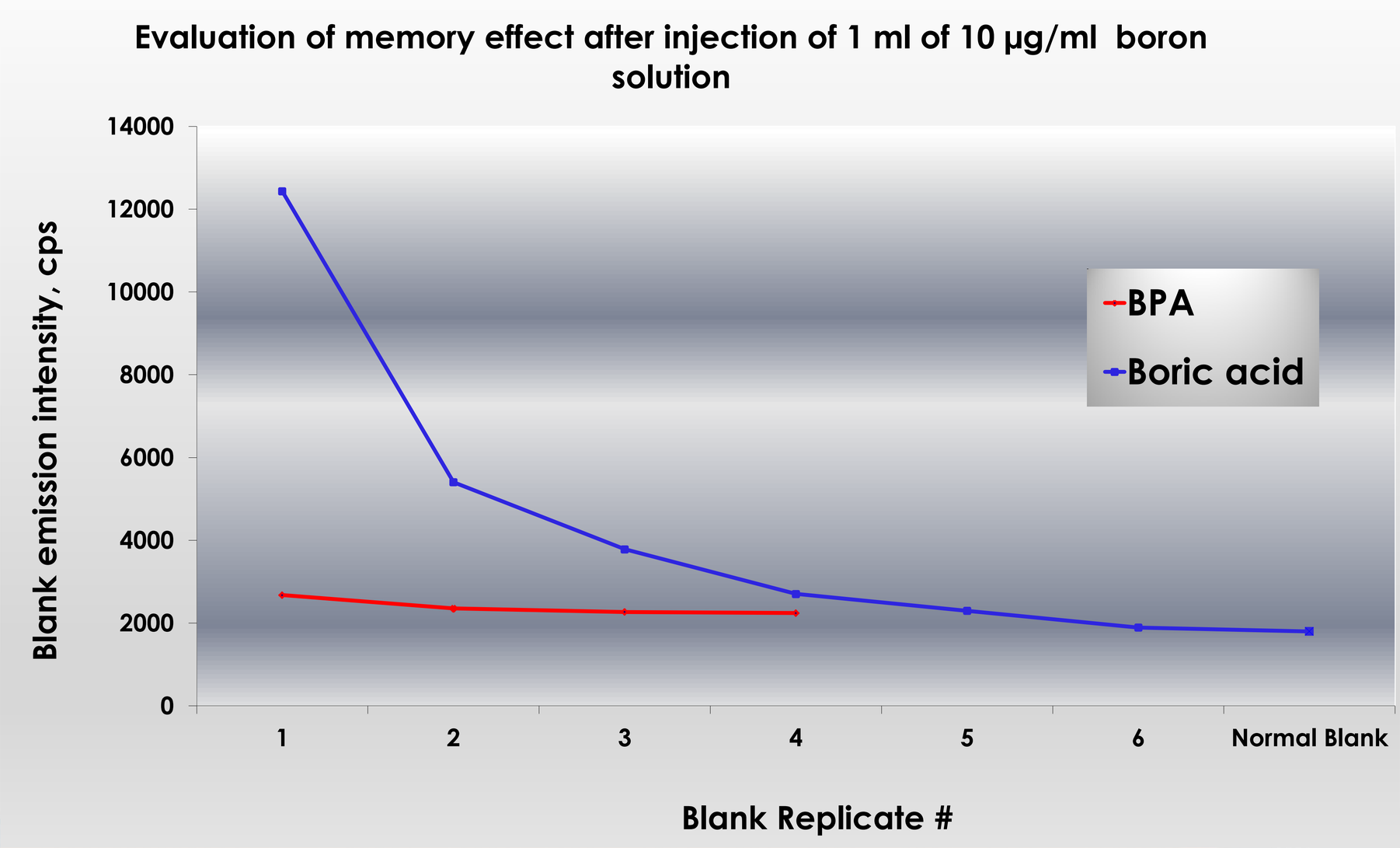
Métodos:

1. Determinación de la **concentración de B en sangre entera**: usado en tratamientos y biodistribuciones.

2. Determinación de **boro total en tejidos (digestion ácida** de micromuestras**)**: para muestras de tejidos, células y sangre.

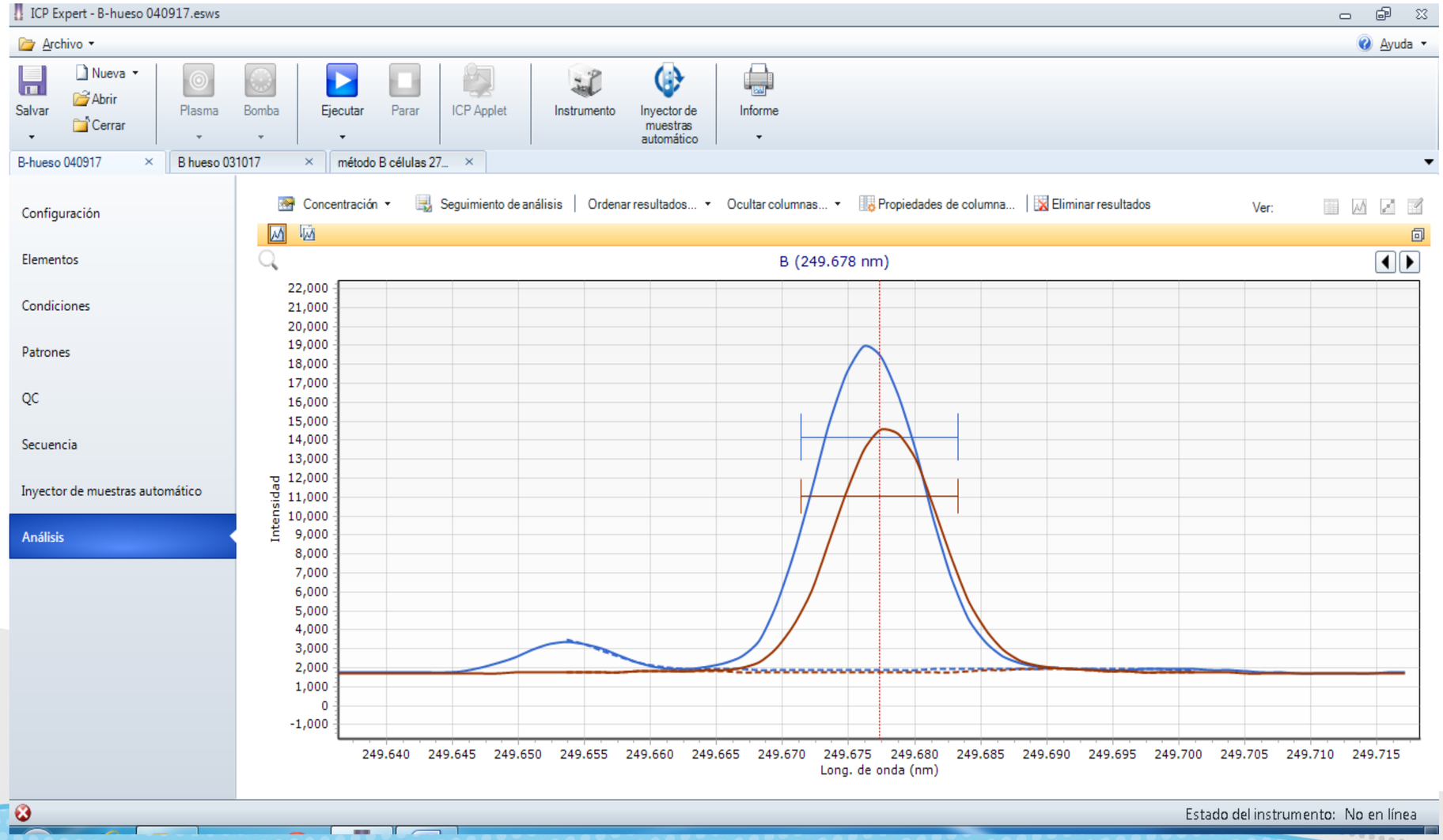
Ambos métodos obtienen una precisión **menor a las ppm**.

Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)



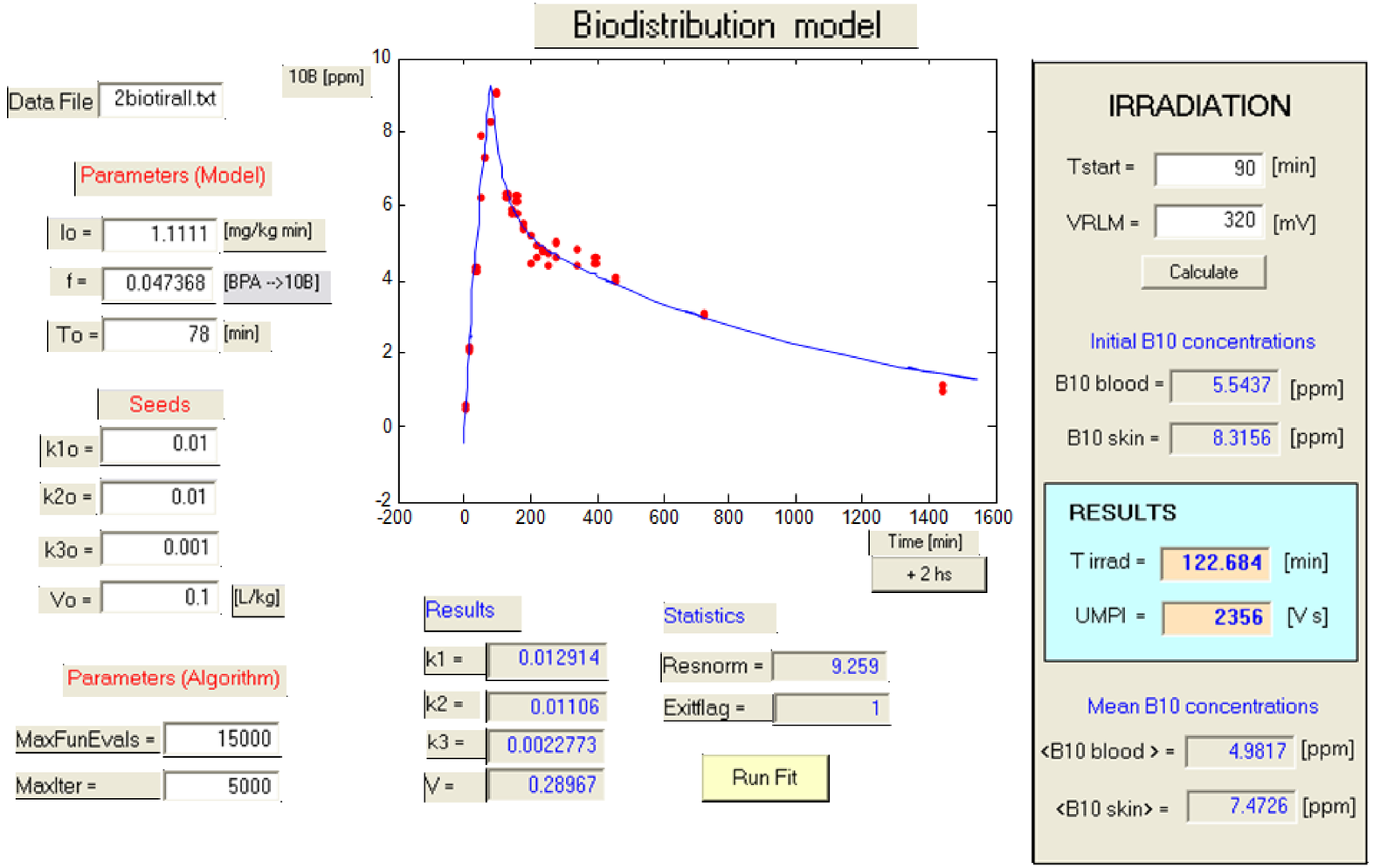
Efecto memoria del boro

Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)



Interferencias espectrales

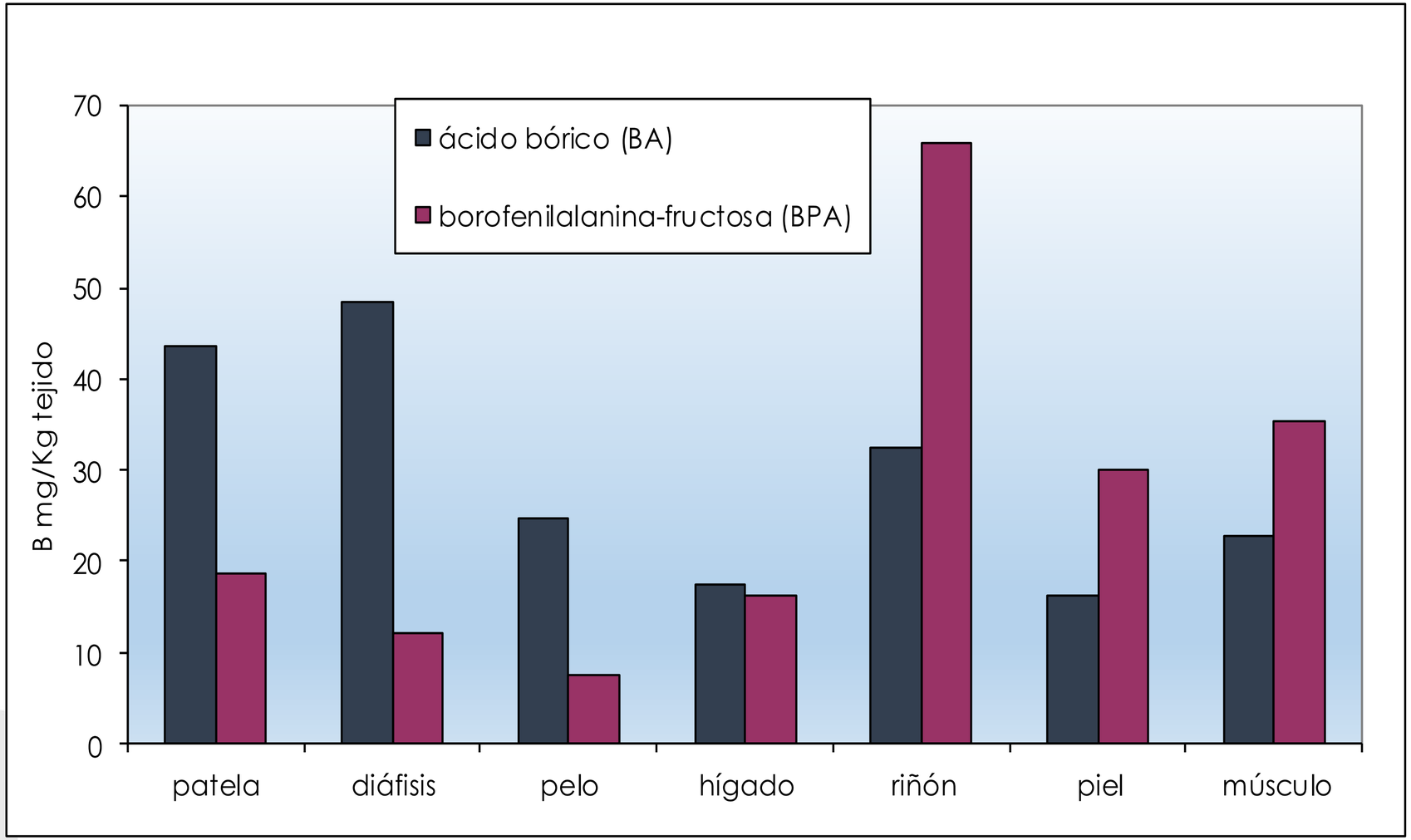
La cuantificación de **boro en sangre y tejidos** es indispensable para determinar su **biodistribución en función del tiempo** y así calcular la dosis terapéutica.



Curva típica de evolución de boro en sangre en función del tiempo para un paciente con cáncer indiferenciado de tiroides en el que se ha realizado un **estudio de biodistribución** de boro con una inyección de 100 mg/kg de peso durante 90 minutos.

(Modelo de **dos compartimentos**)

Determinación de la concentración de boro en Plasma Acoplado Inductivamente a un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES)



Distribución de boro en los diferentes tejidos, 3 hs post infusión, animales infundidos con solución de BA y BPA, **40 mg B/ Kg animal**. El gráfico muestra el resultado promedio de 5 animales por grupo de dosis.

(Olivera y col. AATN 2015)

Captación selectiva de dos compuestos borados

Preparación de BPA complejada con Fructosa

- Esta solución se prepara en una concentración de **30 mg ^{10}BPA/mL** (0,14 M).
- El compuesto de boro (**L-fenilalanina enriquecido al 99% de átomos de ^{10}B** obtenido de Interpharma Praha S.A. (República Checa) se **combina con fructosa en una relación 1:1**.
- A continuación, el pH se ajusta a 9,5-10 con una solución de hidróxido de sodio 10 N y la mezcla se agita hasta que todo el sólido se disuelva.
- Por último, el pH se reajusta a 7,4 con ácido clorhídrico 6 N.
- Luego se **esteriliza** la solución con filtros de 0,22 μm y se la **conserva en heladera a 4°C hasta su uso**.

Ensayos de esterilidad:

Alícuota de Solución de BPA-F lista para infundir

Se filtra nuevamente con membrana de 0,45 µm de poro

Membrana

½ membrana	½ membrana

Durante 14 días

Incubo a 35° en medio tioglicolato (Búsqueda de anaerobios)	Incubo a 25° en medio TBS (Búsqueda de hongos y levaduras)

Ensayos de control de endotoxinas bacterianas:

Método LAL cinético turbidimétrico

- Determinación o **cuantificación de endotoxinas** provenientes de **bacterias Gram negativas** presentes en el producto final de drogas parenterales. (ensayo LAL)

- El método mide el tiempo de reacción necesario para el **desarrollo de turbidez** de una solución sobre la cual se **agrega un lisado**, empleando un equipo apropiado.

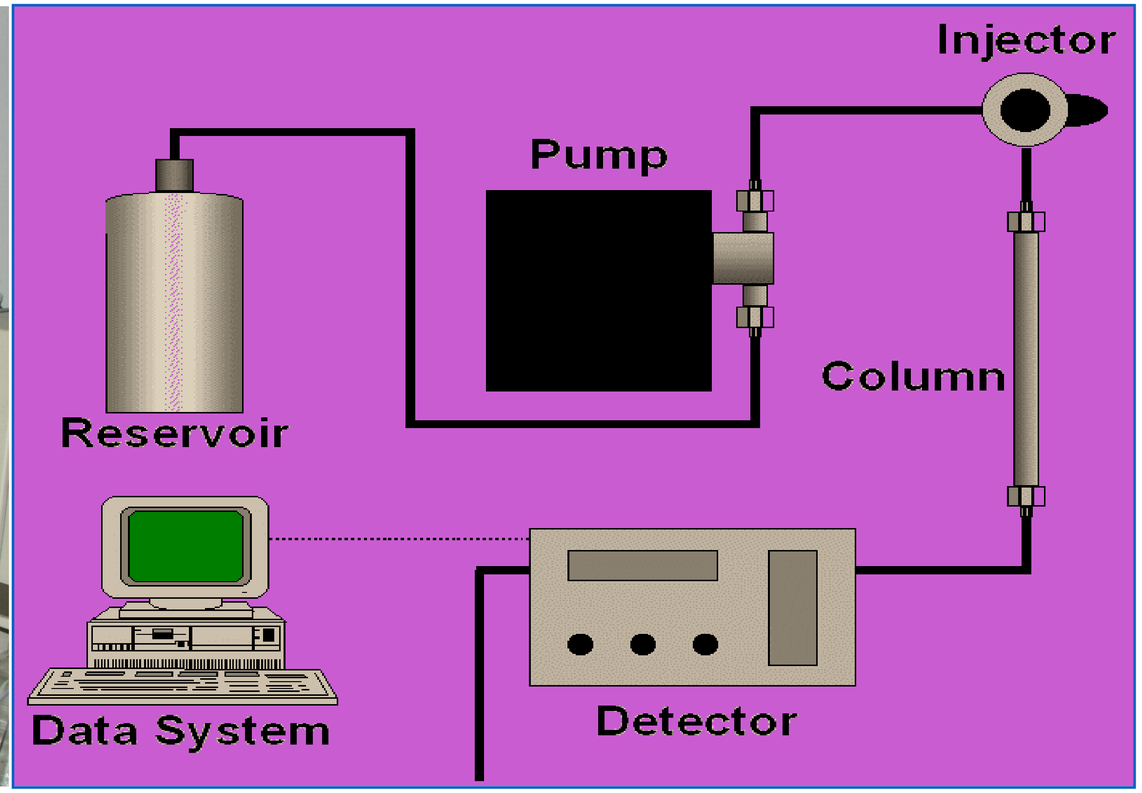
- Las **endotoxinas actúan como pirógenos**. Su administración en **productos parenterales** contaminados provoca **fiebre** al hombre y/o animales.

Control de calidad de la BPA:

Determinación de la pureza de BPA por HPLC:

- La BPA es un compuesto **atóxico**.
- Hay diversas rutas sintéticas.
- Se obtienen **subproductos de reacción** que son separados del producto final.
- Es necesaria la **verificación de la pureza** de dicho compuesto, a fin de determinar la **ausencia de estos subproductos o productos de la descomposición** por el paso del tiempo.
- Este análisis representa un **control de calidad de BPA**, el cual se realiza tanto en la droga sólida como en su complejo con fructosa.

Control de calidad de la BPA-F: Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)



Control de calidad de la BPA-F: Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Ventajas

- Elevada resolución
- Velocidad
- Alta sensibilidad
- Capacidad de automatización

Desventajas

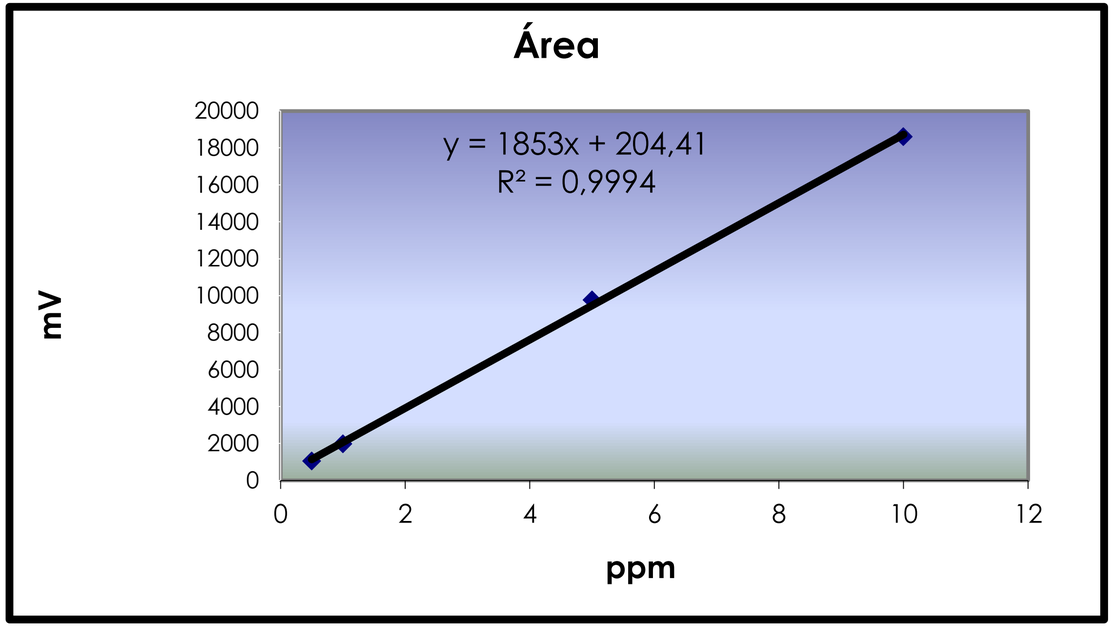
- Pequeña capacidad
- Gasto elevado de la instrumentación

Control de calidad de la BPA-F por HPLC

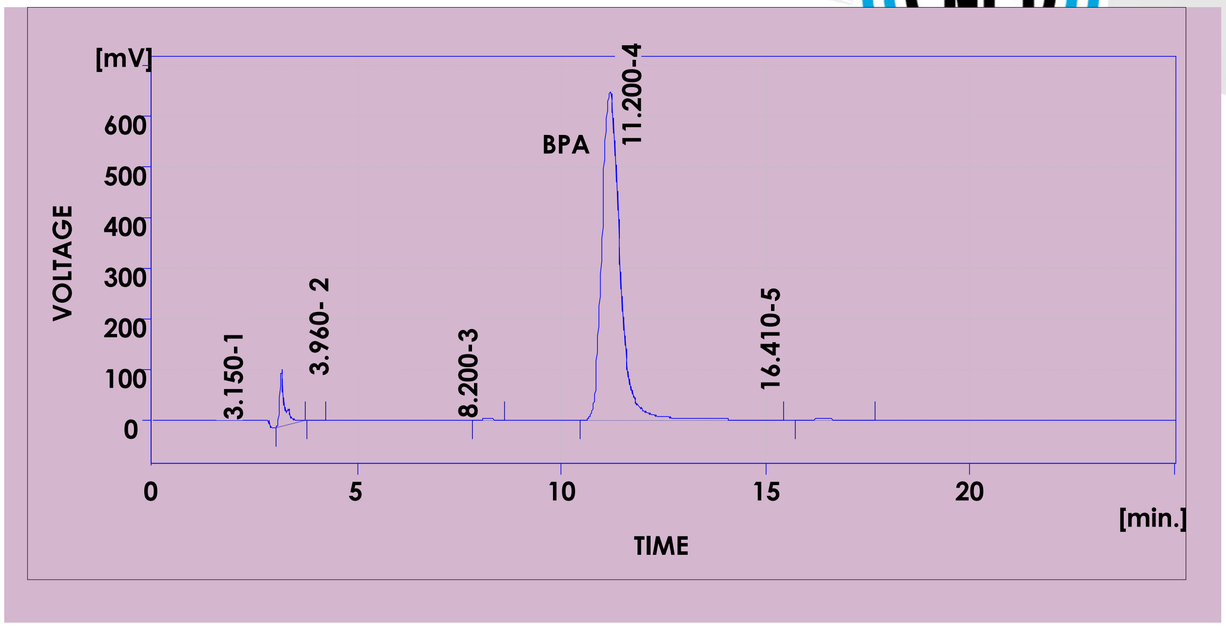
Método	**Determinación de la pureza de la BPA por HPLC**
Columna (fase fija)	**C18. Beckman. Ultraesphere. 25cm x 4,6mm**
Eluyente (fase móvil)	**Buffer Fosfato pH= 4,0.**
Flujo	**0,8 ml/min**
Longitud de onda	**200 nm**
Temperatura	**Ambiente**

El método ya se encuentra desarrollado, es robusto y reproducible.

Control de calidad de la BPA-F por HPLC



Curva de calibración para BPA-F



Cromatograma de BPA 10 ppm

Posibles impurezas: tirosina (Tyr) y fenilalanina (PA).
En las condiciones óptimas de corrida una mezcla de BPA, PA y Tyr se separan en un tiempo aceptable (20 minutos) y con apreciable resolución

Control de calidad de la BPA sólida por HPLC

La determinación de la **pureza de BPA en estado sólido** es necesaria para comprobar la **estabilidad del compuesto** en el tiempo.

Procedimiento:

1. Disolución de la BPA sólida en medio alcalino (pH~10,5).
2. Se filtra con jeringa y filtro de 0,22 µm.
3. Se realiza una determinación de la concentración de una alícuota de la solución por HPLC.
4. Al volumen de solución restante se lleva a pH ácido (~4-5), para precipitar nuevamente el sólido disuelto.
5. Se filtra y el precipitado se lava y se lo lleva a sequedad.
6. Al precipitado seco se re-suspende en agua.
7. Se repiten los puntos 1, 2 y 3.

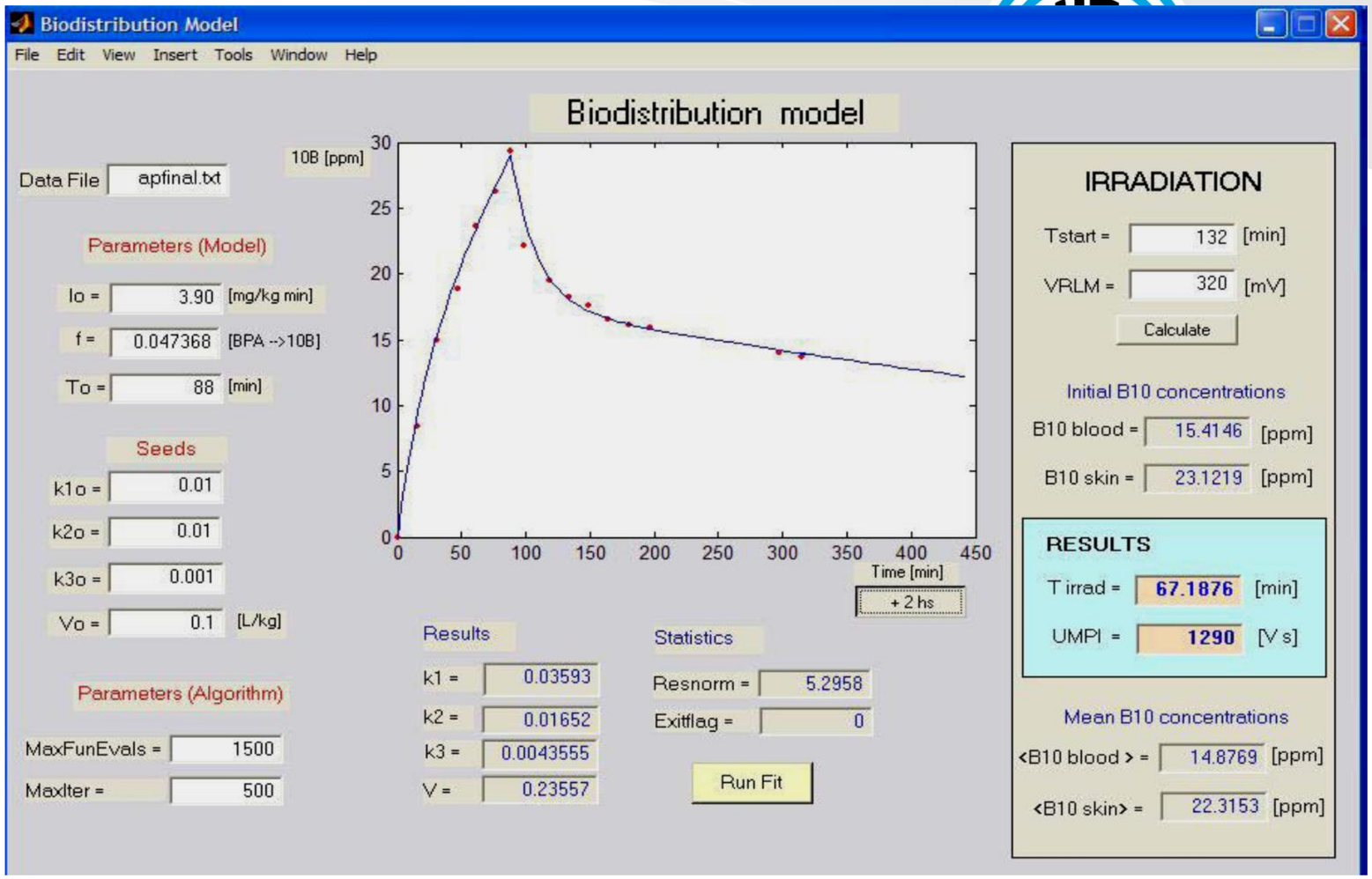
Control de calidad de la BPA sólida por HPLC

Resultados:

- No se observan diferencias entre los cromatogramas de BPA obtenidos antes y después de llevar a sequedad.
- No hay formación de nuevos productos luego del tratamiento.
- No se ve aumento de los probables aminoácidos contaminantes (Tyr y PA) tanto antes como después del tratamiento.

Reproducibilidad en ICP-OES

Muestra	Tiempo	CAB	CAC
1	0	0	0
2	14	6,5	-----
3	29	7,2	7,1
4	44	6,4	6,2
5	60	9,4	9,5
6	76	14,7	14,4
7	92	18	17,9
8	107	23	24,4



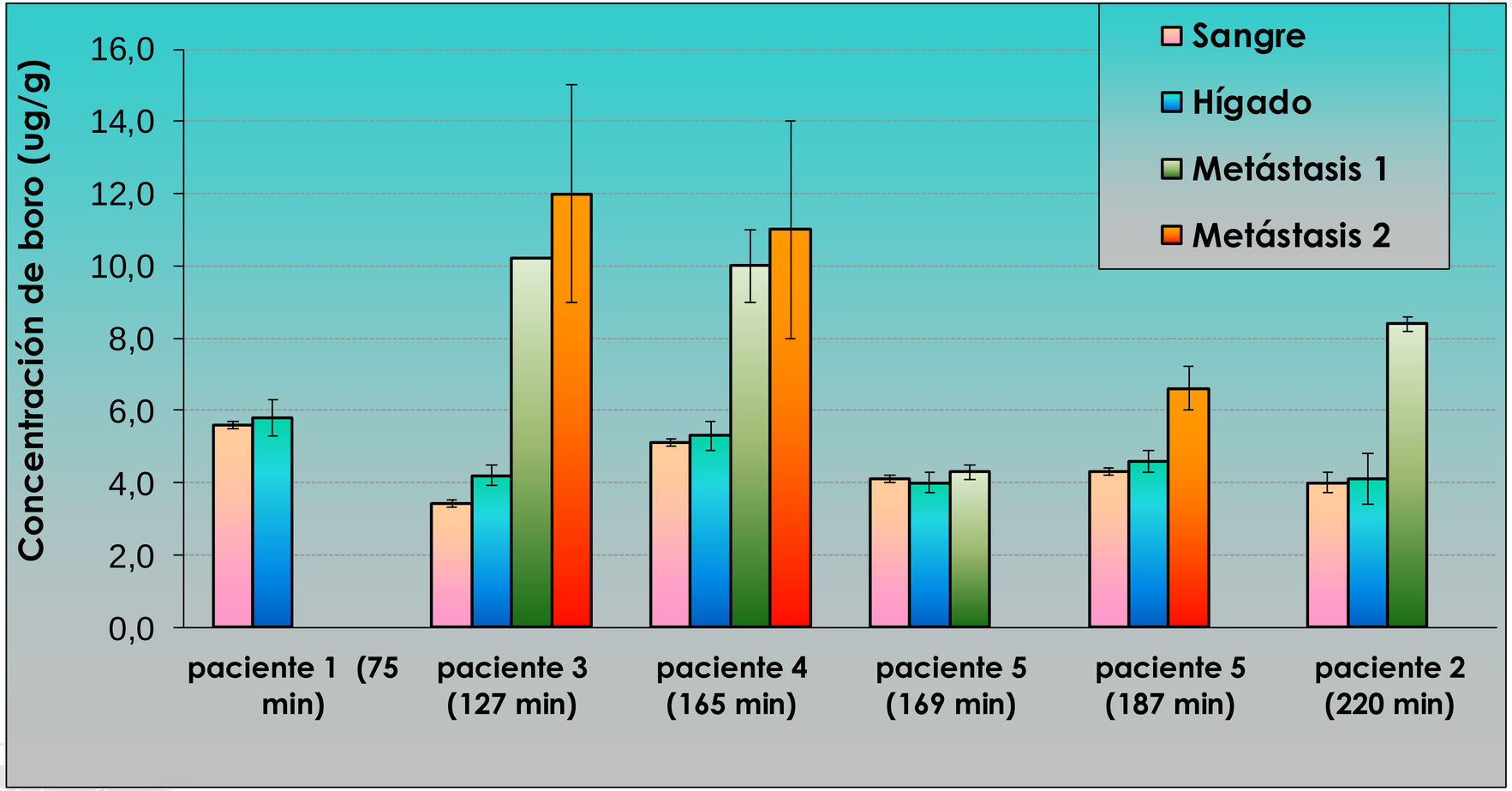
CAB: Centro Atómico Bariloche

CAC: Centro Atómico Constituyentes

Intercomparaciones con ICP-MS

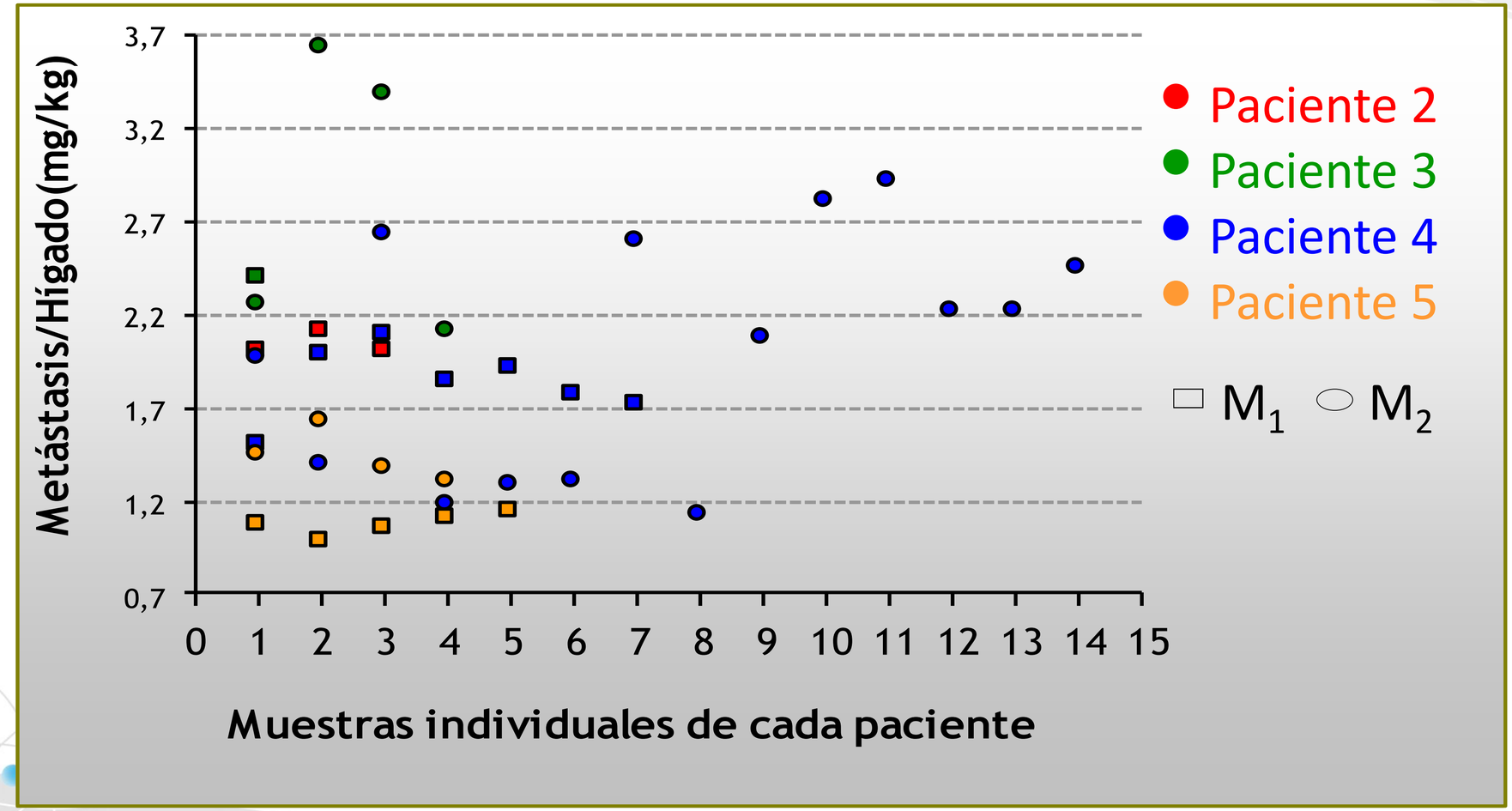
O	MUESTRA	Peso (g)	ICP-MS (ppm)	ICP-OES (ppm)	ppm final	prom	DS
S	EZ6HLiB 300 mg BPA/kg	0,0196	0,114		5,8	5,1	1,1
V	EZ6HLiB 300 mg BPA/kg	0,0405	0,174		4,3		
S	EZ6HLiB 300 mg BPA/kg	0,0283		0,136	4,8	5	0,3
V	EZ6HLiB 300 mg BPA/kg	0,0369		0,191	5,2		
S	EZ14HLiC. S/B	0,0275	0,0014		0,1		
V	EZ14HLiC. S/B	0,0259	0,0008		0		
S	EZ14HLiC. S/B	0,0146		0,002	0		
V	EZ14HLiC. S/B	0,0278		0,015	0		

Biodistribuciones de hígado



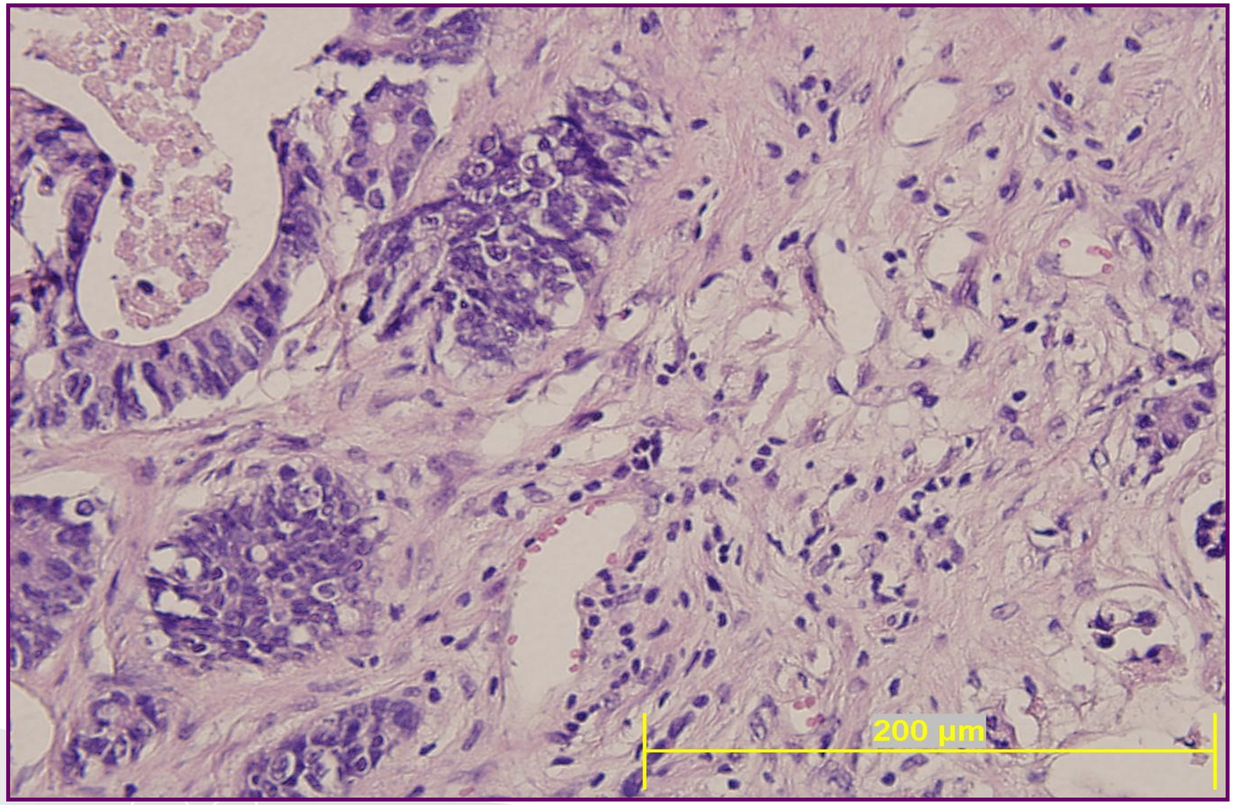
Promedio de concentraciones de boro (± SD) normalizadas a 100 mg/kg BPA, para todos los pacientes. Nievas y col, AATN 2010.

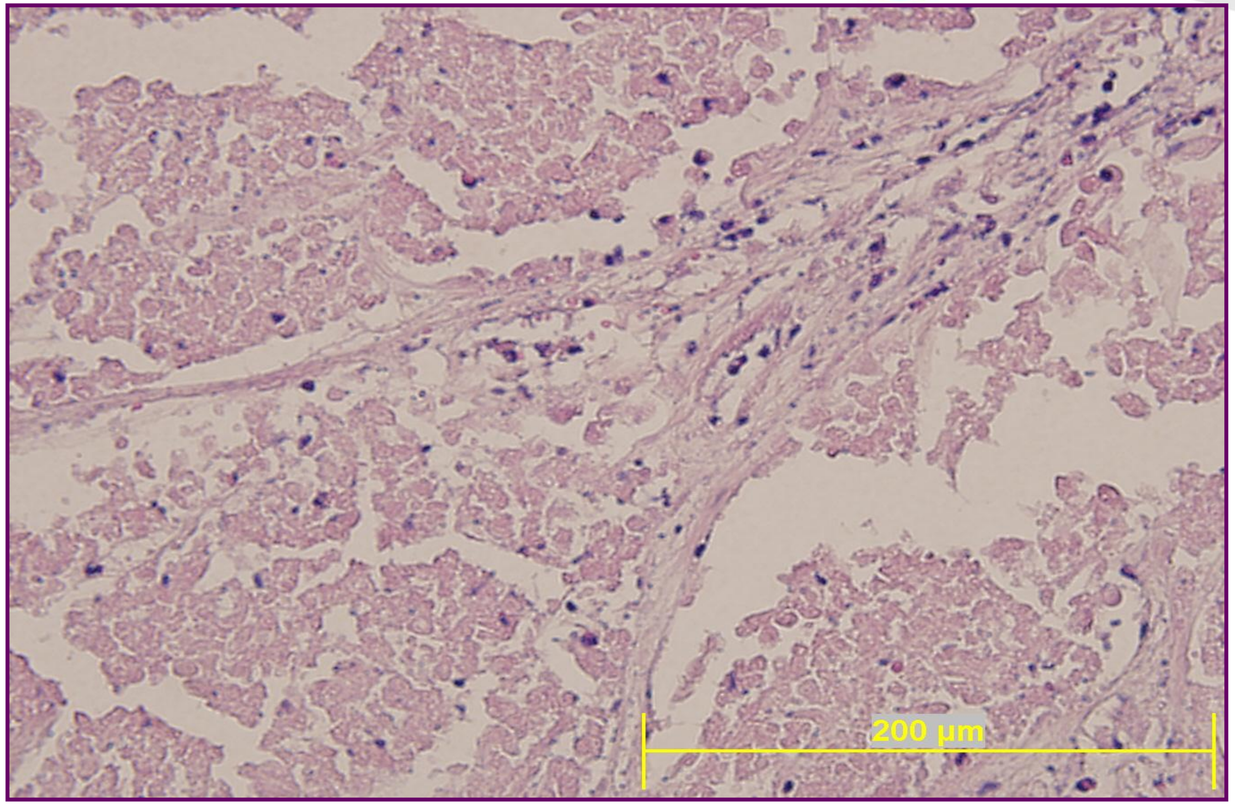
Biodistribuciones de hígado



Relación entre concentración de boro (M/H) en pacientes con metastasis. Nievas y col, AATN 2010.

Biodistribuciones de hígado





Histología de una muestra de metástasis del paciente 4, (dos secciones de la misma muestra). Nievas y col, AATN 2010

Biodistribuciones de hígado

Conclusiones:

✓El cociente de concentración de Boro **sangre/hígado fue cercano a 1**.

✓ El cociente de concentración **metástasis/hígado varió de 0.8 a 3.6**, atribuible a las lesiones histológicas de **necrosis y fibrosis** asociadas a las metástasis.

Muchas gracias!!!