



Facultad de Química
Universidad de la República
Pedeciba Química



Tesis de Maestría en Química

Desarrollo y evaluación química, biológica y dosimétrica del anticuerpo anti-CD20 (Rituximab®) marcado con ^{177}Lu como radiofármaco para tratamiento del Linfoma no Hodgkin.

B.C. Paola Audicio
2011

El presente trabajo para aspirar al grado de Magister en Química de la Universidad de la República y PEDECIBA, fue realizado en el Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

Bajo la dirección de las Doctoras Henia Balter (CIN, Fac. Ciencias, Udelar), Patricia Oliver (CIN, Fac. Ciencias, Udelar) y La Ingeniera Química Ana María Robles (CIN, Fac. Ciencias, Udelar).

1	Resumen.....	6
2	Introducción.....	8
2.1	Linfoma	8
2.1.1	Clasificación.....	9
2.2	LNH de células B.....	12
2.2.1	Manifestaciones clínicas en LNH.....	14
2.2.2	Diagnóstico de LNH.....	15
2.2.3	Evaluación radiológica	15
2.2.4	Tratamiento.....	16
2.3	Anticuerpo anti-CD20	19
2.4	Radiofármacos terapéuticos.....	22
2.4.1	Estrategias de marcación de anticuerpos	28
2.5	Dosimetría y Farmacocinética.....	30
2.5.1	Modelos Empíricos	31
2.5.2	Modelos Analíticos.....	31
2.5.3	Modelos compartimentales	32
3	Objetivo.....	37
4	Materiales y Métodos	38
4.1	Materiales	38

4.2 Equipos	38
4.3 Preparación del precursor de DOTA activado.....	39
4.4 Eliminación de metales del anti-CD20 (Rituximab).....	39
4.5 Conjugación del anti-CD20 con DOTA- Ossu.....	39
4.6 Marcación del conjugado.....	40
4.7 Estudios de estabilidad.....	40
4.7.1 Estudio de estabilidad del conjugado.....	40
4.8 Controles Biológicos.....	42
4.8.1 Estudios de Inmunofluorescencia.....	42
4.8.2 Estudios de biodistribución.....	46
4.9 Evaluación dosimétrica	46
4.9.1 Simulación Monte Carlo.....	46
4.9.2 Dosimetría Interna.....	48
5 Resultados y Discusión.....	50
5.1 Activación de DOTA y conjugación con anti-CD20.....	50
5.2 Marcación del conjugado con ¹⁷⁷ Lu.....	53
5.3 Estudios de Estabilidad.....	56
5.3.1 Estabilidad del conjugado DOTA-anti-CD20.....	56
5.3.2 Estabilidad del marcado.....	57

5.4 Estudios de inmunoafinidad.....	58
5.5 Estudios de Biodistribución.....	61
5.6 Dosimetría.....	67
5.7 Dosimetría Interna.....	69
6 Conclusiones.....	72
7 Bibliografía.....	73

1 Resumen

La presente tesis de maestría en Química fue desarrollada en el Área Radiofarmacia del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias.

El proyecto consistió en el desarrollo de un potencial radiofármaco terapéutico ^{177}Lu -DOTA -anti-CD20 para el tratamiento del Linfoma No-Hodgkin (LNH) en base al radioisótopo Lutecio 177 (^{177}Lu).

El LNH comprende un 5% de todas las neoplasias y causa aproximadamente el 3.4% de todas las muertes por cáncer.

El anticuerpo monoclonal Rituximab[®] reconoce al antígeno de superficie CD20 de los linfocitos B. Este anticuerpo se utiliza en el tratamiento del LNH CD20 positivo. Actualmente, además del Rituximab[®] se encuentra aprobado por la FDA el uso del anticuerpo anti-CD20 asociado con emisores beta (^{131}I , ^{90}Y), los cuales potencian su efecto e incrementan su efectividad terapéutica.

Para el desarrollo del ^{177}Lu -DOTA -anti-CD20 se derivatizó el anticuerpo con el ligante bifuncional DOTA y se estudiaron y optimizaron las condiciones para su conjugación. Posteriormente el conjugado se marcó con ^{177}Lu y se realizaron estudios químicos y biológicos de modo de corroborar la integridad biológica del anticuerpo marcado así como su estabilidad. Se realizaron estudios de dosimetría interna y de simulación Monte Carlo de forma de poder obtener un perfil dosimétrico del radiofármaco, además de poder inferir potenciales aplicaciones dependiendo de la geometría y tamaño tumoral.

El ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 se obtuvo en forma rápida y sencilla, el radioconjugado resultó ser estable tanto *in vitro* como *in vivo* manteniendo sus propiedades químicas y biológicas, con un perfil dosimétrico adecuado para su potencial utilización en clínica.

2 Introducción

2.1 Linfoma

Los linfomas (enfermedades linfoproliferativas) son un grupo heterogéneo de enfermedades malignas que comparten la característica de ser el resultado de una o más mutaciones somáticas en un linfocito progenitor. La progenie de la célula afectada generalmente tiene el fenotipo de célula B o T y también, aunque no tan frecuente, de células NK (natural killer). Cualquier sitio del sistema linfático puede ser la localización primaria donde se origina la enfermedad, incluyendo los nódulos, intestino asociado al tejido linfático, piel y riñones. Los órganos como la tiroides, pulmón, hueso, cerebro o gónadas pueden estar involucrados tanto como metástasis desde los sitios linfáticos, o como manifestaciones primarias extranodulares de la enfermedad.

Por convención, las enfermedades linfocíticas que involucran principalmente a la médula (y la sangre) son llamadas "*leucemias linfoides*", mientras que las originadas en cualquier otro tejido linfoide son llamadas "*linfomas*". En el caso de las leucemias, los sitios linfáticos pueden estar involucrados como sitios secundarios, mientras que en los linfomas la médula es la que se relaciona como sitio secundario.

La incidencia del linfoma ha aumentado en los últimos años, tanto en hombres como en mujeres. El Linfoma No-Hodgkin (LNH) comprende un 5% de todas las neoplasias y causa aproximadamente el 3.4% de todas las muertes por cáncer [1]. En el año 2005 se estimaron más de 56000 casos nuevos y 19200

muertes por LNH en Estados Unidos. El LNH es el sexto diagnóstico más frecuente en hombres norteamericanos y el quinto en mujeres norteamericanas, con un riesgo de vida de uno cada 66 hombres y uno cada 88 mujeres [2]. Entre el año 1998 y el 2002 la tasa de incidencia fue de aproximadamente 19 por 100000 personas por año. En nuestro país, en el año 2000 fallecieron por esta enfermedad 90 hombres y 80 mujeres [3].

2.1.1 Clasificación

Realizar una clasificación de estas enfermedades ha sido difícil, en el año 2001 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una clasificación que es ampliamente aceptada. En esta clasificación se identifican tres grandes categorías basadas en características morfológicas:

- Neoplasias de células B
- Neoplasias de células T y NK (natural killer)
- Linfoma de Hodgkin

Las dos primeras categorías luego fueron reclasificadas en dos subgrupos:

- neoplasias de precursores
- neoplasias maduras y diferenciadas.

Esta clasificación no toma en cuenta el resultado clínico ni el grado histológico. Reconoce que cada enfermedad tiene características clínicas distintivas y responde a un tratamiento que puede correlacionarse con el grado histológico y con patrones de expresión génica. Reconoce también, que muchas de las

enfermedades que describe son heterogéneas y probablemente incluyen 2 o más enfermedades que no pueden ser identificadas con los datos actuales. Dicha clasificación está abierta a incorporar nuevos datos en la medida que estos estén disponibles.

Previamente, en 1994 fue propuesta una clasificación europeo-americana (REAL) por el Grupo Internacional de Estudios de Linfoma. Este grupo también distinguió tres categorías de linfomas que incluyen a las células B, T y linfoma de Hodgkin. Los linfomas fueron definidos según su morfología, inmunología y genéticas. Muchos linfomas fueron asociados con diferentes presentaciones clínicas y algunos casos que no ajustaban en estas categorías no se incluyeron en la clasificación.

Dentro de esta clasificación hay subclasificaciones que dividen a los grupos de células B y T en:

- Linfomas de células precursoras (inmaduras)
- Linfomas de células periféricas (maduras)

En 1974 Kiel realizó una clasificación para el LNH que introdujo la idea de grados en función de la agresividad clínica de cada linfoma. Esta clasificación fue actualizada en 1988 separando los neoplasmas de células B de las neoplasias de células T. La misma ha sido ampliamente utilizada sobre todo en Europa.

Tanto para las de células B como para las de células T se dividen en:

- Grado Bajo
- Grado Alto

Una clasificación tradicionalmente utilizada que surgió también en los años 70s (working formulation) divide los LNH en:

- Grado bajo: Linfocítico pequeño, Folicular de células pequeñas hendidas, Folicular mixto de células pequeñas hendidas y grandes.
- Grado intermedio: Folicular de células grandes, Difuso de células pequeñas hendidas, Difuso mixto de células pequeñas y grandes, Difuso de células grandes.
- Grado alto: Difuso de células grandes, Inmunoblástico, Linfoblástico, Células pequeñas hendidas.

La clasificación de Ann Arbor (1971) surgió originalmente para el linfoma de Hodgkin pero también es utilizada para el LNH. Clasifica los linfomas según los órganos afectados en cuatro estadios:

- Estadio I. Afectación de una única región ganglionar (I) o de un único sitio u órgano extraganglionar (I-E)
- Estadio II. Afectación de dos o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II) o afectación localizada de un sitio extraganglionar u órgano (II-E) y una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma.
- Estadio III. Afectación de regiones linfáticas ganglionares a ambos lados del diafragma (III), que pueden estar acompañadas por afectación localizada de un sitio u órgano extraganglionar (III-E) o esplénica (III-S) o de ambas (III-ES)

- Estadio IV. Afectación difusa o diseminada de uno o más órganos extraganglionares distantes, con o sin afectación asociada de los ganglios linfáticos.

A su vez, todos los estadios se subclasifican para indicar ausencia o presencia de síntomas[4].

En 1993, se propuso un modelo para asignar un pronóstico a los pacientes con LNH agresivo bajo tratamiento con quimioterapia con doxorubicin, llamado Índice Pronóstico Internacional (IPI) [5][6]. Este modelo utiliza datos clínicos como indicadores de factores de riesgo [7]:

- Estadio de la enfermedad (III o IV)
- Nivel sérico de lactato deshidrogenasa (LDH)
- Número de sitios extranodulares afectados (>1)
- Estado del paciente (escala ECOG: >2)
- Edad del paciente (>60 años)

2.2 LNH de células B

Los linfomas No-Hodgkin de células B representan la mayoría de los mismos, aproximadamente el 88% [8]. Derivan de la transformación neoplásica del linfocito B en cualquier estadio de su diferenciación. Los genes involucrados en la diferenciación celular, la apoptosis y el crecimiento, son los responsables de este proceso.

Para mantener la proliferación celular, el material genético está permanentemente en replicación y entrelazamiento. Este proceso comprende la replicación del ADN, la formación de cromosomas durante la metafase, el intercambio de material genético y la conexión en dos nuevas cromátidas homólogas que formarán nuevas células. Una traslocación puede dañar de forma significativa, dependiendo de qué gen específico haya sido afectado, la diferenciación celular y la apoptosis. Si bien deben ocurrir posteriormente diferentes eventos moleculares para que una población de células B se transforme en neoplásica, los eventos moleculares primarios continúan siendo los más relevantes. Las traslocaciones en los loci de los cromosomas tienen un impacto importante en la génesis del linfoma. Una de las traslocaciones mejor estudiadas es la t(14,18) (q32,q21) que provoca la yuxtaposición del gene bcl-2 con el segmento de unión de la cadena pesada de Ig, con la consecuente sobre-expresión de la proteína bcl-2. La sobre-expresión de esta proteína evita la muerte celular por apoptosis e induce un patrón de proliferación policlonal de células B maduras. Esta traslocación es característica del linfoma folicular, si bien puede encontrarse en otros tipos de linfomas [9].

Las células B presentan en su superficie marcadores específicos de linaje B como el CD20, CD19, CD22 y las Ig de superficie. La región variable de la Ig se encuentra mutada frecuentemente, presentando un isotipo único. La proliferación monoclonal conserva antígenos específicos de superficie de su precursor, siendo una característica distintiva de las diferentes entidades.

Muchos factores pueden estar involucrados en la patogénesis de los LNH. Las causas aún son desconocidas pero se asocian a varias razones [1]:

- Exposición prolongada a productos químicos como pesticidas, solventes, herbicidas, postuladas como sustancias carcinogénicas.
- Enfermedades genéticas hereditarias, como el síndrome de Wiskott-Aldrich
- Varias enfermedades virales, como el VIH
- Algunas enfermedades autoinmunes se han relacionado con el LNH, como la enfermedad de Sjögren, LES, tiroiditis de Hashimoto y artritis reumatoidea.

2.2.1 Manifestaciones clínicas en LNH

Las adenopatías son la forma de presentación más frecuente en el linfoma. Corresponden a un agrandamiento no doloroso de los ganglios, de consistencia elástica, en las regiones cervicales, supraclaviculares, axilares o inguinales. También puede presentarse como una linfadenopatía generalizada. La presencia de adenopatías no dolorosas en el cuello, axila o ingle son hallazgos frecuentes en los estadios iniciales del linfoma No-Hodgkin. A medida que progresa la enfermedad, los pacientes desarrollan síntomas sistémicos, como fatiga, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y signos específicos dependiendo de la localización de la enfermedad y los órganos comprometidos.

2.2.2 Diagnóstico de LNH

El diagnóstico de LNH se realiza básicamente a través de la biopsia. Se debe conseguir una muestra adecuada de tejido ya que la certeza diagnóstica mejora con las biopsias de mayor tamaño [10]. Cuando se establece el diagnóstico de linfoma en la muestra primaria (ganglio u órgano afectado) debe realizarse la biopsia de medula ósea para estadificación de la enfermedad.

El análisis histopatológico correcto requiere de una evaluación microscópica, citogenética, técnicas de hibridación in situ (FISH), técnicas moleculares y correlación con los datos clínicos [10].

El examen microscópico es un primer paso fundamental ya que deben describirse la forma celular (pequeñas, grandes, hendidas, redondeadas, etc.), la forma del núcleo, la presencia de nucleolos, citoplasma y existencia de mitosis. El segundo paso es la inmunotipificación, de forma de poder identificar a la población monoclonal y caracterizarla como de células B (CD19, CD20, CD22) o de células T (CD2, CD3, CD7). Una vez establecido el diagnóstico de linfoma, serán necesarias otras inmunotipificaciones con anticuerpos específicos para caracterizar el linfoma (folicular, manto, etc.)

La correcta clasificación del linfoma determinará la utilización del tratamiento más adecuado al mismo.

2.2.3 Evaluación radiológica

La evaluación radiológica del LNH es utilizada para estadificar la enfermedad según la clasificación de Ann Arbor. Siempre se debe obtener una radiografía

de tórax y además puede utilizarse ecografía de abdomen que revela la presencia de hepato o esplenomegalia, ascitis o linfadenopatías retroperitoneales. Sin embargo, el estudio radiológico más importante es la tomografía computarizada con contraste (TAC) ya que presenta mejor definición para localizar sitios anatómicos si bien tiene desventaja en cuanto a la estadificación tumoral por su dificultad para distinguir la benignidad de la malignidad.

La Tomografía por Emisión de Positrones (del inglés: PET) ha demostrado mejorar la exactitud en la detección del LNH comparada con los procedimientos imagenológicos tradicionales. Permite evaluar el compromiso de determinados sitios como medula ósea y bazo con más exactitud, pero no permite cuantificar el tamaño tumoral o determinar la cantidad exacta de áreas anatómicas comprometidas. Por esta razón el estudio PET siempre se debe comparar con la TAC para evitar sesgos de interpretación de las imágenes [11]. Más recientemente, los híbridos PET/CT se han convertido en la modalidad de imagen para la estadificación inicial, seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con linfoma[12][13].

2.2.4 Tratamiento

Los estadios tempranos de LNH asintomático son muy poco frecuentes, comprenden menos del 10% de los pacientes y pueden ser tratados con radioterapia. Los estadios avanzados son tratados con una variedad de regímenes de quimioterapia o inmunoterapia, entre ellos ciclofosfamida, fluradabina y rituximab. Las tasas de respuesta inicial son generalmente entre

50% y 70 % con cualquiera de estos tratamientos. La combinación de drogas como el COP (ciclofosfamida, vincristine y prednisona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicin, vincristine y prednisona) o CHOP-Rituximab, dan como resultado una muy alta respuesta (70%-100%). Aunque la tasa de respuesta inicial de cualquiera de estos tratamientos es muy buena, la mayoría de los pacientes presentan reincidencia, la cual se caracteriza por una menor tasa de respuesta a los tratamientos anteriormente mencionados y transformación en tipos histológicos más agresivos con la consecuente dificultad en el curso clínico del paciente. En estos casos la enfermedad se considera incurable con quimioterapia convencional.

El uso de la radioterapia para el tratamiento del cáncer tiene las siguientes modalidades.

- Irradiación externa.
- Fuentes implantadas.
- Administración sistémica.

La Radioinmunoterapia (RIT) se define como el tratamiento en el cual el efecto citotóxico de las radiaciones ionizantes (radionucleidos) llega al tumor a través de anticuerpos que se unen específicamente al mismo.

DeNardo y col. han publicado varios trabajos sobre el uso de RIT en el linfoma No-Hodgkin utilizando un anticuerpo monoclonal anti-células B marcado con el radionucleido ^{131}I con el cual se obtuvieron óptimos resultados en el 50% de los pacientes tratados [14 -19]. También fueron realizados estudios utilizando

^{90}Y , y así se ha visto que tanto el ^{131}I como el ^{90}Y son radionucleidos emisores beta adecuados para el uso en radioinmunoterapia. En el año 2002 la FDA (Food and Drug Administration) aprobó el uso del ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, CA), el primer anticuerpo radiomarcado para tratamiento de cáncer. Actualmente se encuentran aprobados para uso en humanos dos agentes radioinmunoterapéuticos; ambos utilizan el anticuerpo monoclonal anti-CD20 pero marcado con dos diferentes emisores beta: ^{131}I -anti-CD20 (Bexxar) e ^{90}Y -anti-CD20 (Zevalin), mostrando tasas de respuesta de entre 68% y 83% y remisión completa en 33% de pacientes con LNH en recaída o refractarios a otros tratamientos [20].

El tratamiento con Bexxar consiste en la administración secuencial, primero de una dosis de anticuerpo frío (tositumomab, anticuerpo murino) para mejorar la fijación específica posterior del radiomarcado al tumor [21][22], seguida de la dosis de ^{131}I -tositumomab. El tratamiento también cuenta con un estudio dosimétrico inicial que permite calcular la dosis terapéutica específica para cada paciente, de forma de administrar una dosis corporal total no mayor a 75 cGy en pacientes con recuentos plaquetarios mayores a 150.000. En el caso del tratamiento con Zevalin, se utiliza el anticuerpo quimérico Rituximab como predosis fría y el ^{111}In - ibritumomab tiuxetan (IgG murino) para la toma de imágenes con fines dosimétricos. Esto se debe a que el ^{90}Y es emisor beta puro por lo que no se pueden obtener imágenes centellográficas con el mismo, y es por esto entonces que se usa el ^{111}In que es emisor gamma lo que permite

evaluar la captación y cinética del trazador así como el cálculo de la dosis terapéutica específica para cada paciente.

Los estudios preclínicos y clínicos han demostrado que una predosis con anticuerpo frío optimiza la posterior biodistribución del anticuerpo marcado [23][24]. El anticuerpo frío se une a linfocitos B maduros de la circulación, los cuales son eliminados[25][26], así como también a células que presentan receptores para la fracción Fc en todo el retículo endotelial (ej.: bazo). De esta manera, este anticuerpo frío pre-administrado bloquea la posterior unión del anticuerpo marcado a estos sitios, y por lo tanto mejora la biodistribución del anticuerpo marcado, aumentando la captación por parte del tumor y disminuyéndola en los órganos sanos[27][28]. También ha sido estudiado el ^{188}Re -anti-CD20 como otro posible radiofármaco terapéutico para LNH[29][30].

2.3 Anticuerpo anti-CD20

El anticuerpo anti-CD20 (Rituximab®) es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano IgG kappa que se une específicamente al antígeno CD20, y tiene un peso molecular de aproximadamente 145 KDa. La región variable que reconoce específicamente al antígeno CD20 es de origen murino mientras que la fracción constante (Fc) es humana. La utilización de anticuerpos humanizados minimiza la probabilidad de una respuesta inmune, y por lo tanto de formación de anticuerpos anti-anticuerpos murino, permitiendo así que el anticuerpo pueda ser administrado en sucesivas ocasiones además de de mejorar la farmacocinética del mismo.

El antígeno CD20 es una proteína transmembrana de aproximadamente 35 kD que se encuentra localizada en la superficie de los linfocitos pre-B y B maduros [31][32]. Se expresa en el 90% de los LNH por células B, pero no se encuentra en células germinales hematopoyéticas, en células proB, en células plasmáticas ni en ningún otro tejido normal[54]. El CD20, además, está unido de forma estable a la superficie celular, por lo que es poco probable encontrarlo de forma libre en la circulación sanguínea; y por otro lado el mismo tiene internalización limitada al unirse al anticuerpo[33].

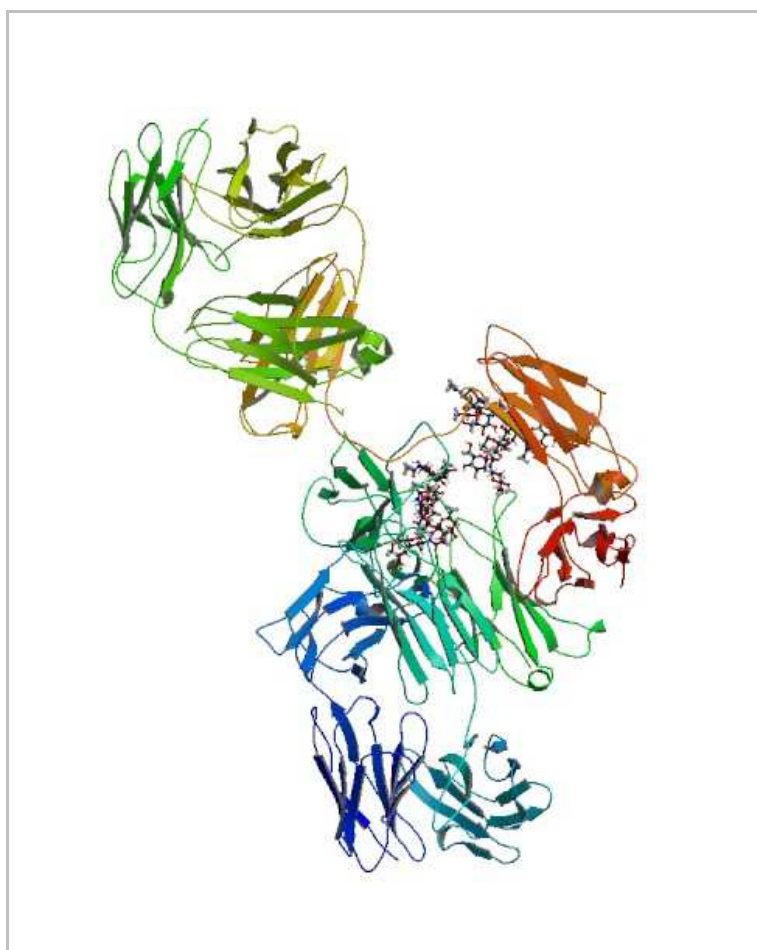


Figura 1 Estructura molecular del anticuerpo anti-CD20 (www.drugbank.ca)

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTL
 GAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATE
 KNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHT
 PYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENE
 WKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEE
 EEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

Figura 2 Secuencia del antígeno CD20 (http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073#target_1)

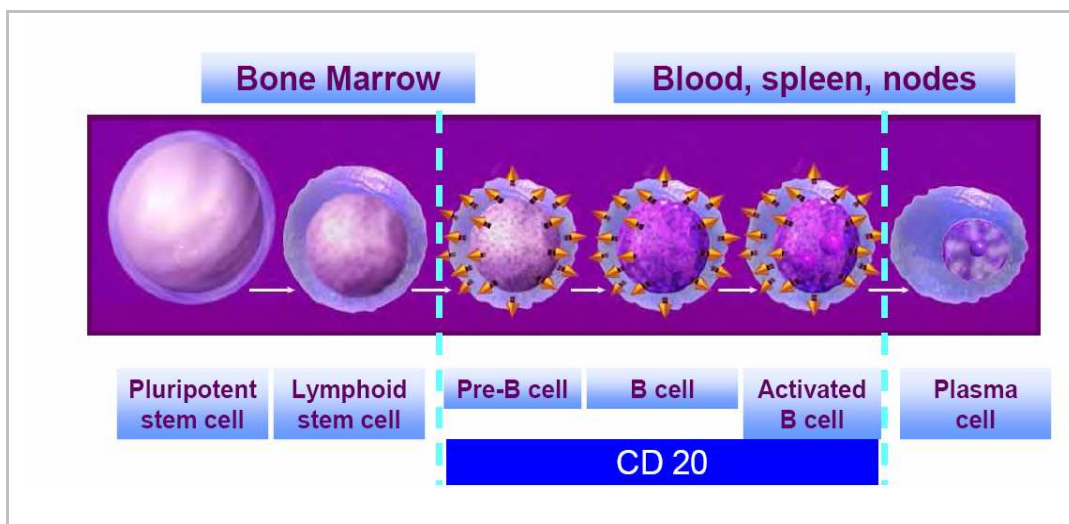


Figura 3 Expresión del antígeno CD20 (http://www.rsc.org/images/steve_mather_tcm18-104080.pdf) Stephen J Mather, Barts and the London, Queen Mary, University of London..

El antígeno CD20 está involucrado en la regulación de las primeras etapas de la activación y diferenciación del ciclo celular y se han reportado trabajos donde se presume que también puede funcionar como un canal de los iones de calcio [35]. Luego de su enlace al CD20, el anticuerpo provoca un aumento de las concentraciones intracelulares de calcio, fosforilación de la tirosina intracelular y activación de la protein-kinasa C.

La especificidad dirigida del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ha quedado demostrada en un gran número de estudios *in vitro*. Tiene una afinidad aparente (IC_{50}) de aproximadamente 8,0 nM [34]. Mientras el dominio Fab del anticuerpo se une al epítotope del antígeno CD20, el dominio Fc recluta células efectoras inmunes para mediar en la lisis de las células B, *in vitro*. Además, este anticuerpo demostró inducir apoptosis en las líneas celulares humanas CD20 positivas.

Se han documentado tres mecanismos de acción *in vitro* de este anticuerpo [36][37][38].

- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)
- Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) a través de su unión al factor de complemento humano C1q, una vez que este anticuerpo ya se fijó al antígeno CD20 en la superficie de las células B [38].
- Inducción directa de apoptosis

2.4 Radiofármacos terapéuticos

Los radiofármacos terapéuticos están constituidos por moléculas diseñadas para transportar dosis terapéuticas de radiación ionizante a sitios específicos del organismo. La radioterapia sistémica ha sido utilizada por décadas, comenzando en el tratamiento de enfermedades tiroideas. Los principales obstáculos en radioterapia sistémica son, la disponibilidad de un radionucleido

adecuado y el mecanismo para ubicar dicho radionucleido en el tejido de interés.

La administración sistémica de radiofármacos permite la aplicación de tratamientos en tumores diseminados o metastásicos. El radiofármaco ideal debe localizarse en altas concentraciones en el sitio de interés de tal forma de poder depositar una dosis citotóxica efectiva de radiación en las células tumorales; debe tener también una rápida depuración del torrente sanguíneo y de otros órganos y tejidos normales a fin de minimizar su efecto sobre ellos.

La radiación ionizante puede dañar el ADN de varias formas distintas, incluyendo la inducción de puntos de mutación o aberraciones cromosómicas, lo que conlleva a la muerte celular [39]. Por otro lado, la radiación ionizante también puede actuar y producir daño en membranas y organelos e iniciar señales de apoptosis [40]. Por lo tanto las células irradiadas pueden morir por mitosis, apoptosis, necrosis y/o muerte metabólica. Se ha encontrado que la apoptosis es una vía muy importante de muerte celular en los linfomas[41][42].

La acumulación del radiotrazador en el tejido tumoral depende de la localización del ligando que se une al blanco específico (receptor, antígeno, etc.) con alta afinidad y especificidad. La alta especificidad con la que se une al blanco específico tiene como resultado la unión a membrana y puede dar lugar a internalización y distribución selectiva del radiotrazador.

Al diseñar un radiofármaco se deben tener ciertas consideraciones importantes para que el mismo cumpla con su objetivo, ya sea con fines diagnósticos o terapéuticos:

- Interacciones biológicas

Los radiofármacos pueden tener diversas interacciones biológicas en la circulación sanguínea. Entre ellas: unión al blanco específico, unión a proteínas, y reacciones químicas entre el radiofármaco e iones metálicos (Ca^{+2} , Fe^{+3} , etc) o quelantes “nativos” (aminoácidos, transferrina, etc.). Mientras que la unión a blancos específicos es necesaria, la unión a proteínas es determinante y tiene importante impacto en el tiempo de retención sanguínea y en la relación tumor-background. Las reacciones químicas *in vivo* son la principal fuente de toxicidad radiactiva [43].

- Consideraciones farmacocinéticas

Para un radiofármaco de diagnóstico, la primera consideración a tener en cuenta es que la molécula marcada sea capaz de dar una alta relación tumor-background en un corto período de tiempo. Es por ello que se espera que el radiofármaco tenga un período de residencia en sangre corto y por lo tanto, una rápida depuración sanguínea para minimizar la irradiación de tejido sano. Por otro lado, también es necesario que permanezca el tiempo suficiente como para llegar al sitio de interés y acumularse allí. Uno de los desafíos asociados a los anticuerpos marcados para obtención de imágenes es que tengan una cinética adecuada para alcanzar el sitio de interés, unirse a su blanco específico rápidamente de forma de maximizar la actividad en ese sitio y una cinética adecuada para depurarse de la circulación sanguínea. Por otro lado, el radiofármaco debe tener una rápida eliminación renal para evitar acumulación en el tracto gastrointestinal, la cual puede dificultar la visualización de sitios de

interés en el abdomen. Esto último, es particularmente importante para los radiofármacos terapéuticos ya que la excreción hepato-biliar generalmente conlleva a una acumulación elevada en el tracto gastrointestinal y por lo tanto a una elevada irradiación de tejido sano como el hígado [43].

- Radionucleido adecuado

Actualmente se utilizan una serie de distintos radionucleidos para marcar anticuerpos con fines terapéuticos (Tabla 1). Muchos de estos radionucleidos emiten partículas β^- , las cuales representan la principal fuente terapéutica de estos isótopos. Estas partículas son especialmente útiles en radioterapia dirigida debido a su relativo amplio rango de alcance en tejidos por lo cual se ven afectadas no solo las células tumorales directamente unidas al anticuerpo sino también células tumorales no unidas al mismo.

También se han estudiado anticuerpos marcados con emisores alfa, como el ^{211}At y el ^{212}Bi , pero su aplicación debe ser loco-regional. [44][45]

Los radionucleidos utilizados en radioterapia dirigida se pueden dividir en dos grupos basados en sus características químicas: halógenos (Ej: ^{131}I) y radiometales (Ej: ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu).

Generalmente los halógenos, ^{131}I , se unen al anticuerpo fácilmente y de forma directa a través de la técnica de Iodogen (Pierce, Rockford, IL) o de Cloramina T, mientras que los radionucleidos metálicos requieren generalmente del uso de agentes quelantes como DTPA o DOTA.

Los radionucleidos metálicos son de particular interés para el desarrollo de radiofármacos terapéuticos debido a su amplio rango de propiedades nucleares (tipo de radiación y período de semidesintegración) y debido a su química de coordinación.

El Lutecio 177 (^{177}Lu) es un lantánido ($[\text{Xe}] 4f^{14}5d^16s^2$) producido en reactores nucleares. Una forma de producción involucra la irradiación de ^{176}Lu en un reactor, a través de lo cual se obtiene ^{177}Lu con un alto rendimiento, buena actividad específica y a un bajo costo. Otra forma de producción del ^{177}Lu es por reacción nuclear indirecta, a través de la irradiación de ^{176}Yb . La aplicación de una u otra reacción depende del flujo neutrónico del reactor en el que se produzca. El ^{177}Lu se caracteriza por tener un período de semidesintegración de 6.75 días, 3 tipos de emisión beta de distintas energías (12%= 0.176 MeV, 9%= 0.384 MeV y 79%= 0.497 MeV) y dos tipos de emisión gamma (6.4%= 113 keV y 11%= 208 keV) (Figura 4)[46]. Su emisión gama permite adquirir imágenes, mientras que su emisión beta de casi 0.5 MeV permite utilizarlo en terapia con un rango de penetración en tejidos de 0.28 mm. Presenta diversas ventajas en comparación con otros radionucleidos actualmente utilizados para terapia (^{90}Y , ^{131}I , ^{188}Re), como ser: baja penetración en tejidos, baja dosis en órganos no blanco, presencia de radiación gamma de baja energía y baja abundancia, y adecuada vida media.

Radioisótopo	Período de semidesintegración(h)	Radiación emitida	Energía (KeV)	Penetración en tejido (mm)
¹³¹ I	193	Beta,	610	0.4
		Gamma	362	
⁹⁰ Y	64	Beta	2250	2.5
¹⁸⁶ Re	89	Beta	1074	0.9
		Gamma	137	
¹⁸⁸ Re	17	Beta	2118	2.4
		Gamma	155	
¹⁷⁷ Lu	158.4	Beta	500	0.28
		Gamma	208	

Tabla 1 Características de los radionucleidos actualmente utilizados en terapia.

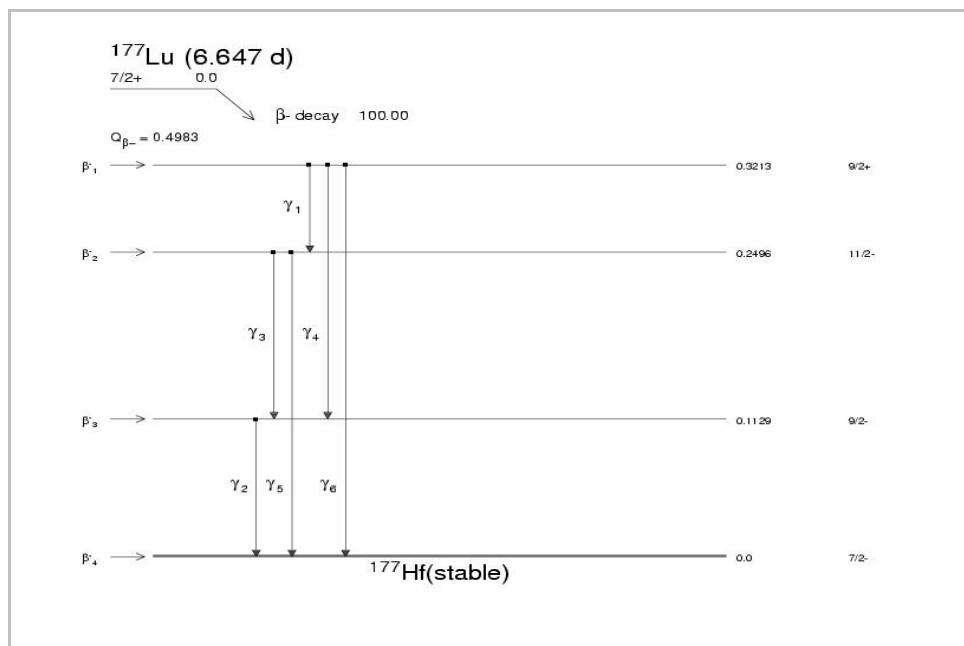


Figura 4 Espectro de emisión del ^{177}Lu (http://www.nndc.bnl.gov/useroutput/177lu_mird.html)

2.4.1 Estrategias de marcación de anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser marcados directamente en un único paso, a través de la formación de una unión covalente o un enlace de coordinación entre el radionucleido y un átomo del esqueleto carbonado. Este tipo de marcación, donde se forma una unión covalente de fuerza considerable, es posible principalmente con los átomos no metálicos, como los halógenos (^{131}I).

En el caso de los radionucleidos metálicos, solo se puede utilizar el método de marcación directa con unos pocos radionucleidos, como por ejemplo el $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

La mayoría entonces de los radionucleidos metálicos solo pueden unirse a las proteínas a través de un agente quelante que forme complejos de coordinación.

Los agentes quelantes bifuncionales contienen un grupo reactivo a partir del cual se unen al anticuerpo y por otro lado forman complejos estables (“cores”) con iones metálicos.

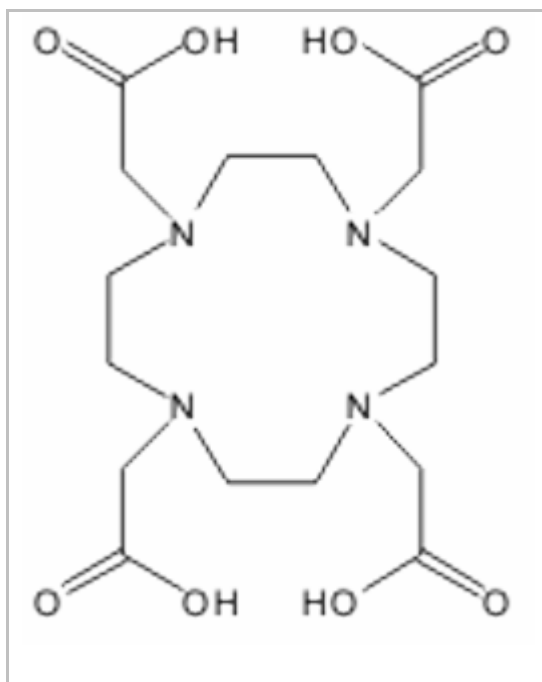


Figura 5 Agente quelante bifuncional DOTA

El ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano -N,N',N'',N''' tetraacético (DOTA) es un agente quelante caracterizado por una estructura cíclica de 12 átomos que contiene un anillo quelante y 4 grupos acéticos carboxílicos (Figura 5). La formación de derivados a partir de sus átomos de C o N producen un agente quelante bifuncional capaz de unirse a proteínas y a radionucleidos metálicos formando complejos fuertes y estables con índice de coordinación 8. Uno de los métodos de derivatización del DOTA consiste en introducir una modificación en uno de sus grupos carboxilo a fin de formar un espaciador que pueda luego ser unido a una proteína [47]. La estabilidad de los complejos formados entre iones metálicos y DOTA ha sido muy estudiada [48 - 65].

2.5 Dosimetría y Farmacocinética

Existen marcadas diferencias farmacocinéticas en la aplicación de un determinado radiofármaco. Por ejemplo, para los anticuerpos monoclonales se encuentran diferencias entre especies, individuos, anticuerpos, radionucleidos, modos de administración y cantidades administradas.

Es de gran importancia la correcta estimación de la dosis absorbida en un paciente tanto en el tejido blanco como en los tejidos adyacentes luego de la administración de un radiofármaco. Esta dosis de radiación absorbida será el producto de los factores dependientes del tiempo (biocinéticos) por aquellos que son independientes del tiempo como el tipo y energía de emisión del radionucleido. Para poder evaluar los parámetros dependientes del tiempo, es necesario realizar cálculos sobre bases individualizadas o personalizadas. Para ello se estudian modelos farmacocinéticos que sean lo más cercano a la realidad.

Estos modelos se dividen por lo general en tres tipos:

- Empíricos o de integración directa
- Analíticos o análisis de regresión “mínimos cuadrados”
- Compartimentales o modelo compartimental

El intercambio de fármacos entre tejidos sigue generalmente una cinética de primer orden, es decir, la velocidad de intercambio es proporcional a la concentración de un solo compuesto. Por lo tanto las curvas de actividad vs tiempo se ajustan a una función exponencial.

2.5.1 Modelos Empíricos

A través de la obtención de una serie de medidas de concentración del radionucleido en diferentes tejidos u órganos y graficándolos en función del tiempo post-administración, se obtiene una curva que puede ser caracterizada como un modelo farmacocinético empírico debido a que es una descripción matemática de la distribución del radionucleido incorporado cuya información derivó de la medición directa. Este método tiene su mayor aplicación en el desarrollo de nuevos radiofármacos, especialmente durante su evaluación biológica en animales.

El área bajo la curva actividad vs tiempo puede ser evaluada por métodos de integración numérica simples y obtener la actividad acumulada, un parámetro biocinético necesario para el cálculo de dosis absorbida.

La extrapolación de los datos de los animales a humanos no es una ciencia exacta, pero algunas veces se pueden introducir factores de peso para correlacionar tales datos. La extrapolación puede convertir el porcentaje de dosis depositada por órgano en animal a porcentaje de dosis por órgano en el humano. Esto se consigue al corregir la fracción de peso que representa el órgano respecto al tamaño corporal en ambas especies.

2.5.2 Modelos Analíticos

Los datos biológicos obtenidos pueden ajustarse a una función analítica, también conocida como “función de distribución”. En el modelo analítico queda

implícito que la curva de actividad en función del tiempo puede ser ajustada a una función dependiente del tiempo.

2.5.3 Modelos compartimentales

En este modelo, el sistema biológico es tratado como compartimentos interconectados como un ensamble de unidades físicas y químicas idénticas. Cada ensamble es una entidad anatómica identificable, una entidad fisiológica identificable o una entidad física identificable.

Los factores que determinan la cantidad de dosis absorbida por un órgano son:

- Los parámetros biológicos (modelo biocinético) que describen la captación, distribución, retención y liberación del radiofármaco en el órgano en particular y en el cuerpo en general.
- La energía emitida que es absorbida en el blanco.
- La fracción de energía emitida que es absorbida en el blanco.

En el año 1968, el Medical Internal Dose Committee de la Sociedad de Medicina Nuclear de Nueva York (MIRD) adoptó esta metodología [61][62][63][64]. Si se describe la función con que varía la actividad a lo largo del tiempo en un cierto órgano o región, las contribuciones de esta actividad a la dosis total se pueden expresar por la Actividad Acumulada (A_i) en un órgano o región del organismo (p), entonces la dosis total viene dada por:

$$A = \int_0^t A_p(t) dt \quad [\text{MBq}\cdot\text{s}]$$

La actividad $A_p(t)$ se ve afectada por factores tales como: cantidad inicial suministrada en el sitio de captación y cinética de captación y eliminación del radiofármaco usado.

El tiempo de residencia τ se define como:

$$\Gamma = \frac{A_p}{A_0} \quad [h]$$

siendo A_0 la actividad inicial.

Es importante determinar la actividad acumulada en el órgano desde su entrada hasta su completa eliminación del sistema, ya sea por decaimiento o por algún mecanismo de depuración biológica.

Existen muchos mecanismos de eliminación por los que los radionucleidos se depuran de un órgano dado. Si además del decaimiento, consideramos un mecanismo de eliminación biológica cuya cinética es proporcional a la actividad presente, entonces para este sistema monocompartimental, donde la constante de eliminación es λ_{bio} podemos escribir la expresión siguiente:

$$A(t) = A_0 e^{-(\lambda_{\text{bio}} + \lambda_{\text{fis}})t}$$

Entonces definimos una constante de decaimiento efectiva λ_{ef} :

$$\lambda_{ef} = \lambda_{fis} + \lambda_{bio}$$

El período de semidesintegración efectivo será:

$$T_{eff} = \frac{T_{fis} T_{bio}}{T_{fis} + T_{bio}}$$

Con frecuencia el modelo monocompartimental es insuficiente para describir la cinética. Por ello, en la mayoría de los casos en radiofarmacia se considera un modelo bicompartimental abierto con dosis única intravascular.

Con la intención de simplificar los cálculos dosimétricos en la rutina clínica, se modificó la metodología MIRD, de modo de proporcionar toda la información física de una forma más sencilla. De la ecuación general de la dosis tenemos:

$$\bar{D}(k \leftarrow h) = \frac{\bar{A}}{m_k} \sum_i \Delta_i \phi_i(k \leftarrow h) = \bar{A} \sum_i \Delta_i \Phi_i(k \leftarrow h)$$

Siendo Δ_i la energía promedio emitidas por unidad de actividad acumulada y Φ_i las fracciones específicas absorbidas que dependen de las propiedades de la emisión.

La única variable que contiene la información biológica en esta fórmula es la actividad acumulada A_h . Como hemos dicho, se puede determinar experimentalmente o determinar a través de modelos farmacocinéticos para el compuesto de interés. Para incluir la información física y de la geometría restante se ha definido el Factor S:

$$S(k \leftarrow h) = \sum_i \Delta_i \Phi_i(k \leftarrow h) \left[\frac{\text{Gy}}{\text{MBq}\cdot\text{s}} \right]$$

De este modo la ecuación general se reduce a:

$$\bar{D}(k \leftarrow h) = \bar{A}_h S(k \leftarrow h) \quad [\text{Gy}]$$

En el caso de varios órganos:

$$\bar{D}(k) = \sum_i \bar{A}_i S(k \leftarrow h)$$

El Factor S incorpora la masa del órgano así como la geometría. La aproximación se efectúa tomando el modelo anatómico del hombre estándar de 70 Kg y han sido calculados de manera análoga a lo realizado con las fracciones absorbidas. Algunos detalles del fantoma han sido modificados para hacerlo un modelo más realista. En caso de órganos huecos, como vejiga y el tracto gastrointestinal, se diferenciaron entre las paredes y su contenido.

La generación de tablas de Factores S ha simplificado enormemente la dosimetría clínica, ahorrando la laboriosa preparación de tablas de constantes Δ_i y de las fracciones absorbidas ϕ_i .

El programa de computación MIRDOSE se desarrolló para realizar el cálculo de dosis a órganos en medicina nuclear. El código se renombró OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment) [65] para distinguirlo de las actividades del MIRD y para integrar el nombre dentro de un nuevo sistema unificado de

evaluación de la dosis interna y externa. Este programa contiene la información del esquema de decaimiento de 59 radionucleidos y calcula cada vez los Factores S a partir de las fracciones absorbidas y constantes Δ_i . El usuario solo debe proporcionar la actividad acumulada (tiempo de residencia) para que el programa entregue la dosis absorbida en veinticinco órganos blanco. Debido a que el programa está diseñado para una estimación de la dosis absorbida basándose en un modelo humano específico, la dosis puede diferir apreciablemente de las estimaciones. Además se debe tener presente que los resultados dependen de la exactitud con que se determinan los parámetros biológicos, específicamente la actividad acumulada en los órganos fuente.

El programa también calcula los Factores S para modelos que representan niños y mujeres adultas. También es posible hacer aproximaciones de la dosis estimada para otros órganos distintos de los estándares considerados, mediante las fracciones absorbidas para variedad de formas geométricas que pueden ser usadas como aproximaciones de los órganos.

3 Objetivo

Sintetizar el conjugado DOTA-anti-CD20 y analizar las propiedades que resultan de dicha conjugación y su marcación con ^{177}Lu en comparación con el monoclonal nativo, a fin de evaluar su potencial aplicación en humanos para el tratamiento del Linfoma no Hodgkin.

4 Materiales y Métodos

4.1 Materiales

Anticuerpo anti-CD20 (Rituximab®, Roche); $^{177}\text{LuCl}_3$ (MURR); ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N''' tetraacetico (DOTA, Macrocyclics); N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, Pierce); 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida cloridato (EDC, Pierce); H₂O purificada (mili Q); NaOH (J.T. Baker); HCl (36.5-38.0%, J.T.Baker); NaCl (Fluka-Garantie); EtOH (BioPak); Amoníaco (Merck); Acetato de sodio (Riedel-deHaen); Acetato de amónio (J.T.Baker); Acetonitrilo (ACN, J.T.Baker); ácido trifluoroacetico (TFA, J.T.Baker); ácido gentísico (Aldrich); seroalbumina bovina (BSA, Sigma); ITLC-SG (Pall Corporation); Watman 3MM (Whatman International Ltd), Columna PD 10 Sephadex G-25 (Pharmacia) ; TRIS (Sigma); MgCl₂ (Mallinkdrodt).

4.2 Equipos

Detector de centelleo sólido NaI(Tl) (ORTEC); Calibrador de dosis (CAPINTEC CRC7); Espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV 1603); Contador Gama automático (Compac 120 Picker, USA); Centrífuga refrigerada (IEC-Centra 8); espectrómetro de masa (4800 MALDI TOF/TOF, abi sciex); HPLC (Varian 5000 Liquid Chromatograph, Integrador 4290 Varian); Detector gama y UV; Columna Agilent de separación de proteínas de 25 cm; Gamma cámara (Sopha cámara).

4.3 Preparación del precursor de DOTA activado.

Como primer paso se preparó un precursor, el éster de DOTA N-Hidroxisulfosuccinimida (DOTA-Ossu) el cual se utilizó luego para conjugar al anticuerpo a través de los residuos lisina del mismo. Este paso se basó en la técnica de síntesis reportada por Lewis y co. [52]. Para esto se incubaron 128 μmol de DOTA, 128 μmol de sulfo-NHS en 960 μl de agua purificada y libre de metales y 12.8 μmol de EDC, durante 45 min a 4°C.

4.4 Eliminación de metales del anti-CD20 (Rituximab)

Previo a la etapa de conjugación del anti-CD20 (Rituximab), la purificación del mismo es de suma importancia ya que es necesario trabajar en condiciones libres de cualquier metal. La eliminación de la presencia de posibles trazas metálicas y excipientes en la solución de anticuerpo monoclonal anti-CD20 se realizó purificando el mismo por columna PD10, con buffer de elusión Bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.5.

4.5 Conjugación del anti-CD20 con DOTA- Ossu

El conjugado anti-CD20-DOTA-Ossu se preparó incubando 5 mg (0.1 μmol) del anticuerpo previamente purificado, con 235 μl (2.98 μmol) de la mezcla de reacción de DOTA activado. Se ajustó el pH de la solución entre 7.5-8.5 con NaOH 0.1M y se incubó la reacción durante 18 - 24 hs a 4°C con agitación. Posteriormente se purificó por cromatografía de exclusión molecular (columna PD-10) con buffer acetato de amonio 0.25M pH 7 como eluyente, colectando fracciones de 0,5 ml. Estas fracciones se controlaron midiendo su absorbancia

(Abs) a 280 nm, determinando así la concentración proteica de cada una de ellas.

4.6 Marcación del conjugado

La marcación con ^{177}Lu se llevó a cabo por incubación del conjugado con $^{177}\text{LuCl}_3$ en presencia de ácido genticónico y a pH 5.5.

A 0.5 mg del anticuerpo activado se le agregaron 100 μl de ácido genticónico (10 mg/ml) y 55.5 - 185.0 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$ en HCl 0.1N incubándose a 37°C por 30 min. Se controló el rendimiento de marcado y luego se purificó tanto por gel filtración en PD10 (Sephadex G25) recolectando fracciones de 0.5 ml y utilizando como buffer de elución acetato de amonio 0.25 M pH 7, como por HPLC utilizando buffer fosfato 0,2 M, flujo de 0,7mL/min, en columna Agilent de 25 cm y midiendo su actividad con un detector gama on line.

4.7 Estudios de estabilidad

4.7.1 Estudio de estabilidad del conjugado

Se estudió la estabilidad del conjugado DOTA-anti-CD20 a 2 temperaturas distintas de almacenamiento (-20°C y 4°C) y durante diferentes períodos de tiempo, a través de su marcación con ^{177}Lu y sus correspondientes controles fisicoquímicos.

A su vez se realizó también el control del DOTA-anti-CD20 almacenado a 4°C por espectrometría de masa, pudiéndose determinar así el número de moléculas de DOTA unidas por molécula de anticuerpo.

4.7.2 Estudio de estabilidad del marcado

Se estudió la estabilidad del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo, así como su estabilidad en suero humano y suero fisiológico (NaCl 0.9%). Para ello se incubó el ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 en NaCl 0.9% y en suero humano en una relación 1/10 (10 -15.5 MBq/ml) a 37°C. Se realizaron controles a los 30 min, 1, 24, 48 y 72 hs post incubación.

Los mismos se efectuaron a través de cromatografía de capa fina, utilizando 3 sistemas: ITLC-SG embebida en BSA 5%, ITLC-SG y Whatman 3MM como soportes y EtOH:NH₃:H₂O (2:1:5), acetato de sodio 14% y H₂O:ACN (50:50) con TFA al 0.1% como fases móviles respectivamente.

Control	Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula
1	ITLC-SG-BSA	EtOH:NH ₄ OH:H ₂ O (2:1:5)	0	Lu(OH) ₃
			0.4-0.8	^{177}Lu -anti-CD20
			1	^{177}Lu - libre
2	ITLC-SG	Acetato de sodio 14%	0	^{177}Lu -anti-CD20
			0.9-1.0	^{177}Lu - libre
3	W 3MM	H ₂ O:ACN(50:50) con TFA al 0.1%	0	^{177}Lu -anti-CD20
			0.7	^{177}Lu - libre

Tabla 2 Sistemas de cromatografía de capa fina

4.8 Controles Biológicos

4.8.1 Estudios de Inmunofinidad

Las metodologías empleadas se basan en los trabajos de Oliver y col. [72][73][74][75].

4.8.1.1 Preparación de extractos de membrana

La extracción y concentración de membranas plasmáticas a partir de leucocitos ricos en antígeno CD20 se realizó a través de muestras obtenidas de filtros de transfusión plaquetaria. Para ello se extrajo el contenido de los filtros con buffer Tris-Mg 25mM (buffer de ensayo) procediéndose posteriormente al procesamiento del mismo según el siguiente protocolo desarrollado localmente: homogeneización a máxima velocidad seguida de centrifugación a 500 xg durante 10 minutos a 4°C y conservación del sobrenadante obtenido. Repetición de dicha secuencia 2 veces más juntándose entonces los 3 obtenidos y centrifugándose a 40.000 xg durante 50 minutos a 4°C. El pellet final obtenido se resuspende en 1 mL de buffer de ensayo, evaluándose su concentración proteica a través de la medida de Abs a 280 nm de una alícuota del mismo. Con este dato, se realiza una dilución de manera tal que su concentración proteica final sea de aproximadamente 10 mg/mL. El extracto de membranas así obtenido se fracciona y se almacena a -70°C para ser usado posteriormente en distintos estudios de bioespecificidad a lo largo del tiempo, debido a que estas preparaciones han demostrado una excelente reproducibilidad y estabilidad de más de 6 meses a -70°C .

4.8.1.2 Ensayo de Máxima Capacidad de Unión (MCU)

Estos ensayos se utilizan para estudiar la capacidad de unión del anticuerpo radiomarcado a su antígeno específico, así como la competencia con el mismo anticuerpo no marcado (frío).

Se evalúa entonces la capacidad de unión máxima (B_0) de una cantidad fija del anticuerpo marcado (trazador) a concentraciones crecientes del extracto de membranas restando en cada caso la unión inespecífica (UNE) del mismo mediante la competencia con el mismo anticuerpo frío en una concentración entre 10.000 a 100.000 veces mayor que la del trazador.

Para este estudio entonces se procedió de la siguiente manera:

Primero se bloquearon todos los tubos con BSA al 10%. Luego, en los tubos destinados al análisis del B_0 se agregaron 50 μL de buffer Tris Mg 25mM (buffer de ensayo) en tanto que en los tubos destinados a analizar la unión no específica (UNE) se agregaron 5 μL (50 μg) del anti-CD20 frío. Se prepararon varias diluciones distintas del concentrado de antígenos CD20 con buffer de ensayo y se distribuyeron 200 μL en los tubos correspondientes a cada concentración. A continuación en cada tubo se agregaron 10 μL (0.5 - 0.15 μg) de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 con un nivel de actividad de entre 20.000 y 30.000 cpm por tubo, se agitaron suavemente y se dejaron incubando a 4°C durante 24 hs. Pasado este tiempo de incubación se adicionaron 2 mL por tubo de PBS-SAB (buffer fosfato 0.05M, 0.16% NaCl, 0.2% seroalbumina bovina) y se dejaron incubando durante 30 minutos más a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 50 min a 2500 $\times g$ y se aspiró y descartó el sobrenadante de cada uno de

ellos. Por último entonces se midió la actividad del pellet formado en cada tubo en contador de pozo automático.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el valor de la MCU por regresión lineal graficando el inverso de la unión específica ($B_0 - UNE$) en función del inverso del volumen de la solución de antígeno original presente en la dilución utilizada. El inverso del término independiente de la ecuación de la recta resultante corresponde a la unión a concentración infinita del antígeno y por lo tanto al valor de la máxima capacidad de unión de ese trazador (MCU).

4.8.1.3 Ensayos de inhibición o competencia

Este ensayo se utiliza para conocer la afinidad del ligando frío (en nuestro caso el anti-CD20) por su blanco molecular (en nuestro caso el antígeno CD20).

Por lo tanto estos ensayos de inhibición estudian la capacidad de competencia entre niveles crecientes de ligando frío y una cantidad fija del ligando radiomarcado por los sitios de unión de una cantidad constante del extracto de membranas que contiene su blanco molecular específico en alta concentración.

Para este estudio de inhibición se incubaron en nuestro caso, una cantidad constante del antígeno CD20 con una cantidad también constante del anticuerpo anti-CD20 radiomarcado y con diferentes concentraciones del mismo anticuerpo frío.

Además se analizó la unión no específica (UNE) del mencionado trazador mediante la competencia con el mismo anticuerpo frío en exceso de masa (entre 10.000 a 100.000 veces mayor que la del trazador).

Para este estudio entonces se procedió de la siguiente manera:

Se bloquearon todos los tubos con 50 μ L de BSA al 10% en cada uno de ellos. Luego se distribuyeron 50 μ L de buffer Tris-Mg 25 mM solo en los tubos destinados a analizar la unión máxima (B_0) y 5 μ L (50 μ g) del anti-CD20 no marcado o frío en exceso de masa solo en los tubos destinados a analizar la UNE.

A continuación se distribuyeron en todos los tubos 100 μ L (6mg/mL) del concentrado de membranas debidamente homogeneizado y en la dilución adecuada para este análisis, la cual se determinó a partir del ensayo de MCU.

Por último se agregaron en todos los tubos 50 μ L del trazador con un nivel de actividad entre 100.000 a 150.000 cpm por tubo, se agitaron suavemente y se dejaron incubando a 4°C durante 24 hs. Pasado este tiempo se adicionaron 2 mL por tubo de PBS-SAB (buffer fosfato 0.05M, 0.16% NaCl, 0.2% seroalbumina bovina) y se dejaron incubando durante 30 minutos más a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 50 min a 2500 xg y se aspiró y descartó el sobrenadante de cada uno de ellos. Por último entonces se midió la actividad del pellet formado en cada tubo en contador de pozo automático.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el valor de IC_{50} que, por definición, representa la concentración de ligando no marcado (frío) que es capaz de inhibir (por competencia) el 50% de la unión máxima del ligando radiomarcado (trazador) a su sitio específico de reconocimiento y su análisis nos permite estudiar la afinidad del ligando en uso ya que la IC_{50} se corresponde con el inverso de la K_{aff} . Para el cálculo de este parámetro de IC_{50}

se utilizó el programa matemático Origin.

4.8.2 Estudios de biodistribución

Se realizaron estudios de biodistribución a distintos tiempos post-inyección (4, 16, 24 y 120 hs). Para ello se usaron ratones machos CD1 normales de entre 27.5 y 32.5 grs (n=3), inyectados por vía intravenosa con 1.5 - 18.5 MBq de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20. Por otro lado, se realizaron estudios de biodistribución con administración previa de distintas dosis de anticuerpo frío. Para esto, se inyectaron por vía intravenosa 150 mg/m², 250 mg/m², 500 mg/m² y 1000mg/m² de anticuerpo frío en ratones machos CD1 normales de entre 20 - 27 grs (n=3). Pasadas 3 hs se les inyectó entre 3.7-8.8 MBq de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 y a las 16h post- inyección fueron sacrificados.

En todos los casos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, inmediatamente se extrajeron los órganos de interés, se pesaron y se midió la actividad de cada uno de ellos en un contador de centelleo sólido.

Todos los estudios con animales de experimentación fueron realizados siguiendo las normas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

4.9 Evaluación dosimétrica

4.9.1 Simulación Monte Carlo

Los estudios dosimétricos se realizaron utilizando el software PENELOPE de simulación Monte Carlo [53] considerándose un tumor esférico de 0,25 cm de

radio. Sobre este modelo se plantearon dos situaciones, una donde el ^{177}Lu -anti-CD20 se encontraba distribuido homogéneamente en todo el tumor, y otra donde el ^{177}Lu -anti-CD20 se encontraba distribuido homogéneamente pero solo sobre la superficie del tumor. La simulación fue basada en la muestra PENCYL provista con la distribución 2003 de PENELOPE, la cual fue adaptada para adoptar una simétrica esférica del tumor. Se introdujo también una distribución de energías del rayo primario de electrones, de acuerdo con los datos de decaimiento [46]. La simulación fue llevada a cabo sobre una infraestructura de cluster de procesadores Pentium IV de 3.0MHz, cada uno con 10^7 partículas primarias, lo cual implica típicamente 3×10^5 s del tiempo de CPU. Las rutinas incluidas en el paquete PENELOPE generan emisiones randómicas de electrones-fotones, en estructuras de materiales complejos consistentes de cualquier número de distintas regiones homogéneas (cuerpos) de diferente composición. El código permite a los usuarios escribir su propio programa de simulación, con geometría y scanning arbitrarios. El programa principal, que es provisto por el usuario, tiene que controlar la evolución de la simulación y mantener el puntaje de las cantidades relevantes. La simulación de transporte de fotones sigue el procedimiento usual, por ejemplo: todos los eventos de interacción en la historia de un fotón son simulados en sucesos cronológicos. La simulación de electrones y positrones es llevada a cabo por medio de un algoritmo mixto. Colisiones individuales elásticas duras, inelásticas duras, y emisiones bremsstrahlung son simuladas de una forma detallada, por medio de un muestreo randómico desde las correspondientes secciones diferenciales. Este

procedimiento asegura resultados de simulación confiables, mientras que ahorra tiempo de CPU.

Con el fin de generar gráficos de distribución de dosis en un volumen de tumor y alrededores, la energía depositada fue integrada en un volumen de radio constante.

4.9.2 Dosimetría Interna

A partir de los datos obtenidos en las biodistribuciones se estimaron las dosis absorbidas para los diferentes órganos del ratón por unidad de actividad inyectada del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20, mediante el esquema MIRD, donde la dosis se determina como el producto entre el tiempo de residencia de cada órgano fuente y los factores S para todas las combinaciones órgano fuente-blanco posibles.

Para la extrapolación de los datos de animales a humanos se utilizan comúnmente los siguientes métodos:

- Uso directo de datos de animales
- Escalación por masa
- Escalación por tiempo

Las investigaciones realizadas sobre los métodos de extrapolación no son concluyentes en cuanto a qué método particular es mejor. En este trabajo se utilizó el método de extrapolación directa de los datos del ratón. En este se considera que el comportamiento biocinético humano es similar al observado en el modelo animal, de modo que los tiempos de residencia determinados para

los diferentes órganos del ratón se consideran iguales a los tiempos de residencia de los órganos equivalentes en humanos.

El cálculo de dosis absorbida en humanos (hombre adulto) fue realizado mediante el software Organ Level Internal Dose Assessment Code (OLINDA), utilizando los factores de conversión de dosis que allí se presentan.

5 Resultados y Discusión

5.1 Activación de DOTA y conjugación con anti-CD20

La reacción de activación de DOTA consiste en un paso simple, a través de la incubación de cantidades equimolares de DOTA con EDC y sulfo-NHS para la formación del éster de DOTA N-hidroxisulfosuccinimida. Esta activación permite posteriormente unir el DOTA al anticuerpo a través de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del DOTA activado y los grupos ϵ -amino de los residuos lisina del anticuerpo, a un pH = 7.5-8.5. Las Figuras 6 y 7 muestran el esquema de reacción de unión del DOTA a una proteína, en este caso el anticuerpo anti-CD20.

El resultado de este proceso fue evaluado por (MaldiToF-MS) espectrometría de masa. Se observa un pico con relación masa/carga (m/z) de 146436 correspondiente al anti-CD20 (Figura 8), mientras que para el anticuerpo conjugado a DOTA la relación m/z fue de 148818 (Figura 9). El cociente entre la diferencia de masa de ambos y el peso molecular de DOTA (417 g/mol) representa la cantidad promedio de moléculas de DOTA unidas al anti-CD20, siendo la misma entre 5 y 6 moléculas de DOTA por molécula de anti-CD20. Este resultado es comparable a los encontrados por otros métodos de conjugación de DOTA a anti-CD20 [55].

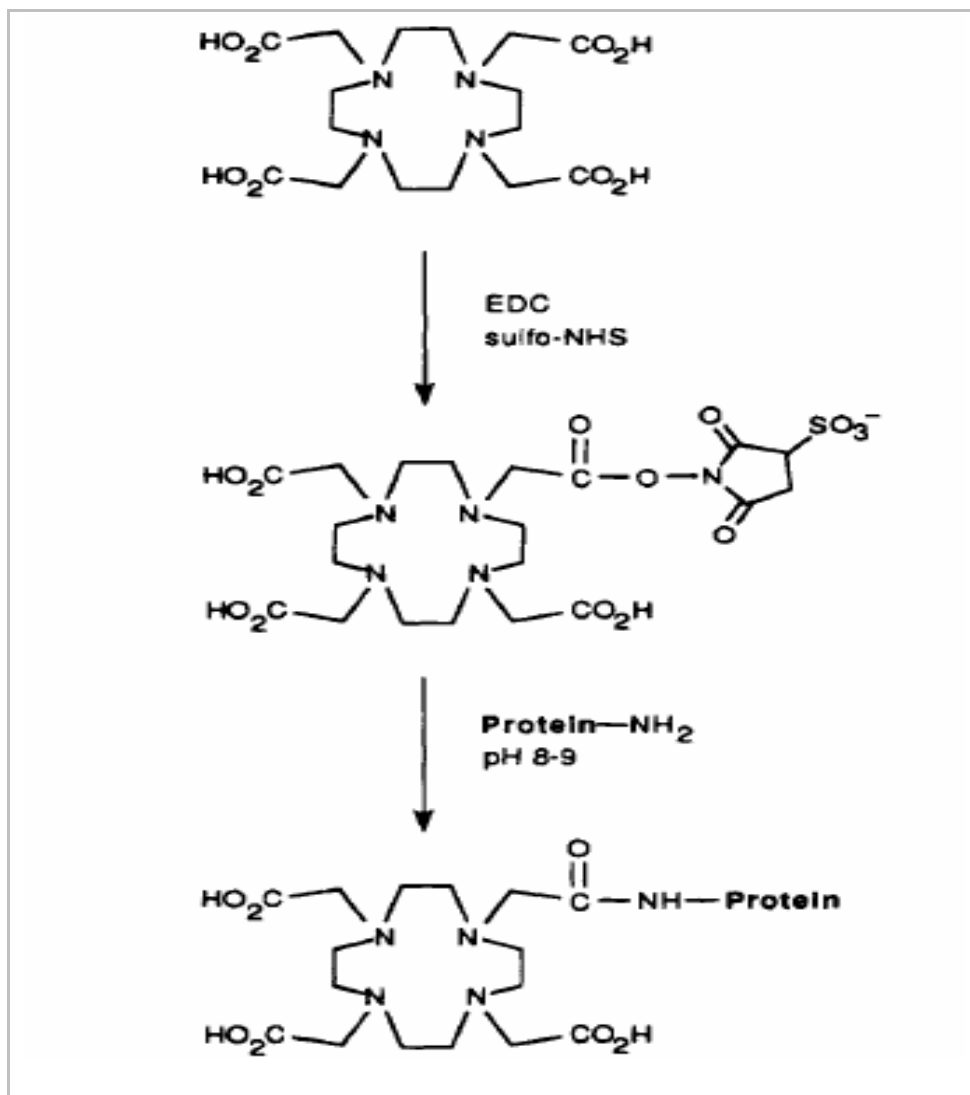


Figura 6 Reacción de conjugación de DOTA al anti-CD20

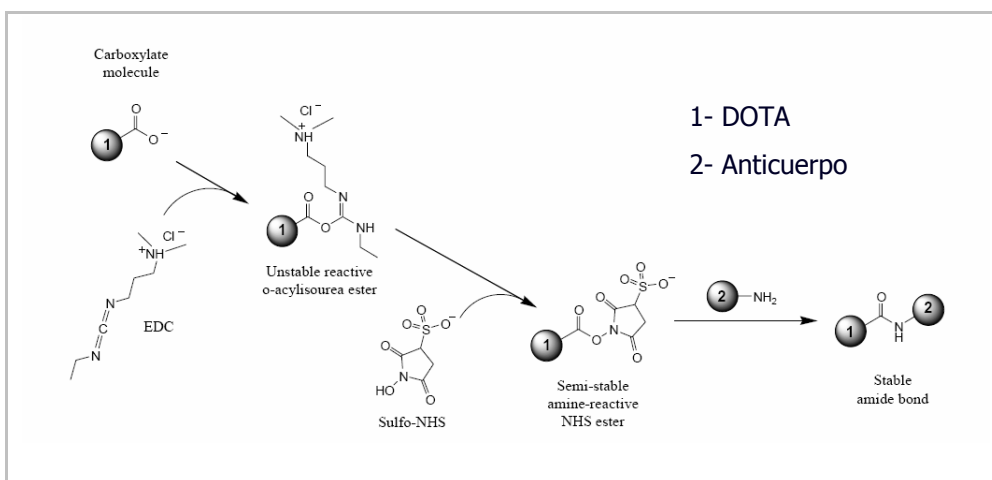


Figura 7 Reacción de activación del DOTA y conjugación con el anticuerpo

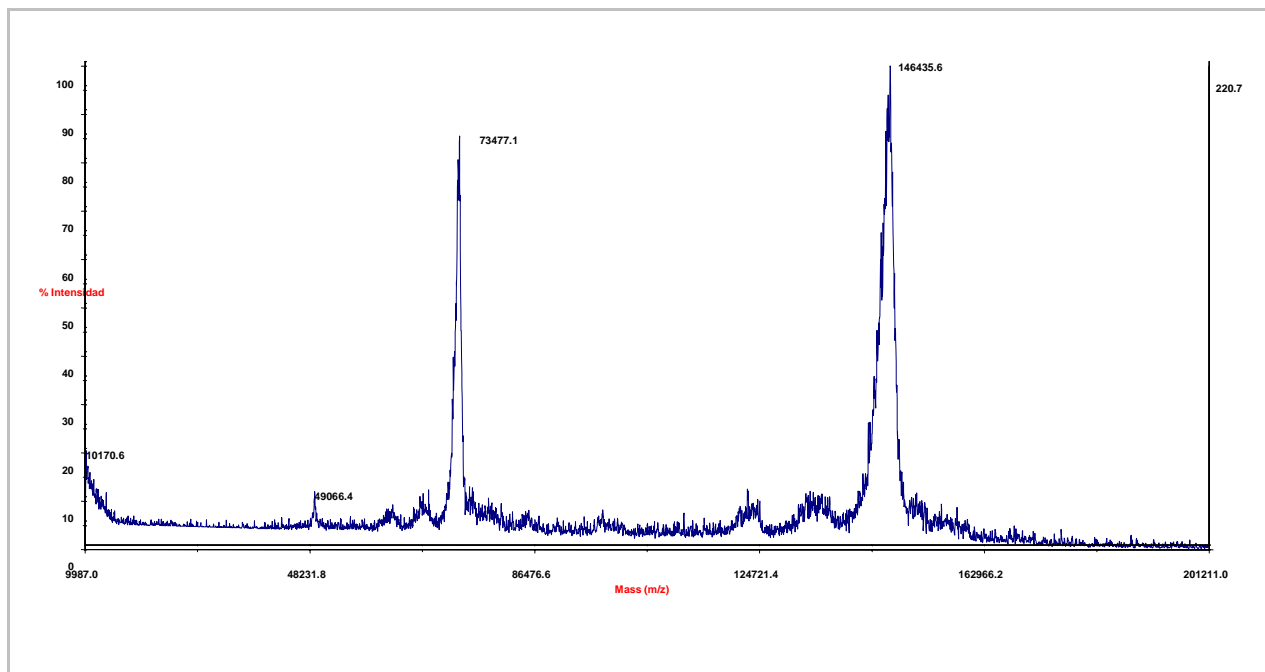


Figura 8 Espectro masa del anti-CD20 puro

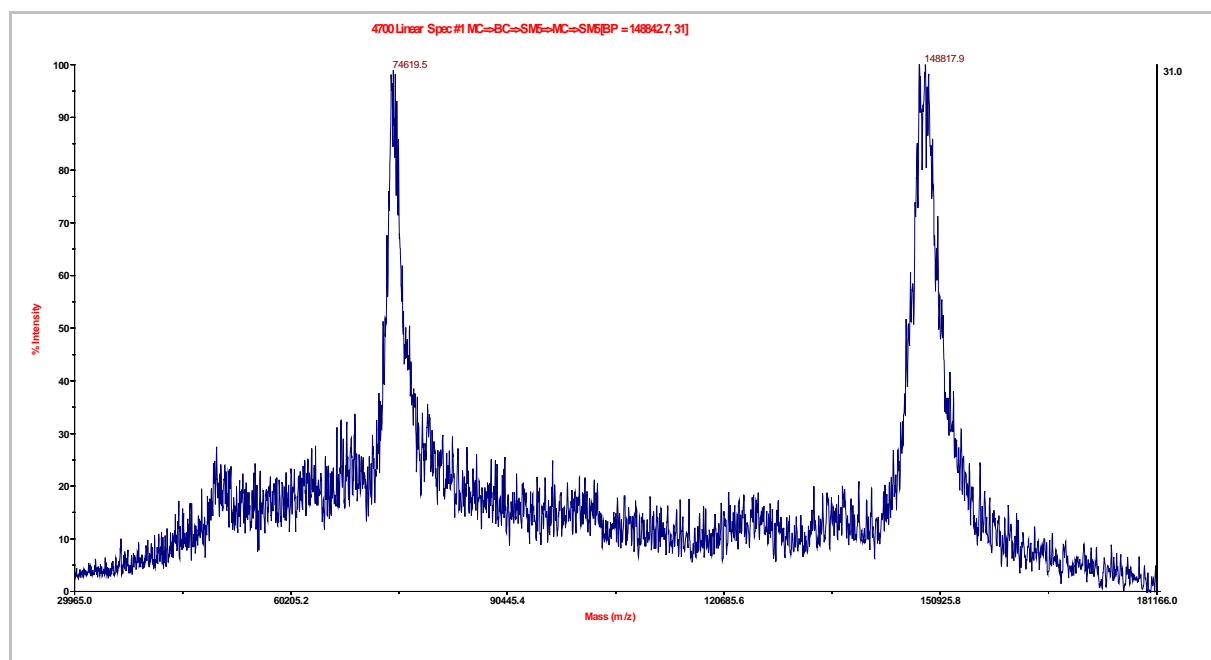


Figura 9 Espectro masa de DOTA- anti-CD20

5.2 Marcación del conjugado con ^{177}Lu

El rendimiento de marcación del DOTA-anti-CD20 optimizado fue de $77\pm 2\%$ con una actividad específica de aproximadamente 7.5 mCi/mg (278 MBq/mg), si bien este valor depende de variables tales como calidad del precursor DOTA, la cantidad de anticuerpo y de la concentración de actividad de ^{177}Lu utilizadas en cada experimento. El rendimiento obtenido en nuestro caso siempre fue menor al reportado por varios autores para anticuerpos marcados a través de DOTA con otros radionucleidos así como con ^{177}Lu . En estos reportes, el rendimiento siempre superó el 81% alcanzando en algunos casos un rendimiento mayor al 99% pero con una actividad específica menor. El valor de actividad específica para los radiofármacos terapéuticos es crucial ya que al disminuir esta, disminuye la captación tumoral del radiofármaco debido a que el anticuerpo frío compite por el antígeno CD20 desplazando al radioconjugado de su unión [55][56][57]. El resultado obtenido por el método aquí estudiado exige la realización de purificación rigurosa para continuar con la utilización del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20, ya que al ser un radiofármaco terapéutico requiere pureza radioquímica elevada ($>95\%$). Esto se logró ya que luego de la purificación el marcado alcanzó una pureza radioquímica compatible con su uso en tratamiento clínico, siendo la misma mayor a 97%. El perfil de purificación por PD10 se muestra en la Figura 10 .

El volumen de elución del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 fue de 4 mL, mientras que para el ^{177}Lu fue de 7 mL.

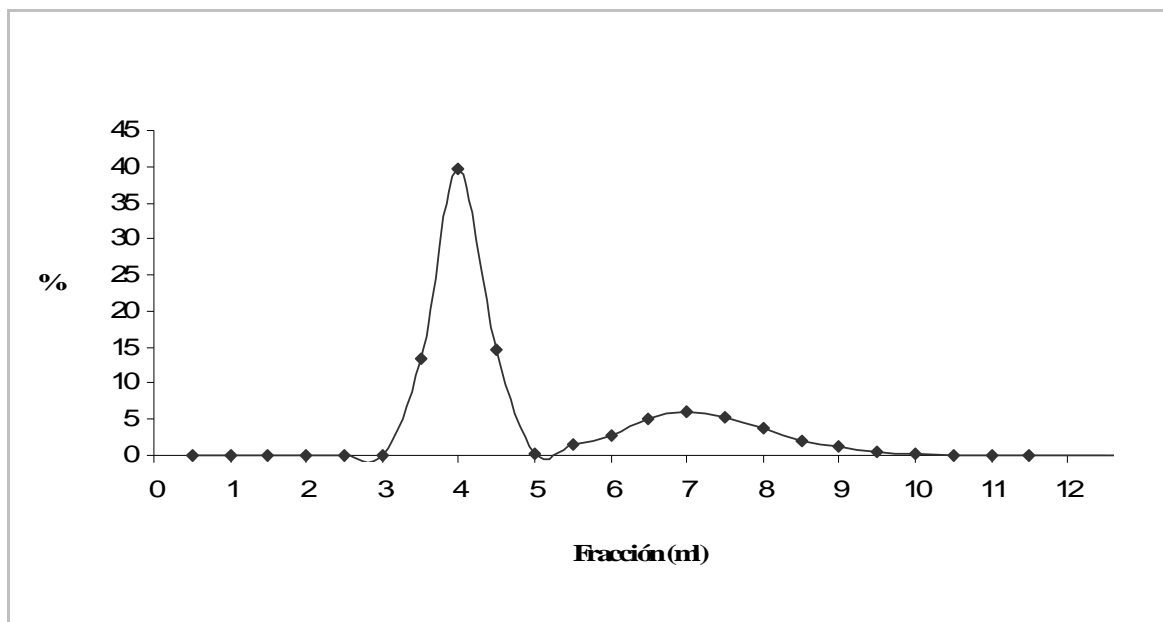


Figura 10 Perfil de purificación del ¹⁷⁷Lu-DOTA- anti-CD20

Se realizaron controles por HPLC del conjugado DOTA-anti-CD20 previo a su marcación, utilizando un detector UV (Figura 11) donde se observan dos picos con tiempo de retención de 2.69 y 4.03 min respectivamente. Al realizar HPLC del marcado utilizando detección gamma (Figura 12) se observa un pico importante con tiempo de retención de 4.55 minutos y un pico menor con tiempo de 2.94 minutos. Se estima que el pico mayor (4.5 minutos) corresponde al ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 mientras que el otro pico podría ser agregados de anticuerpo presente en la solución que también reaccionaría con el DOTA pero es marcado en menor proporción.

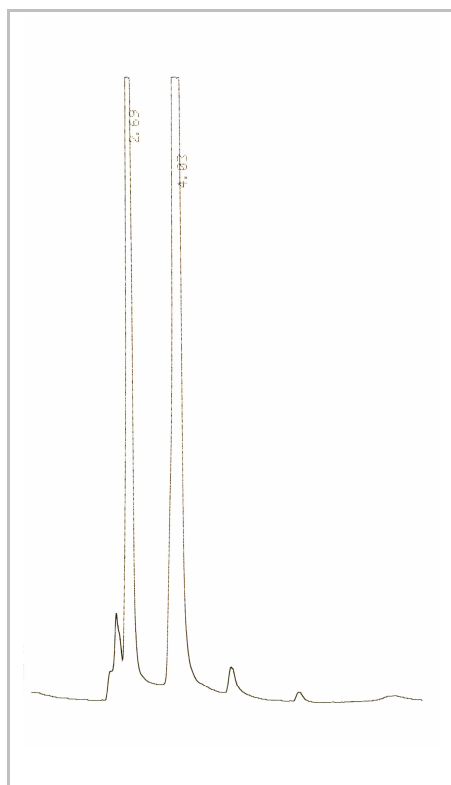


Figura 11 HPLC del conjugado DOTA-anti-CD20 con detector UV a 280 nm

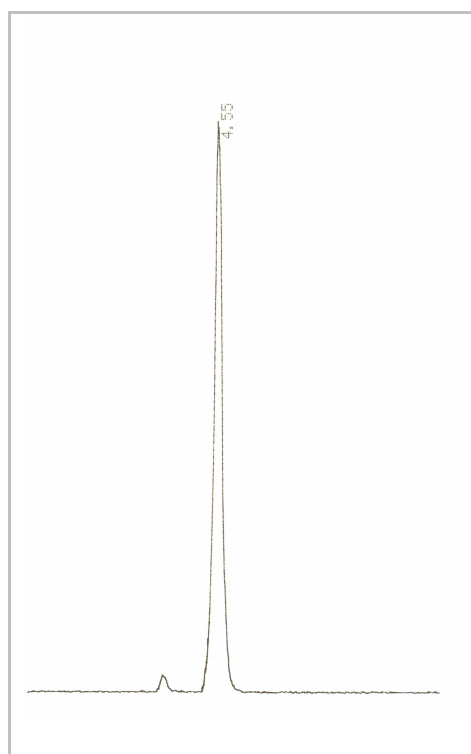


Figura 12 HPLC de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 utilizando detector gamma

5.3 Estudios de Estabilidad

5.3.1 Estabilidad del conjugado DOTA-anti-CD20

La estabilidad del conjugado se estudió a través de análisis fisicoquímicos y biológicos. El conjugado resultó estable durante al menos 5 meses, evaluado a través de espectrometría de masa, pureza radioquímica del marcado y ensayos de inmunoafinidad.

Los resultados de espectrometría de masa realizados inmediatamente después de derivatizado y posteriormente a los 5 meses, muestran que se mantienen unidas entre 4 y 5 moléculas de DOTA por molécula de anticuerpo.

La estabilidad del conjugado, evaluada a través de distintas marcaciones con ^{177}Lu a lo largo del tiempo, mostró que el conjugado es estable por al menos 5 meses, sin diferencias apreciables relacionadas a la temperatura de almacenamiento (4°C o -20°C) durante los primeros 3 meses (Figura 13).

La estabilidad evaluada a través de los ensayos de afinidad detallados en la sección 4.8.1, mostraron que el conjugado DOTA-anti-CD20 mantiene su actividad biológica.

Los resultados de estabilidad obtenidos demuestran que el método de conjugación es adecuado para la producción de DOTA-anti-CD20 estable en el tiempo y de fácil almacenamiento, lo cual lo hace apropiado para el uso rutinario. Esto también posibilitaría la formulación de un juego de reactivos (Kit) el cual facilitaría su aplicación clínica.

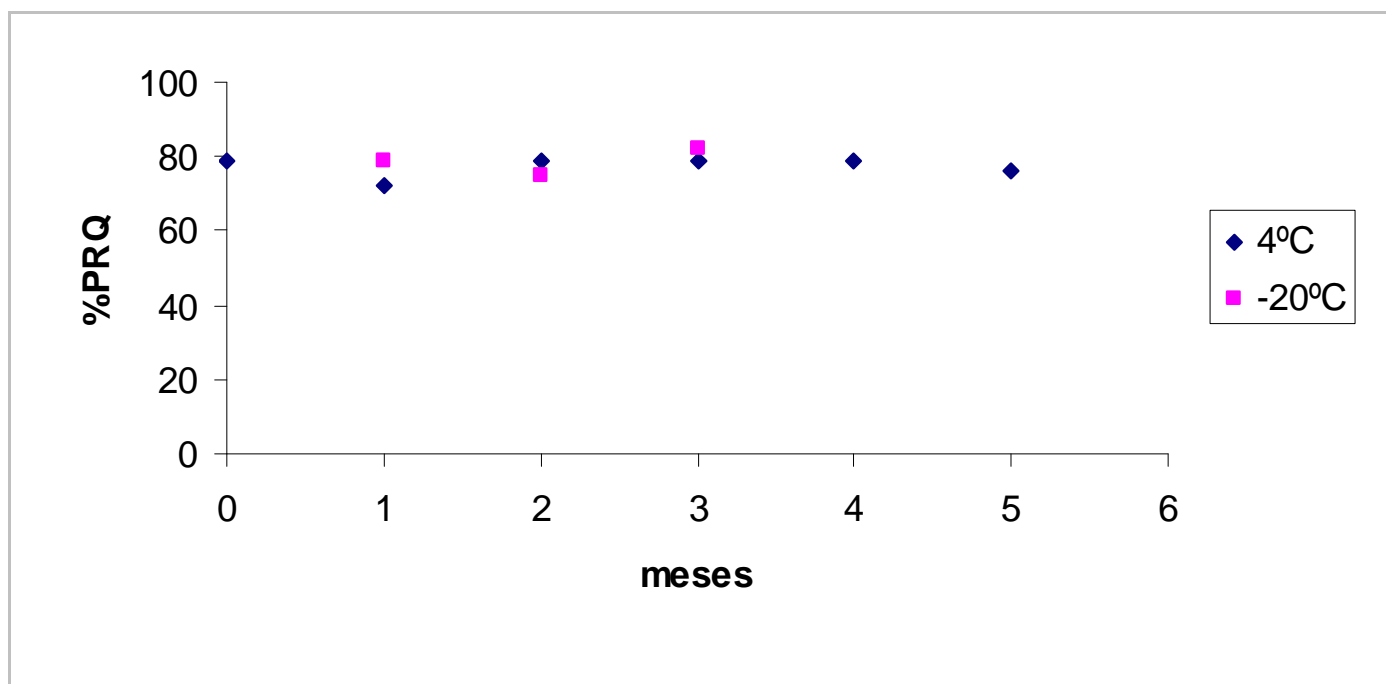


Figura 13 Rendimiento de marcado del DOTA-anti-CD20 en función del tiempo transcurrido desde la preparación del conjugado.

5.3.2 Estabilidad del marcado

La estabilidad del marcado se evaluó a las 2, 24, 48 y 72 hs post-marcación, observándose que el mismo permaneció estable durante el período de tiempo analizado.

Al evaluar su estabilidad en NaCl 0.9% y suero humano se observó que hasta un 95% del mismo permanecía incambiado en ambos casos por al menos 72 hs post incubación (Figura 14). Esto evidencia que el marcado es estable en condiciones fisiológicas, un aspecto importante que permite continuar con la evaluación biológica del mismo. Algunos reportes muestran que la estabilidad de algunos anticuerpos conjugados con DOTA, y marcados con diferentes radionucleidos, tienen una estabilidad menor en suero humano [56].

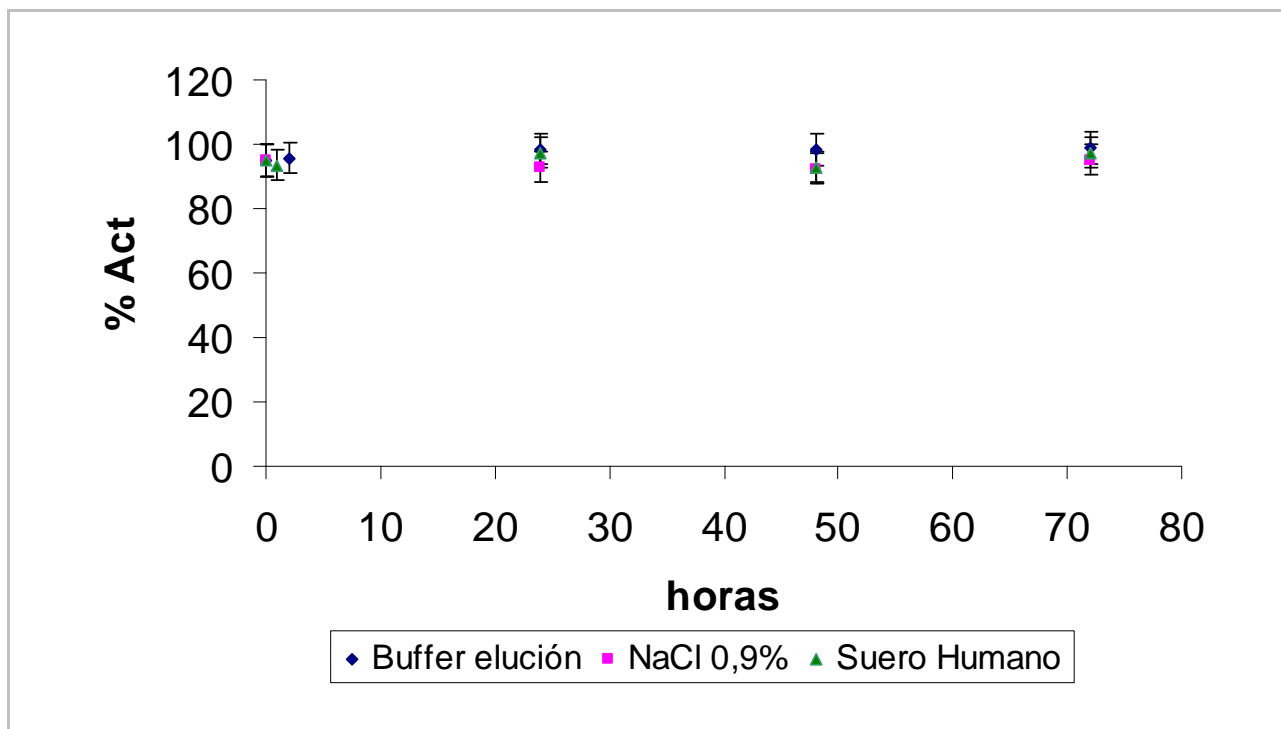


Figura 14 Estabilidad del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 incubado post purificación, en buffer de elución, en NaCl 0,9% y en suero humano.

5.4 Estudios de inmunoafinidad

Estos estudios mostraron que la unión específica (UE) del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 a la preparación del extracto de antígenos de membrana aumenta en función de la concentración de extracto utilizada, alcanzando sus máximos valores para una concentración total de proteína de 12mg/mL, lo cual demuestra la especificidad biológica de esta interacción (Figura 15). El valor de MCU calculado como se describió en la metodología por gráfico de regresión lineal, fue de 35 ± 5 % (Figura 16).

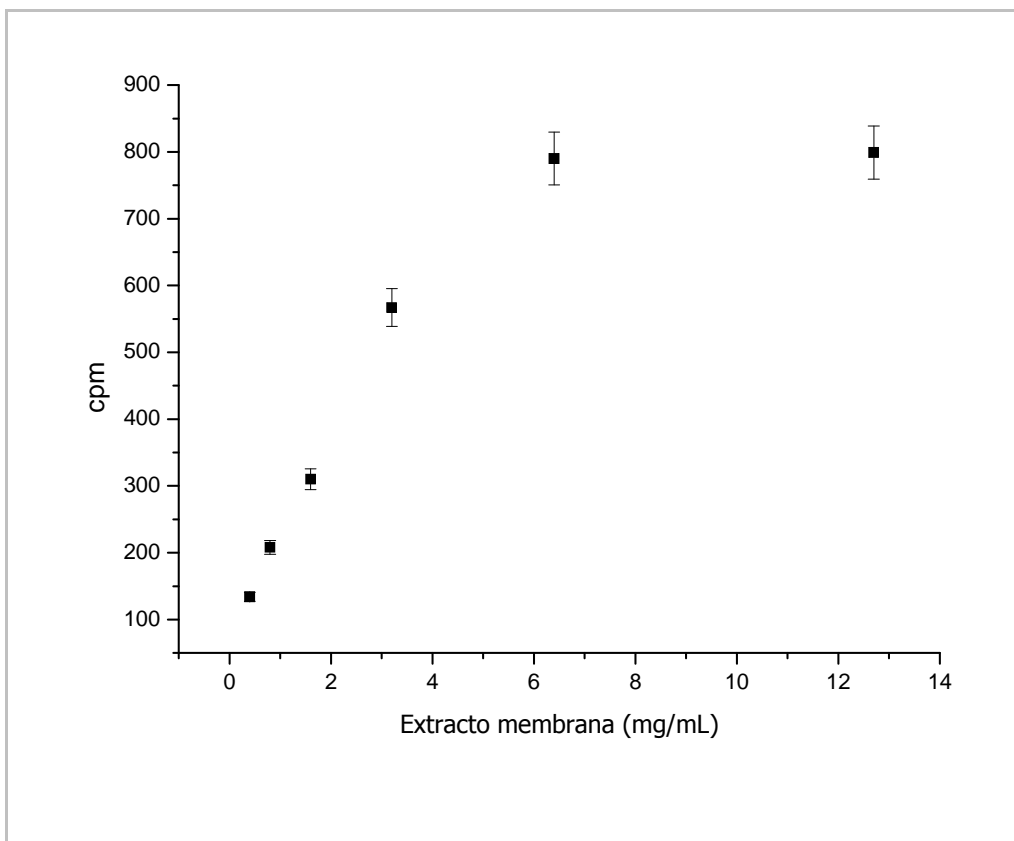


Figura 15 Unión del ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 en función de la concentración de extracto de membrana de leucocitos

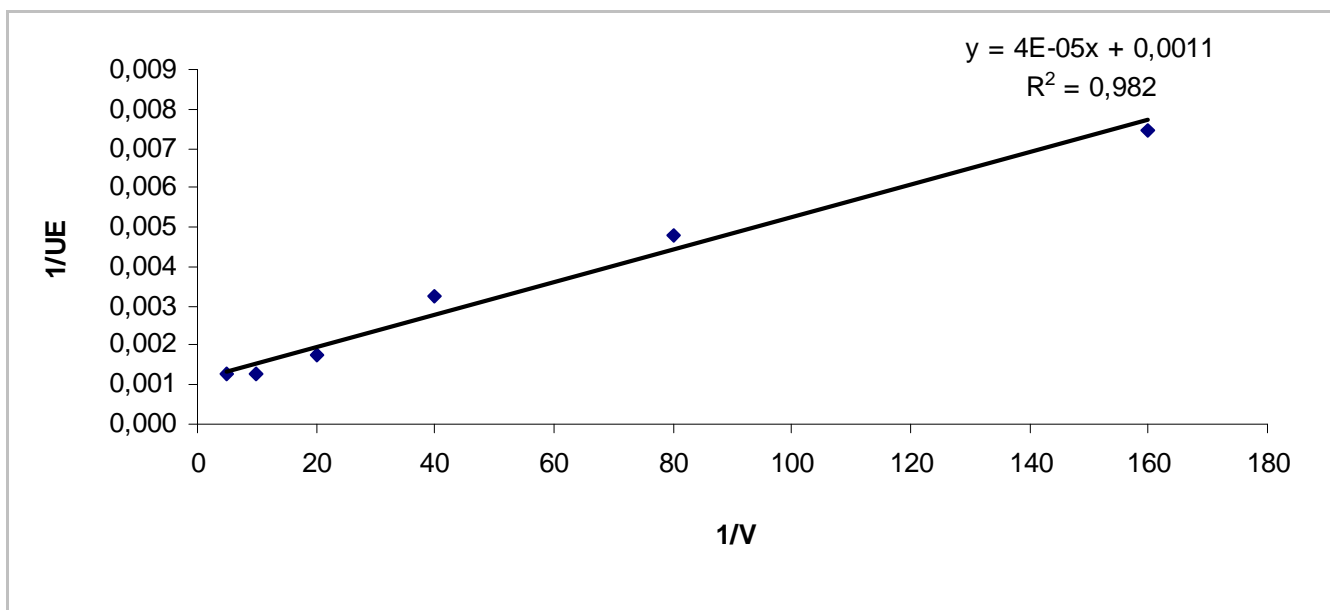


Figura 16 Grafico del inverso de la Unión específica vs el inverso del volumen de CD20 utilizado, a partir del cual se calculó el valor de MCU

La inhibición de la unión específica del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 al extracto de antígenos de membrana (a una concentración de 6mg/ml) alcanzó un $78.9 \pm 2.1\%$ para una concentración de 2.2 pM de anti-CD20 frío (Figura 17). El valor de IC_{50} obtenido a partir de estos estudios de competencia fue de $9.0 \pm 2.8 \text{ nM}$ (Figura 18). Estos resultados revelan que el anti-CD20 conserva su integridad biológica y una alta afinidad por su antígeno luego de la conjugación y marcación del mismo con ^{177}Lu .

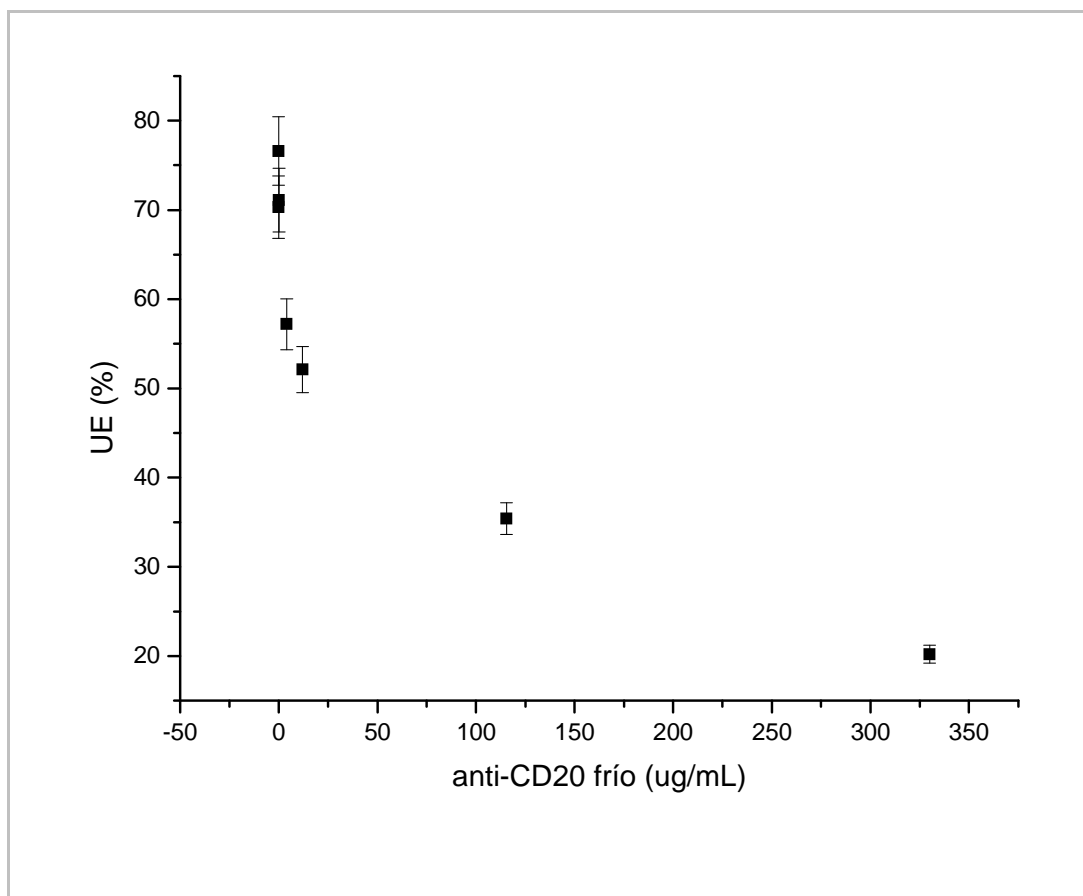


Figura 17 Inhibición de la unión del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 a extracto de membrana de leucocitos en función de la concentración de anti-CD20 frío

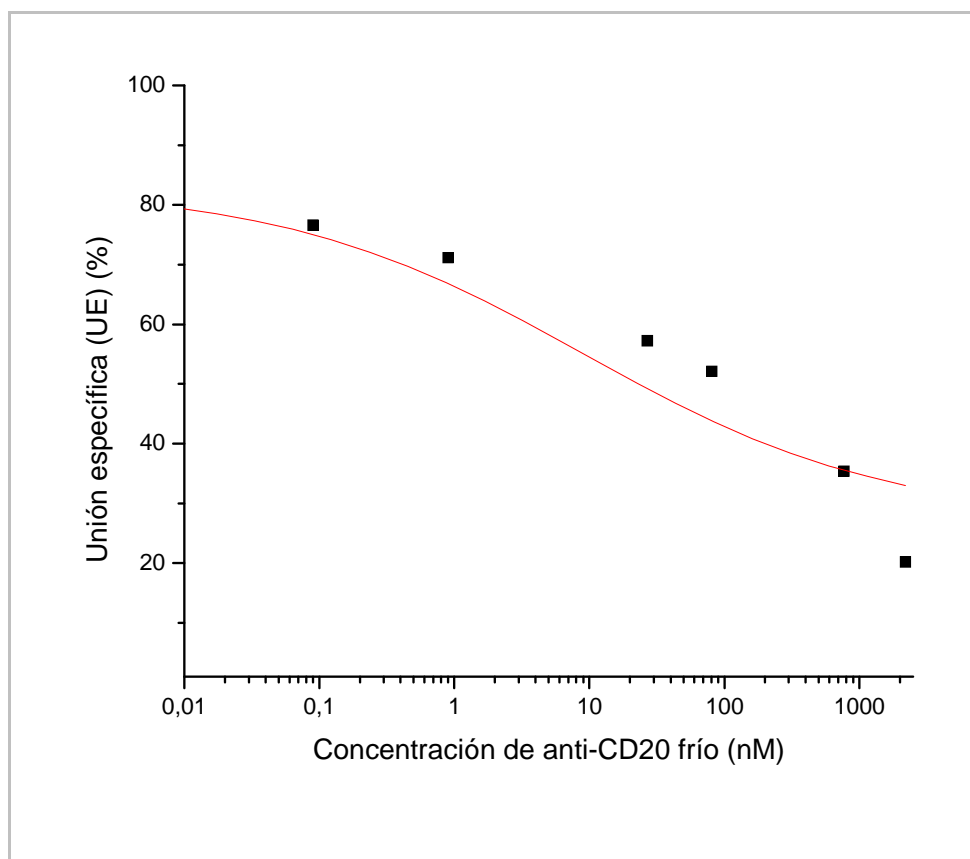


Figura 18 Gráfico para cálculo de IC₅₀

5.5 Estudios de Biodistribución

Se realizaron estudios de biodistribución en ratones CD1 machos normales cuyos resultados se muestran en las Figuras 19 y 20. Se observó una alta captación y acumulación hepática ($17.8 \pm 0.2\%$, $24.7 \pm 0.6\%$ y $41.0 \pm 6.2\%$ a las 4, 16 y 24 hs respectivamente) y una eliminación urinaria que alcanzó 25% a las 24 hs ($11.6 \pm 0.5\%$, $5.1 \pm 0.1\%$ y $25 \pm 5.2\%$ a las 4, 16 y 24hs respectivamente). No se observó captación apreciable en otros órganos. La eliminación urinaria se explica por la metabolización del anticuerpo marcado, lo cual permite la filtración glomerular de fragmentos pequeños del anticuerpo que están unidos al radionucleido. Se observó una baja captación a nivel del riñón. Como es

sabido, el ^{177}Lu presenta una alta toxicidad renal [58] debido a su reabsorción a este nivel. En algunos casos es necesaria la co-administración de aminoácidos que disminuyan la misma. En este caso se da una rápida eliminación y baja captación renal, lo cual disminuye el tiempo de residencia en el riñón lo que conlleva a que las dosis en este órgano sean compatibles con su aplicación *in vivo*.

Por otro lado, la baja captación observada en hueso ($<1.9\% \text{Act/g}$) es indicador de la estabilidad del marcado *in vivo*, ya que se ha demostrado la afinidad del ^{177}Lu libre por el tejido óseo [60][56].

La Figura 21 muestra una imagen centellográfica realizada en una rata, 4hs post administración de 7.4 MBq de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20. Se observa la alta captación del conjugado en hígado.

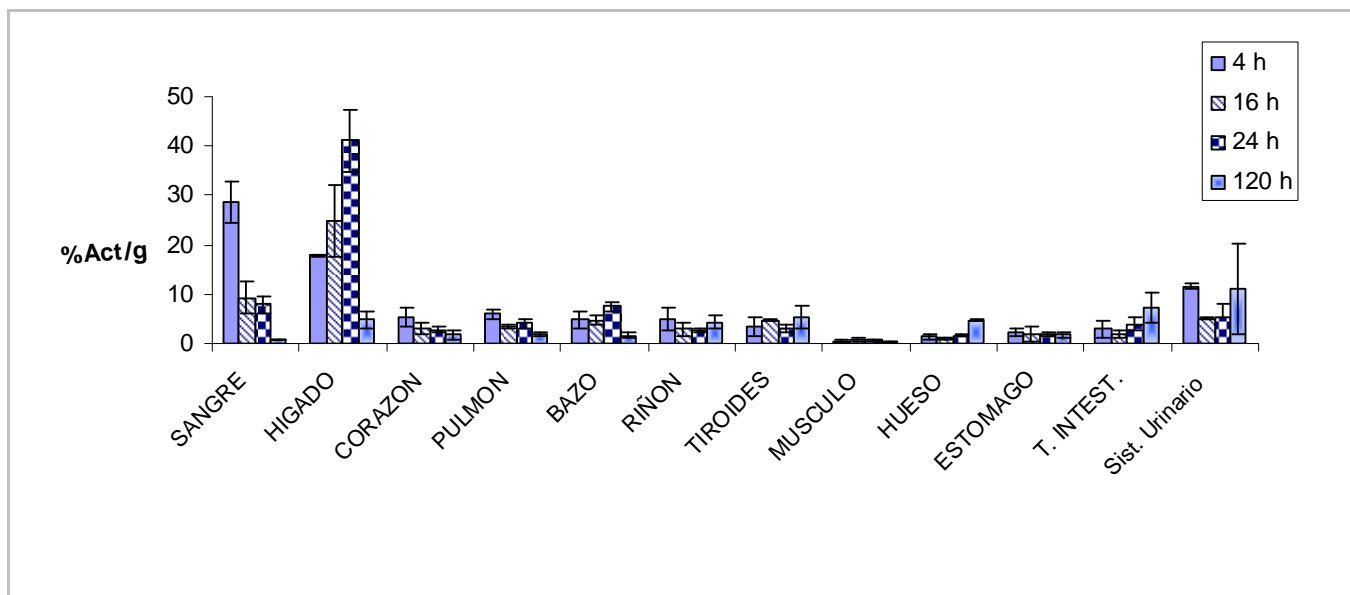


Figura 19 Resultado biodistribuciones a las 4 , 16, 24 y 120 hs (%Act./g)

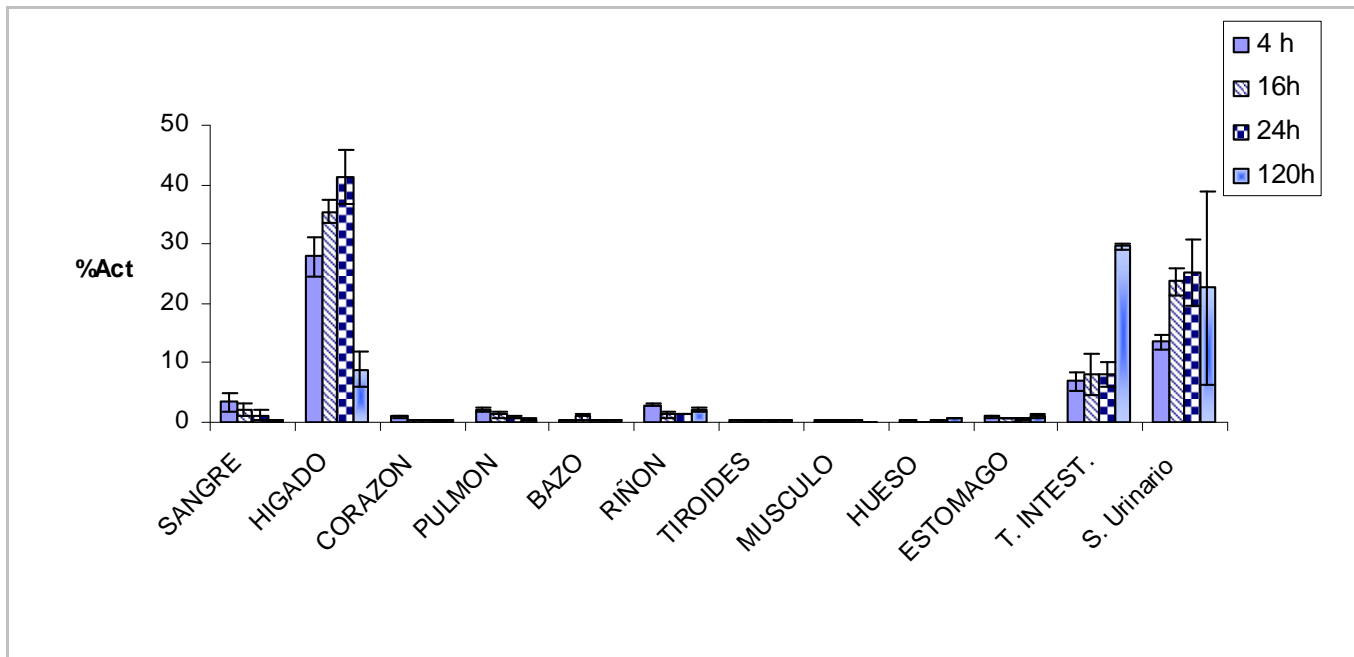


Figura 20 Resultado biodistribuciones a las 4, 16, 24 y 120 hs (%Act.)

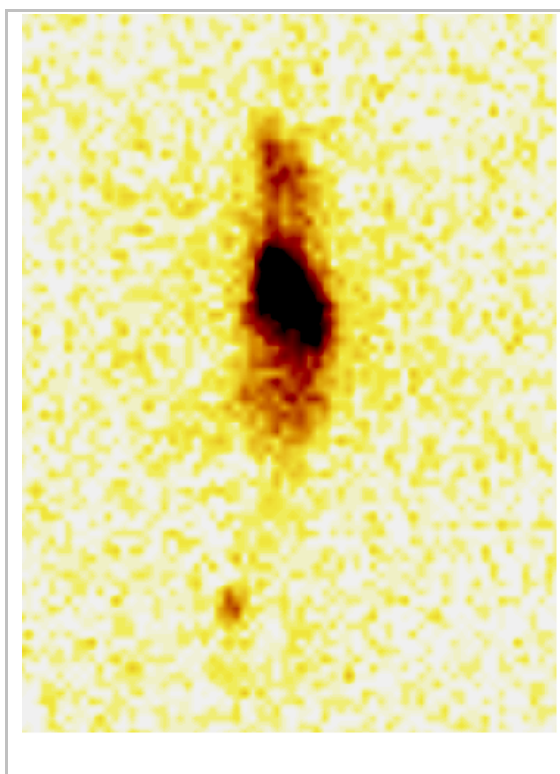


Figura 21 Imagen de rata 4hs post administración de ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20

En el estudio aquí presentado se observa que la depuración sanguínea tiene una cinética bi-exponencial, comportamiento que se ha demostrado para muchos

anticuerpos monoclonales. Algunos reportes demuestran que la cinética de eliminación es dependiente de la dosis administrada, siguiendo una cinética mono-exponencial al administrar en ratas una dosis menor de 1mg. En este estudio se utilizaron ratones, y la dosis administrada fue de aproximadamente 0,5 mg, dosis para la cual ya se observa una cinética bi-exponencial (Figura 22)[66][67]. Esto se debe fundamentalmente a que hay saturación del sistema microsomal hepático.

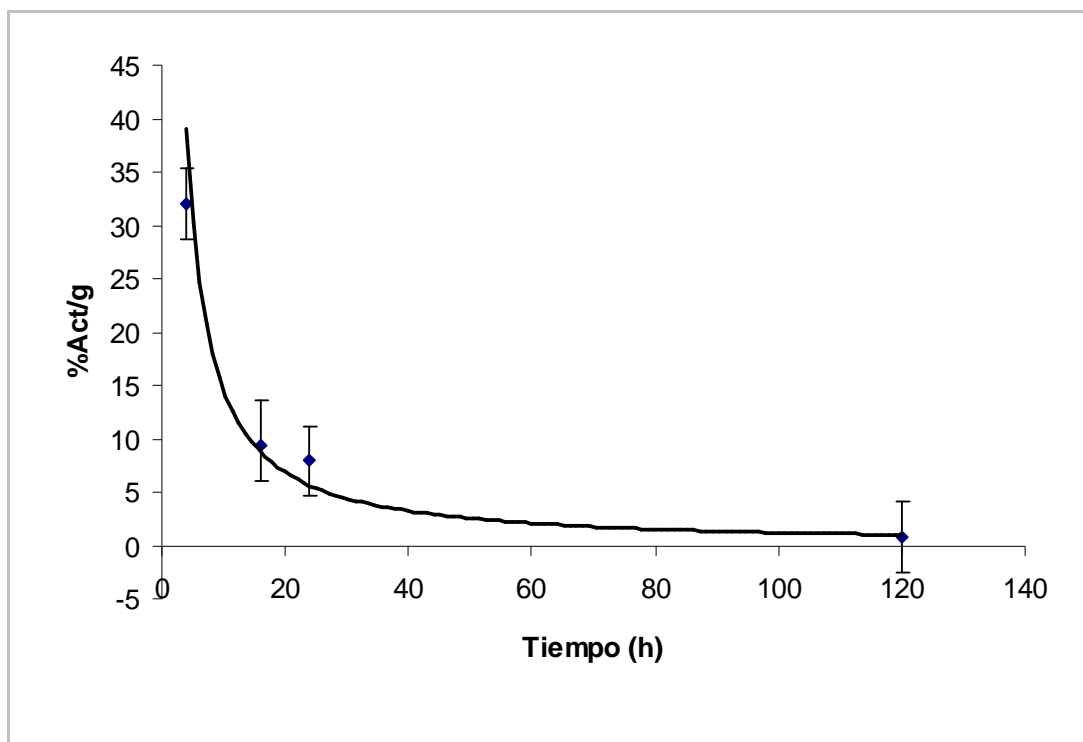


Figura 22 %Act/g en sangre vs tiempo de biodistribución.

Los resultados de las biodistribuciones del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 a las 16hs con administración previa de diferentes dosis de anti-CD20 frío se muestran en la Figura 23 .

Allí se aprecia una clara disminución en la captación hepática a partir de la administración de 150 mg/m² de anti-CD20 frío, observándose el mínimo de

captación al administrar 250 mg/m², dosis que es la que se administra a pacientes en la práctica clínica [59], llegando a ser 50% menor que la captación sin dosis previa.

También se observa un incremento en la eliminación urinaria, mientras que la depuración sanguínea permanece relativamente constante (Figura 23).

La utilización en la práctica clínica de dosis previa de anticuerpo frío tiene como objetivo bloquear las células CD20-positivas de la circulación sanguínea y del bazo, de forma de mejorar la biodistribución y por lo tanto aumentar la captación del radiomarcado en el tumor. Sin embargo, en los datos de biodistribuciones realizadas no se observa diferencia en bazo antes y después del bloqueo. Esto puede explicarse en base a que el anti-CD20 reconoce el antígeno CD20 humano y por lo tanto puede no tener especificidad por el antígeno murino. Es así que las diferencias observadas en la biodistribución del ¹⁷⁷Lu-DOTA-anti-CD20 con dosis previa de anticuerpo frío pueden deberse a una saturación de los órganos metabólicos y excretores. El hígado aumenta la velocidad de metabolización del anticuerpo favoreciendo así su eliminación por vía urinaria.

Órgano	Dosis de anticuerpo frío (mg/m ²)				
	0	150	250	500	1000
SANGRE	2.8 ± 0.2	1.7 ± 0.7	4.4 ± 2.4	2.5 ± 0.8	2.8 ± 2.3
HIGADO	36.9 ± 6.6	20.0 ± 1.8	14.3 ± 2.3	17.4 ± 3.5	26.5 ± 1.3
CORAZON	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1
PULMON	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.9	1.4 ± 0.5
BAZO	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1
RIÑON	1.7 ± 0.7	1.8 ± 0.5	2.7 ± 1.4	2.2 ± 0.3	1.8 ± 0.2
TIROIDES	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2
MUSCULO	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
HUESO	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1
ESTOMAGO	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.4 ± 1.0
S. Urinario	23.7 ± 2.3	32.9 ± 2.6	28.4 ± 3.8	29.1 ± 4.5	43.0 ± 1.9
T. INTEST.	5.6 ± 3.6	14.8 ± 3.1	12.9 ± 4.3	18.1 ± 5.6	11.7 ± 4.0

Tabla 3 Resultados de biodistribuciones de 16hs con dosis previa de anti-CD20 frío, expresados en %Act.

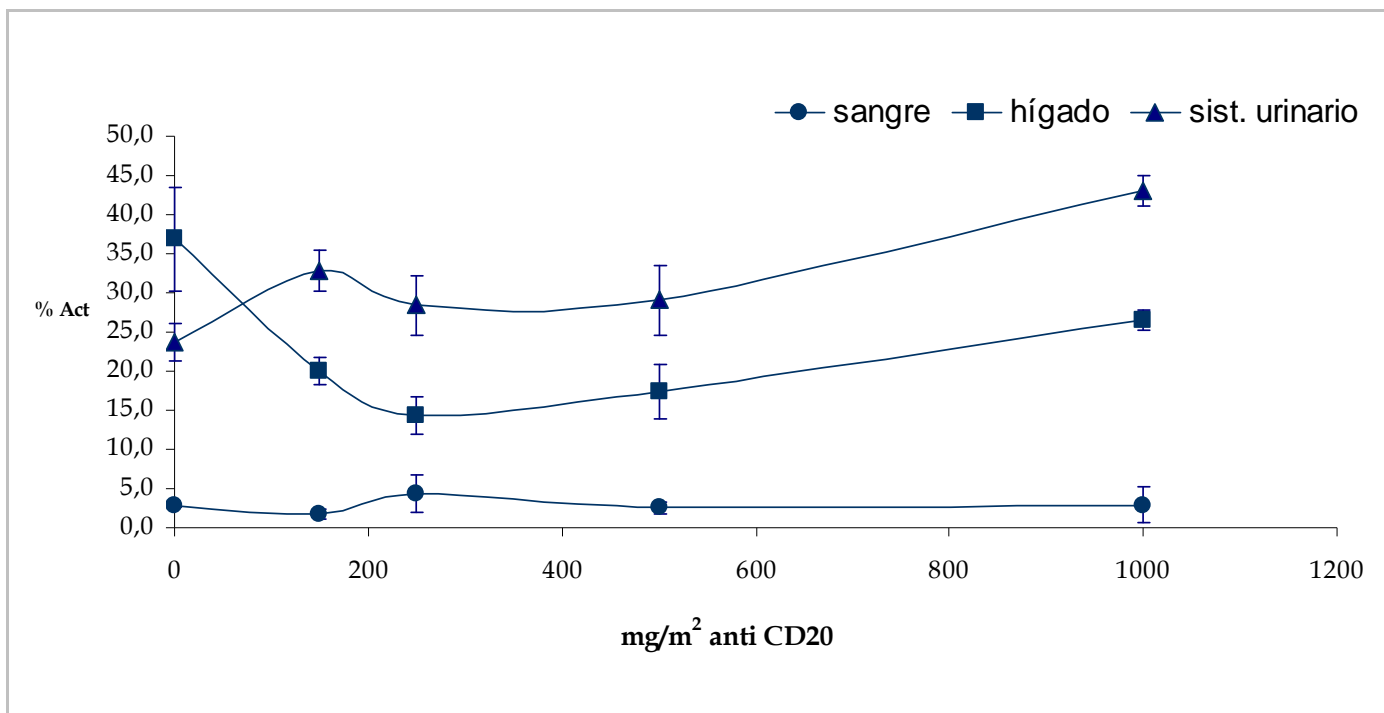


Figura 23 % Actividad en función de la dosis de anti-CD20 frío para hígado, sangre y sistema urinario (n=3)

5.6 Dosimetría

La simulación por Monte Carlo se llevó a cabo considerando una masa tumoral esférica de 0.25 cm de radio y al ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 distribuido uniformemente en todo el tumor. Este estudio mostró que el 80% de la dosis fue depositada en el tumor mientras que solo un 20% fue depositado en el tejido sano (Figura 24). La energía media de la emisión beta del ^{177}Lu (161 keV) es más baja que la energía beta de los radionucleidos actualmente utilizados en la radioinmunoterapia del Linfoma no Hodgkin (^{131}I = 191keV, ^{90}Y = 699keV). Algunos reportes muestran que con una baja energía se obtiene una relación de dosis tumor/tejido sano más favorable [68], por lo que se presume que el ^{177}Lu sería más apropiado que el ^{131}I y el ^{90}Y para tratamiento. Además, en comparación con el ^{131}I , la menor abundancia de la emisión gamma hace que

esta contribuya menos a la dosis total. El estudio aquí descrito mostró también que para el modelo tumoral diseñado, el ^{177}Lu fue más apropiado porque produjo menos efecto sobre el tejido normal adyacente al tumor.

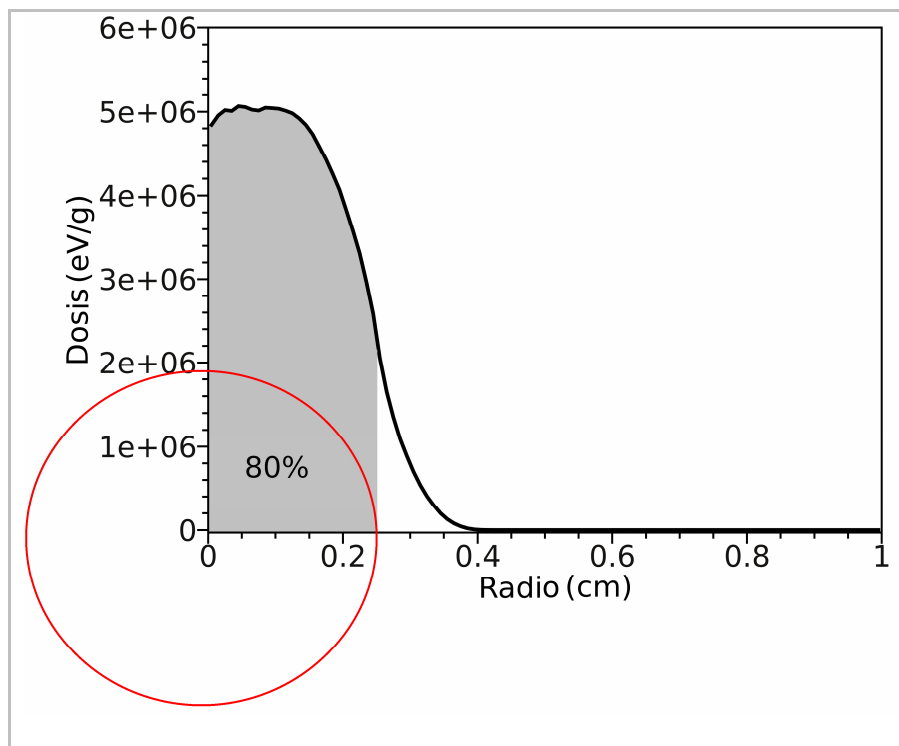


Figura 24 Dosis depositada en un tumor esférico de 0.25cm de radio estimado a través de simulación Monte Carlo, considerando el ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 distribuido homogéneamente en todo el tumor.

En el segundo estudio realizado de simulación Monte Carlo, donde el ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 se encontraba uniformemente distribuido en la superficie del tumor (situación que sería la más desfavorable), se observó que una buena parte de la dosis (45%) aún fue depositada en el tejido tumoral (Figura 25).

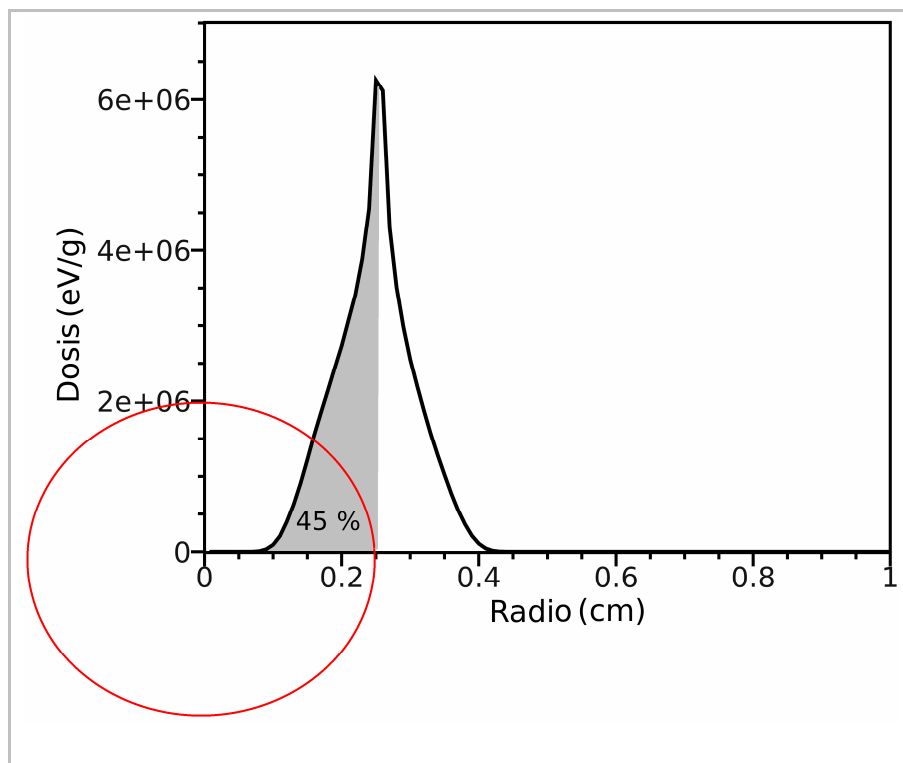


Figura 25 Dosis depositada en un tumor de 0,25 cm de radio a través de simulación Monte Carlo, considerando el ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 distribuido en la superficie del tumor.

5.7 Dosimetría Interna

Los resultados del cálculo de dosimetría interna revelaron mayor deposición de dosis en riñones, vejiga e hígado, lo cual es compatible con lo que se podía inferir cualitativamente en los estudios de biodistribución (Tabla 4).

Teniendo en cuenta las diferencias en radiosensibilidad de cada órgano y considerando que el riñón y la médula ósea son dos órganos altamente afectados en radioterapia con anti-CD20, se estimaron las actividades máximas permisibles de ser inyectadas sin producir radiotoxicidad en estos órganos.

Órgano Blanco	Total
Adrenales	1,11E-02
Cerebro	1,87E-05
Vesícula Biliar	1,85E-02
Intestino delgado	8,39E-03
Estómago	4,18E-03
Corazón	4,63E-03
Riñones	1,12E000
Hígado	8,58E-01
Pulmón	4,03E-03
Músculo	5,13E-03
Páncreas	9,31E-03
Medula Ósea	4,25E-03
Piel	1,87E-03
Bazo	4,13E-03
Testículos	9,86E-03
Tiroides	1,92E-04
Vejiga	5,37E000
Cuerpo total	3,48E-02

Tabla 4 Dosis en órganos (mGy/MBq) calculada para un hombre adulto

Así, la máxima actividad tolerable que se podría inyectar sin producir toxicidad en riñones sería de 6,9 mCi/kg para un hombre de 70 kg de peso, asumiendo que la máxima dosis tolerable por el riñón sin producir toxicidad es de 20 Gy. Procediendo de la misma forma para medula ósea, se obtuvo que la máxima actividad tolerable a ser inyectada sería de 181,7 mCi/kg, considerando que la máxima dosis tolerable por la medula ósea es de 2Gy [69]. Por lo tanto, el órgano crítico que determinará la dosis a administrar serán los riñones.

Si consideráramos la máxima dosis corporal tolerable que es de 75 cGy, dosis utilizada en el tratamiento con Bexxar®, se podría administrar un máximo de 21552 MBq (8.3 mCi/kg).

Los datos utilizados para el cálculo dosimétrico se basaron en los estudios realizados de biodistribución del ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 en ratones. Dado que no se ha demostrado que el anticuerpo reconozca el CD20 murino, se podría suponer que las biodistribuciones en hombre serían ligeramente diferentes, ya que se observaría mayor captación en bazo, aumentando la dosis depositada en dicho órgano. Sin embargo, con administración de dosis previa de anticuerpo frío la captación en bazo disminuiría ampliamente [70][71]. Por lo tanto, los resultados dosimétricos aquí calculados serían extrapolables al ser humano con las limitaciones expresadas.

6 Conclusiones

La técnica utilizada de conjugación del anti-CD20 con DOTA resultó ser un procedimiento fácil, rápido y con el cual se obtuvo un conjugado estable en el tiempo. Su modo de almacenamiento sencillo, ya que el mismo puede ser refrigerado, facilitaría su utilización en la práctica clínica rutinaria una vez formulado como kit para la preparación del radiofármaco.

Los controles utilizados para evaluar su estabilidad son sencillos, rápidos y mostraron una alta reproducibilidad y confiabilidad.

Los estudios de inmunoafinidad mostraron que el anticuerpo mantiene su actividad biológica, conservando su afinidad por el antígeno CD20 después de conjugado y marcado.

El método descrito para producción de ^{177}Lu -DOTA-anti-CD20 resultó ser una alternativa adecuada para la producción del mismo. La pureza radioquímica luego de purificado es compatible con su potencial aplicación clínica en el tratamiento del LNH.

Los estudios dosimétricos confirmaron la hipótesis de que el ^{177}Lu es un radionucleido apropiado para uso terapéutico, teniendo ventajas sobre los radionucleidos actualmente utilizados.

7 Bibliografía

- [1] Alexander DD, Mink PJ, Adami H, Chang ET, Cole P, Mandel Js, Trichopoulos D. The non hodgking lymphomas: A review of the epidemiologic literatura. *Int. J Cancer*. 120:1-39, 2007.
- [2] Australian Institute of health and welfare and austrlaasian association of cancer regitries. *Cancer in Australia*. Canberra: Australian Institute of Health and welfare, 2003.
- [3] Vassallo, J.A.; Barrios, E.- Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2003.
- [4] Rosenberg SA, Validity of the Ann Arbor staging classification fr the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treta Rep*. 61: 1023-1027, 1977.
- [5] A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 329:987, 1993.
- [6] A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89:3909, 1997.
- [7] Lichtman, A.M., Beutler, E., Seligsohn, U., Kaushansky, K., Kipps,T. *Willimas hematology* 7th Ed. MacGraw-Hill Medical, 2006.

- [8] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of tumor. Pathology and genetics of Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC PRESS: Lyon 2001.
- [9] Deghiedy h, Fonda M, Shahin D, Asma S, El- Bedewy A, Abd El-Ghaffar H. Diagnosis and pronostic utility of t(14;18) in follicular lymphoma. *Acta Haematol.* 118,231-236, 2007.
- [10] Hanson CA, Kuurtin PJ, Katzmann JA. Immunophenotypic análisis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-cell malignant lymphoma. *Blood*, 94: 3389-3896, 1999.
- [11] F. Najjar, R. Hustinx, G. Jerusalem, G. Fillet, P. Rigo. Positron Emission Tomography (PET) for Staging Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas (*NHL Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 16(4): 297-304, 2001.
- [12] Rodríguez-Vigil, B; Gómez-León, N; Pinilla, I, Hernández-Maraver, D; Coya, J; Curto, L; Madero,R. PET/CT in lymphoma: Prospective study of enhanced full-dose PET/CT versus unenhanced low dose PET/CT. *J Nucl Med.* 47(10) 1643-48, 2006.
- [13] London, K; Cross, S; Onikul, E; Dalla-Pozza, L; Howman-Giles, R. (18)F-FDG PET/CT in paediatric lymphoma: comparison with conventional imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imag.* <http://www.springerlink.com/content/1j53467v571124xq/>. 2010.

- [14] DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, et al. Treatment of a patient with B-cell lymphoma by I-131 Lym-1 monoclonal antibodies. *Int. J. Biol. Markers.* 2:49-53, 1987.
- [15] DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, et al. Pilot studies of radioimmunotherapy of B-cell lymphoma using I-131 Lym-1 monoclonal antibodies. *Antibody Immunconj Radiopharm.* 1:17-33, 1988.
- [16] DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, Levy NB, Adams GP, Mills SL. Fractionated radioimmunotherapy of B-cell malignancies with I-131 Lym-1 *Cancer Res.* 50: 1014-1016, 1990.
- [17] DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, et al. Treatment of B-cell malignancies with I-131 Lym-1 monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer.* 3:96-101, 1988.
- [18] DeNardo GL, Lewis JP, DeNardo SJ, O'Grady LF. Effects of Lym-1 radioimmunoconjugated on refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 73: 1420-1432, 1994.
- [19] DeNardo SJ, DeNardo GDS, et al. Maximum tolerated dose, toxicity and efficacy of I-131 Lym-1 antibody for fractionated radioimmunotherapy of non-hodgkin lymphoma. *J Clin. Oncol.* 16: 3246-3256, 1998.
- [20] Juweid ME. Radioimmunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: From clinical trials to clinical practice. *J Nucl Med* 43: 1507-1529, 2002.

- [21] Whal RL, KrollS, Zasadny KR, Patient specific whole body dosimetry: Principles and a simplified method for clinical implementation J Nucl Med, 39, 14S-20S, 1998.
- [22] Kaminsky MS, Zasadny KR, Francis IR et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with ¹³¹Ianti-B1 (antiCD20) antibody. N Engl J Med, 329, 459-465, 1993.
- [23] Knox Sj, Goris ML, Trisler K, et al. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. Clin Can Res, 2,457-470, 1996.
- [24] Buschsbaum DJ, Wahl RL, Glenn SD et al. Improved delivery of radiolabeled anti-B1 monoclonal antibody to Raji lymphoma xenografts by predosing with unlabeled anti-B1 monoclonal antibody. Cancer Res, 52 637- 642, 1992.
- [25] Dillman RO, Shawler DL, Sobol, RE, et al. Murine monoclonal antibody therapy in two patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood, 59, 1036-1045, 1982.
- [26] Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cell *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 83, 435-445, 1994.
- [27] Wiseman GA, White CA, Stabin M et al. Phase I/II Y90 - Zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2BB8) radioimmunotherapy

- dosimetry results in relapsed or refractory non Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med*, 27, 766-777, 2000.
- [28] Wiseman GA, White CA, Sparks RB, et al. Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized control trial of Zevalin™ radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non hodgkin's lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 39, 181-194, 2001.
- [29] Ferro-Flores G, Torres-García E, García-Pedroza L, Arteaga de Murphy C, Pedraza-López M, Garnica-Garza H. An efficient, reproducible and fase preparation of ^{188}Re -anti-CD20 for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Nucl. Med. Communications*, 26: 793-799, 2005.
- [30] Knop S, Jakob A, Kanz L, Hebart H, Bares R, Dohmen B. $^{186}\text{Rhenium}$ -labeled anti-CD20 antibody radioimmunotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 103: 1175, 2004.
- [31] Einfield DA, Beown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA, molecular cloning of the human cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*. 7,711-717, 1988.
- [32] Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphotylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase. *C.J. Biol. Chem.* 264, 11282-11287, 1989

- [33] Sieber T, Schoeler D, Ringel F, Pascu M, Schriever F, Selective internalization of monoclonal antibodies by B-cell Chronic lymphocytic leucemia cells. *Br J Haematol.* 121, 458-461, 2003.
- [34] Rituximab®
<http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/rituxan-prescribing.pdf>
- [35] Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of Blymphocytes. *Immunol. Today* 15, 450-454,1994
- [36] Demidem A, Lam T, Alas s, Hariharan K, Hanna N, Bonavida b. Chimeric anti CD20 (IDED-C2B8) monoclonal antibody sensitizss a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother.Radiopharm.*12, 177-186,1997.
- [37] Johonson P, Glennie M, The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.* 30, 3 -8, 2003.
- [38] Reff ME, Carner K, Chambers KS et al. Depletion of B cells *in vivo* by chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435 - 445, 1994.
- [39] A Hall EJ, *Radiobiology for the radiologist*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Willimas y Wilkins, 2000
- [40] Rupnow BA, Knox SJ, The role of radiation induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy. *Apoptosis* 4, 115-143, 1999.

- [41] Rupnow BA, Murtha AD, Alarcón RM, et al. Direct evidence that apoptosis enhances tumor responses to fractionated radiotherapy. *Cancer res*, 58, 1779-1784, 1998.
- [42] Kroeger LA, DeNardo GL, Gumerlock PH, et al Apoptosis related gene and protein expression in human xenografts (Raji) after low dose radiation using ^{67}Cu -2IT-BAT-Lym-1 radioimmunotherapy, *Cancer Biother Pharm*, 16, 213-225, 2001.
- [43] Shuang Liu, The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals, *Chem.Soc.Rev.* 33, 445-461, 2004.
- [44] Boskovitz, A, McLendon, RE, Okamura, T, Sampson, JH, Bigner, DD, Zalutsky, MR. Treatment of HER2-positive breast carcinomatous meningitis with intrathecal administration of α - particle-emitting ^{211}At -labeled trastuzumab. *Nucl Med Biol* 36, 659-69. 2009.
- [45] Dangshe Ma, McDevitt, M, Finn, RD, Scheinberg, DA. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals *Appl Rad Isot.* 55(4) 463-70 2001.
- [46] Nuclear Decay Data in the MIRD Format, http://www.nndc.bnl.gov/useroutput/177lu_mird.html
- [47] Li M, Meares CF Synthesis, metal chelate stability studies, and enzyme digestion of a peptide-linked DOTA derivative and its corresponding radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjug Chem.* 4(4):275-83, 1993.

- [48] Sherry, A.D., Brown, R.D., Spiller, M. et al. Synthesis and characterization of the gadolinium(3+) complex of DOTA-propylamide: a model DOTA-protein conjugate. *Inorg. Chim. Acta*, 28: 620-22, 1989.
- [49] Pnwar P, Iznaga-Escobar N, Mishra P, SrivastavaV, Sharma RK, Chandra R, Mishra Ak. Radiolabeling and biological evaluation of DOTA-Ph-Al derivative conjugated to anti-EGFR antibody for egf/r3 for targeted tumor imaging and therapy. *Can Biol Ther*. 4(8) 854-460.2005
- [50] Ocak m, Antretter M, Knopp R, Petrik M, Bergisadi N, Decristoforo C. Full automation of ⁶⁸Ga labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification. *Appl Rad Isot*. 68(2) 297-302. 2010.
- [51] Ujula T, Salomäki S, Virsu P, Lankinen P, Mäkinen TJ, Autio A, Yegutkin GG, Knuuti J, Jalkanen S, Roivainen A. Synthesis, ⁶⁸Ga labeling and preliminary evaluation of DOTA peptide binding vascular adhesion protein-1: a potential PET imaging agent for diagnosing osteomyelitis. *Nucl Med Biol*. 36(6) 631-41. 2009.
- [52] Lewis, Raubitschek, Shively. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate Chem*, 5, 565-576, 1994.
- [53] Salvat F., Fernández-Varea J., Sempau J. PENELOPE, A code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport, NEA France. 2003.

- [54] Tedder TF, Boyd AW, Freedman As, Nadler LM, Scholossman Sf. The B cell surface molecula B1 is functionally linked withBcell activation and differentiation. J. Immunol. 135, 973-979, 1985.
- [55] Forrer F, Chen J, Fani M, Powel P, Lohri A, Müller-Brand J, Moldenhauer G, Maecke H.R., *In vitro* characterization of ¹⁷⁷Lu-radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 33, 1143-1446, 2009.
- [56] Rasaneh S, Rajabi H, Babaei M.H., Daha FJ. ¹⁷⁷Lu labeling of herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer, Nucl. Jour, Med, 2010.
- [57] Coliva A, Zacchetti A, Luison E, Tomassetti A, Bongarzone I, Seregni E, Bombardieri E, Martin F, Giussani A, Figini M, Canevari S. ⁹⁰Y Labeling of monoclonal antibody MOv18 and preclinical validation for radioimmunotherapy of human ovarian carcinomas Cancer Immunol Immunother, 54(12):1200-13, 2005.
- [58] Bodei L, Cremonesi M. Ferrari M., Pacifici M, Grana, C, Bartolomei M., Baio, Sansovini M, Paganelli G. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with ⁹⁰Y-DOTATOC and ¹⁷⁷LU-DOTATATE: the role of associated risk factors. Eurp Jour Nucl Med Mol Imag 35(10) 1847-1856. 2008.

- [59] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan), Official Site
http://www.zevalin.com/v3/pdf/Zevalin_PI_Website.pdf
- [60] Breeman WA., Vander Wasem K., Bernard BF, van Gameren A, Erion JL, Visser TJ, Krenning EP, de Jong M. The addition of DTPA to [¹⁷⁷Lu-DOTA₀,Tyr₃]octreotate prior to administration reduces rat skeleton uptake of radioactivity, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30(2):312-5, 2003.
- [61] Bouchet LG, Bolch WE. MIRD Pamphlet N° 15. S values in a revised model of brain and head. *J Nucl Med*, 40, 1999.
- [62] Thomas SR, Stabin MG, Chen CT. MIRD Pamphlet N° 14. Revised: a dynamic urinary bladder model for radiation dose calculation. *J Nucl Med*, 40, 1999.
- [63] Bolch WE, Bouchet L G, Robertson JS. MIRD Pamphlet N° 17: The asymmetry of nonuniform activity distribution. Radionuclide S values at voxel level. *J Nucl Med*, 40, 1999.
- [64] Siegel JA, Stephen RT, Stubbs JB. MIRD Pamphlet N° 16: Techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation doses estimates. *J Nucl Med*, 40, 1999.
- [65] Stabin, M.g., Sparks, R.B., Crowe, E. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med*. 46 1023-1027, 2005
- [66] Wang, Z., Martensson, L., Nilsson, R., Bendahl, P., Lindgren, L., Ohlsson, T., Sjögren, H., Strand, S., Tennvall, J. Blood Pharmacokinetics of Various

- Monoclonal Antibodies Labeled with a new trifunctional chelatin reagent for simultaneous conjugation with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*- Tetraacetic acid and biotin before radiolabeling. *Clin Cancer Res* 11(19), 7171- 7177, 2005.
- [67] Fernandez-Sanchez, E., Duocone, J., Surroca, A., Perdomo, Y., González, C., Becquer, M. Disposición Farmacocinética y Biodistribución del Anticuerpo Monoclonal ior EGF/R3 en ratas, conejos y perros. *Acta. Farm. Bonaerense* 21(4): 245-53, 2002.
- [68] Bernhardt, P., Sven Anders Benjegård, S., Lars Kölby, L., Johanson, V., Nilsson, O., Ahlman, H., Forssell-Aronsson, E. Dosimetric comparison of radionuclides for therapy of somatostatin receptor-expressing tumors. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys.* 51(2), 514-524. 2001.
- [69] Naveres, N., Lopez, A., Puerta, N., Zapata, M., Pérez, J., Rojo, A., Crudo, J. Ensayos *in Vitro* e *in-vivo* del péptido marcado ¹⁷⁷Lu-DOTA-sustancia p y evaluaciones de los cálculos dosimétricos en la etapa preclínica. *Alasbimn J.* 12(49) 2010.
- [70] Tennvall J, Fischer M, Bischof Delaloye A, Bombardieri E, Bodei L, Giammarile F, Lassmann M, Oyen W, Brans B; Therapy Committee, EANM; Oncology Committee, EANM; Dosimetry Committee, EANMEur, EANM procedure guideline for radio-immunotherapy for B-cell lymphoma with ⁹⁰Y-radiolabelled ibritumomab tiuxetan (Zevalin), *J Nucl Med Mol Imaging.* 34(4):616-22, 2007.

- [71] Illidge, T., Bayne, M., Brown, N., Chilton, S., Cragg, M., Glennie, M., Du, Y., Lewington, V., Smart, J., Thom, J., Zivanovic, M., Johnson, P. Phase 1/2 study of fractionated ¹³¹I-rituximab in low-grade B-cell lymphoma: the effect of prior rituximab dosing and tumor burden on subsequent radioimmunotherapy. *Blood*, 113(7), 1412-1421, 2007.
- [72] Oliver, P.; Robles, A.; Trindade, V.; Cabral, P.; Tortarolo V.; Nappa, A.; Rodriguez, G.; Balter, H.; Labelling and biological evaluation of anti-CD20 for treatment of Non-Hodgkin's lymphoma. *Trends in radiopharmaceuticals*, IAEA-1294, 2008, 2, 63-70.
- [73] Oliver, P.; Robles, A.; Trindade, V.; Cabral, P.; Rodríguez, G.; Nappa, A.; Balter, H.; Estudios Preclínicos para la producción local de Anti-CD-20 marcado con emisores beta, *Alasbimn Journal*, 2006, 8, 31
- [74] Oliver, P.; Trindade, V.; Cabral, P.; Rodríguez, G.; Nappa, A.; Caldeira, J.; Tortarolo, V.; Robles, A.; Balter, H.; Anti-CD-20-188Re: Labelling and biological performance, *Nucl. Med. Rev.*, 2005, 8, Suppl. A, (19).
- [75] Oliver, P.; Balter, H.; Robles, A.; Optimización de un método de obtención de receptores de membrana para control de moléculas marcadas; *Alasbimn Journal*, 2002, 4(15)