



Facultad de Química  
Universidad de la República  
Pediciba Química



Identificación de nuevos péptidos dirigidos al receptor ErbB3 para la obtención de nuevos radiofármacos SPECT como agentes diagnóstico en cáncer de mama.

Doctorado en Química  
Mirel Cabrera

El presente trabajo para aspirar al grado de Doctora 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: Dra. Mercedes González y Dra. Susan Deutscher  
Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR y Depto. Bioquímica,  
Departamento de Bioquímica, Universidad de Missouri

## Índice

1. Introducción .....	1
1.1. Cáncer .....	1
1.1.1. Cáncer de mama .....	1
1.2. Receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFRs .....	4
1.2.1. Receptor ErbB3, predictor oncogénico .....	5
1.2.2. Expresión de ErbB3 y resistencia en el tratamiento .....	7
1.3. <i>Phage display</i> .....	9
1.4. Bacteriófago o fago .....	13
1.5. Ventaja de la utilización de péptidos frente a anticuerpos .....	14
1.6. Diseño de un radiofármaco en base a un péptido dirigido a un blanco celular .....	15
1.6.1. Agentes bifuncionales .....	16
1.6.2. <sup>111</sup> In .....	17
1.6.3. <sup>177</sup> Lu .....	18
1.6.4. <sup>99m</sup> Tc .....	18
1.6.5. Radiofármacos de <sup>99m</sup> Tc .....	19
2. Objetivos .....	20
2.1. Objetivo General .....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20
3. Materiales y métodos .....	21
3.1. Biotinilización de la proteína ErbB3 .....	21
3.2. Selección de fagos .....	21
3.3. Medida de DO de fagos .....	22
3.4. Titulación de los fagos .....	23
3.5. Extracción de ADN .....	24
3.6. Biotinilización de los fagos .....	25
3.7. ELISA #1 .....	25

3.8. ELISA #2.....	26
3.9. ELISA #3.....	27
3.10. Estudio de unión a células de los fagos anti-ErbB3 biotinilados .....	27
3.11. Marcado de los fagos con Dylight 680 .....	28
3.12. Modelo Animal .....	29
3.13. Biodistribución de los fagos .....	29
3.14. Síntesis peptídica.....	29
3.15. ELISA # 4.....	30
3.16. FACscan .....	31
3.17. Obtención del complejo <sup>99m</sup> Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4 .....	31
3.18. Controles fisicoquímicos de <sup>99m</sup> Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4.....	32
3.18.1. Estudios de estabilidad en solución.....	32
3.18.2. Estudio de estabilidad en suero fetal bovino.....	32
3.18.3. Estudio de lipofilia (log P) .....	32
3.19. Estudios de metabolización <i>in vitro</i> de <sup>99m</sup> Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4.....	33
3.20. Estudios de unión a células de <sup>99m</sup> Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4 .....	34
3.21. Estudios <i>in vivo</i> de <sup>99m</sup> Tc- tricina/HYNIC-GAC- MSP4.....	35
3.22. Obtención de <sup>111</sup> In-DOTA-MSP-3 y <sup>111</sup> In-DOTA-MSP-4.....	35
3.23. Estudio de propiedades fisicoquímicas de <sup>111</sup> In-DOTA-MSP-3 y <sup>111</sup> In-DOTA-MSP-4.....	36
3.23.1. Estudio de estabilidad en suero murino .....	36
3.23.2. Estudio de lipofilia ( log P).....	36
3.24. Estudios de unión a células de <sup>111</sup> In-MSP-3 y <sup>111</sup> In-MSP-4 .....	37

3.25. Estudios <i>in vivo</i> de $^{111}\text{In}$ -MSP-3 y $^{111}\text{In}$ -MSP-4 .....	37
3.26. Obtención de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 y control de estabilidad .....	37
3.27. Estudios de unión a células de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 .....	38
3.28. Estudio de unión a los receptores ErbB2 y ErbB3.....	39
3.29. Imágenes ópticas obtenidas con fagos derivatizados con biotina.....	39
3.30. <i>Click chemistry in vitro</i> .....	40
4. Resultados.....	41
4.1. Selección de fagos.....	41
4.2. Interacción de los clones de fagos seleccionados con receptores ErbB3.....	43
4.3 Estudios <i>in vivo</i> en animales con tumores mamarios que sobreexpresan ErbB3.....	47
4.4. Interacción de los péptidos seleccionados con receptores ErbB3.....	48
4.5. Obtención del complejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4.....	51
4.6. Estabilidad de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 .....	52
4.6.1. Estudio de estabilidad en diferentes condiciones de reconstitución .....	52
4.6.2. Estudio de estabilidad frente a sustancias con afinidad por $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	52
4.6.3 Estudio de estabilidad en suero fetal bovino.....	53
4.6.4 Estudio de metabolización <i>in vitro</i> .....	55
4.6.5 Unión e internalización celular de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-GAC-MSP4 .....	57
4.6.6 Estudios <i>in vivo</i> $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4.....	60
4.7. Obtención de los complejos de $^{111}\text{In}$ con los péptidos MSP3 y MSP4 ..	63
4.7.1 Estudio del marcado.....	63
4.7.2 Estudio de lipofilia.....	64
4.7.3 Estudio de estabilidad en suero murino.....	65

4.7.4 Estudio de unión a células de $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4...	65
4.7.5 Estudio de biodistribución de los péptidos marcados con $^{111}\text{In}$ .....	68
4.8 Obtención del complejo de $^{177}\text{Lu}$ con los péptidos MSP3 y MSP4 .....	70
4.8.1 Marcación de los péptidos.....	70
4.9. Ensayo de unión a células de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4.....	72
4.10. Ensayo de unión a los receptores ErbB2 y ErbB3.....	75
4.11. Obtención de imágenes ópticas en tres pasos .....	77
4.12. <i>Click chemistry in vitro</i> .....	80
5. Discusión y Conclusiones .....	81
6. Bibliografía .....	91
7. Lista de soluciones, buffer y medios de cultivos .....	98
8. Lista de abreviaturas.....	101

## Resumen

En esta tesis se muestran tanto la caracterización *in vitro* como *in vivo* de péptidos y fagos expresando péptidos en su cápside contra el receptor ErbB3.

La tecnología aquí presentada permite un rápido cribado a partir de grandes bibliotecas de fagos en una metodología clásica y funcional desde su descubrimiento como lo es la técnica de *phage display*.

La importancia de esta diana celular radica en que la expresión de ErbB3 posee un valor pronóstico, dado que altos niveles de este receptor están asociados con una supervivencia más corta en pacientes que sobreexpresan ErbB2. A su vez, ErbB3 juega un rol compensatorio en la señalización asociada a la resistencia al tratamiento en cáncer de mama en tumores que sobreexpresan ErbB2. Por ello es de gran importancia monitorear la expresión de ErbB3 y diagnosticarlo *in vivo*, por lo que sería deseable el desarrollo de un agente de imagen que lo reconociese.

El principal objetivo planteado en este trabajo fue el descubrimiento de un péptido anti-ErbB3 obtenido a partir de fagos seleccionados por *phage display* para imagenología molecular de tumores mamarios.

En esta tesis se seleccionaron y desarrollaron dos fagos (MSPC4 y MSPC3) y dos péptidos anti-ErbB3 respectivamente. Se investigó la marcación y caracterización de los distintos péptidos y fagos, obteniéndose imágenes SPECT e imágenes con sistemas ópticos. Se desarrollaron tres métodos de marcación a través de sistemas bifuncionales como lo son DOTA y HYNIC. Se obtuvo para todos los complejos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{177}\text{Lu}$ , pureza radioquímica adecuada y estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, así se mantuvo la selectividad y afinidad por el receptor a nivel *in vitro*. Los sistemas desarrollados en base a los fagos MSPC4 y MSPC3, demostraron tener captación selectiva por el modelo tumoral utilizado. Constituyéndose así como potenciales candidatos a radiofármacos para la detección de tumor de mama a través de imagenología molecular óptica o SPECT.

# **1. Introducción**

## **1.1. Cáncer**

El proceso del cáncer se genera cuando mutaciones genéticas se acumulan en células normales de tal forma que comienzan a exhibir un crecimiento descontrolado. El proceso por el cual una célula normal se transforma en una tumoral se le denomina carcinogénesis. Si el tumor tiene la capacidad de generar metástasis lejos del sitio de origen (tumor primario), es considerado como maligno (Kenneth Pienta J, 2009).

A pesar que cada tipo de cáncer exhibe un único conjunto de características de crecimiento y de morfología (fenotipo), los distintos tipos comparten un grupo de características comunes (Hanahad D, Weinberg RA, 2000). Un tumor es el resultado de un gran número de células cancerígenas que se encuentran dividiéndose activamente y adquiriendo mutaciones, permitiendo así la aparición de un grupo de clones exitosos. Este es un proceso altamente ineficiente, por lo que en los tumores se encuentran muchas células que no van a sobrevivir y están bajo el proceso de apoptosis. Este último proceso surge de mutaciones nefastas, carencia de oxígeno (hipoxia) o de otros nutrientes y de la destrucción por el sistema inmune.

El vasto catálogo de genotipos celulares del cáncer es la manifestación de seis alteraciones en la fisiología que colectivamente dictaminan el crecimiento tumoral: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad ante señales de inhibición de crecimiento, evasión a la muerte programada (apoptosis), potencial replicativo casi ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis.

Estos cambios fisiológicos y las capacidades adquiridas durante el desarrollo tumoral, representan la violación al mecanismo de defensa anticancerígeno sustentado por las células y los tejidos.

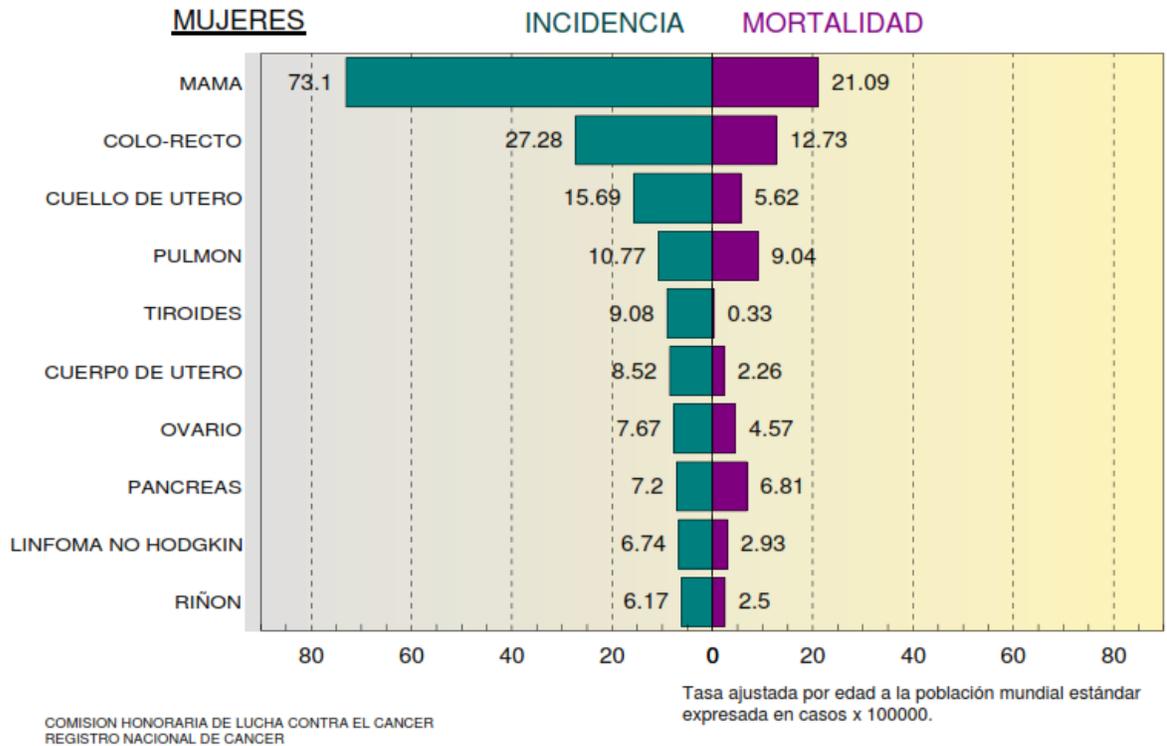
### **1.1.1. Cáncer de Mama**

Más de la tercera parte de los humanos desarrollan cáncer en algún momento de su vida. Es una de las causas más frecuentes de muertes en humanos y es responsable de más del 10 % de las muertes en el mundo llegando a más del 25% en algunos países, entre los cuales se encuentra Uruguay. Más de 200 variedades han sido descritas, las cuales poseen características y tratamientos distintos (American Cancer Society. 2011-2012).

La mayoría de los cánceres de mama son invasivos. Éstos rompen las paredes ductales o glandulares donde son originados y proliferan en el tejido circundante. El pronóstico del cáncer de mama invasivo es altamente influenciado por el estadio de la enfermedad, entre los sistemas de clasificación se destaca el sistema TNM que utiliza información del tamaño tumoral y cuan esparcido se encuentra en la mama (T), cuan extendido se encuentra en los nodos linfáticos (N) y la presencia o ausencia de metástasis distales (M) (en otros órganos). Una vez que T, N ,y M son determinados los estadios 0, I, II, III o IV son asignados, donde 0 se clasifica como *in situ*, estadio I es el estadio más temprano de cáncer invasivo y el IV es el más avanzado de la enfermedad (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG); 2006).

Según datos de la Sociedad Americana de Cáncer en 2013 se estimaron 232340 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres Americanas, así como 64640 casos en estadio 0. Para este mismo año aproximadamente 39620 mujeres mueren a causa de la enfermedad, siendo únicamente el cáncer de pulmón el causante de una mayor cantidad de muertes anuales debido a cáncer.

Según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer de Uruguay los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en nuestro país. Entre éstos, el cáncer de mama es el más frecuente en la mujer, representando el 73.1% del total de casos (período 2007-2011) (figura 1). Mil ochocientos nuevos casos de cáncer de mama son registrados cada año y aproximadamente 630 mujeres mueren por año (Vasallo et al., 2011).



**Figura 1.** Incidencia de cáncer en el Uruguay (2007-2011) principales sitios, ordenados por incidencia

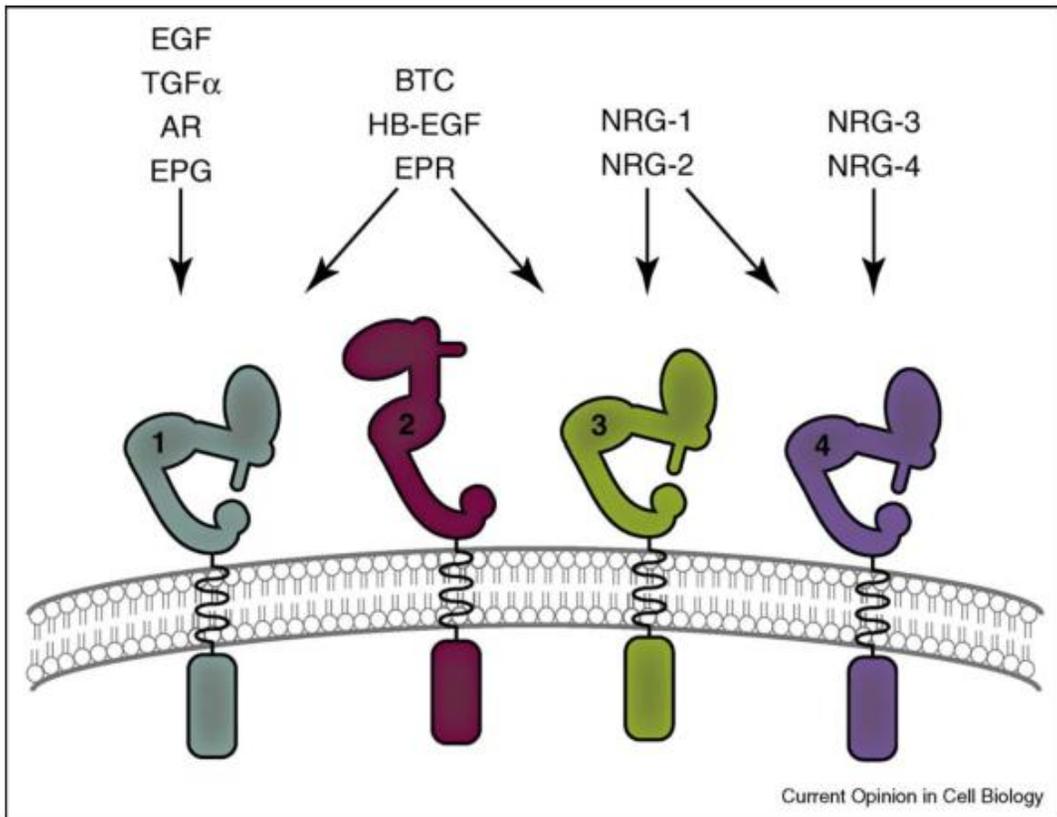
La mayoría de los cánceres de mama corresponden a la variedad ductal, siendo responsables del 80% del total, un 10% corresponde a la variedad lobular, 5% a la variedad medular y el restante 5% está integrado por tumores bien diferenciados (tubulares, papilares, coloides, adenoide quísticos) con mejor pronóstico. El cáncer inflamatorio, independientemente del tipo histológico subyacente, es de peor pronóstico.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea cuya valoración pronóstica se ha basado en parámetros clínicos y anátomo-patológicos.

Se ha demostrado que el factor pronóstico más poderoso está relacionado con la extensión de la enfermedad en los ganglios linfáticos y el tamaño tumoral (Weiss et al., 2003). Otros factores patológicos importantes son la presencia de receptores hormonales, el tipo y grado de proliferación tumoral. La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido estudiar otras variables que permiten una mayor caracterización tumoral. La evaluación de la expresión en células tumorales de moléculas como citoqueratina 5/6, citoqueratina 17, Ki -67 y P 53, receptores hormonales y receptores de factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés EGFR), son otros factores con valor predictivo.

## 1.2. Receptores del factor de crecimiento epidérmico- EGFRs

Existen cuatro miembros dentro de esta familia de receptores, el receptor de factor de crecimiento epidérmico ErbB1 (EGFR), ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (figura 2). Estos son típicamente receptores tirosina quinasa, con un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana, y la región citoplasmática con acción tirosina quinasa (Hynes, Macdonalds; 2009). Los ligandos para esta familia se dividen típicamente en tres grupos: el primer grupo que incluye factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), factor transformante de crecimiento ( $TGF-\alpha$ ), amfíregulina (AR) y Epigen (EPG), el cual se une específicamente a EGFR. El segundo grupo incluye betacelulina (BTC), factor de unión a heparina EGF (HB-EGF) y epiregulina (EPR), los cuales tienen una especificidad dual uniéndose tanto a EGFR como ErbB4. El tercer grupo, las neuregulinas (NRGs), forman dos grupos basadas en su capacidad de unión a ErbB3 y ErbB4 (NRG-3, NRG-4) (Hynes, Lane; 2005).



**Figura 2.** Los receptores ErbB(HER) y sus ligandos, los cuatro miembros de RTKs, EGFR (1), ErbB2 (2), ErbB3(3), ErbB4(4). (Hynes, Macdonalds; 2009).

La unión de los ligandos inicia la cascada de señalización causando la formación homodimérica o heterodimérica de los receptores y activando el dominio quinasa citoplasmático que fosforila tirosinas en la región de la cola de cada receptor. Cabe destacar que el receptor ErbB3 no posee actividad quinasa y adquiere el mencionado potencial sólo cuando dimeriza con otro receptor.

Los receptores ErbB son llave de mecanismos y cascadas de señalización que incluyen procesos fundamentales como ser la proliferación, la migración, el metabolismo y la supervivencia celular (Hynes, Lane; 2005).

Se ha constatado que los EGFR se encuentran sobreexpresados en un 80% de los cánceres de cabeza y cuello, mutados y/o activados por amplificación en un 50% de los gliomas, activados por mutación en un 10-15% en cáncer de pulmón y en un 25- 30% en cáncer de mama. (Hsieh, Moasser; 2007)

### **1.2.1. Receptor ErbB3, predictor oncogénico**

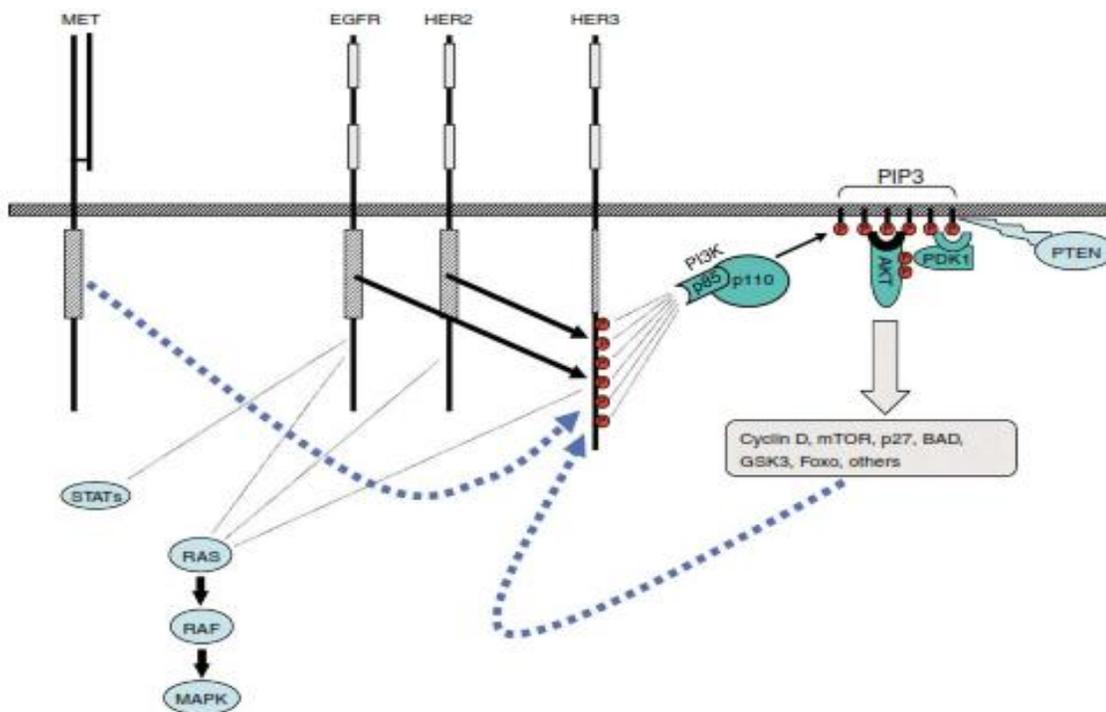
El receptor ErbB3 es codificado por el gen ERBB3 que mapea en el cromosoma 12q13. Su mRNA codifica una glicoproteína transmembrana de 185 kDa, que está compuesta de tres regiones, un dominio amino terminal extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular carboxilo terminal.

El receptor se encuentra fisiológicamente expresado en una gran variedad de tejidos normales, que incluyen células del tracto gastrointestinal, urinario, respiratorio y reproductivo, así como la piel, sistema endócrino y nervioso (Prigent, et al.; 1992).

Desde el punto de vista patológico su sobreexpresión es usualmente acompañada de la sobreexpresión de EGFR y de ErbB2 (Giltneane, et al.; 2009). Estudios histológicos vinculan su sobreexpresión con un pobre pronóstico en diversas clases tumorales que incluyen mama, cabeza y cuello y gástrico (Takikita, et al.; 2011; Hayashi, et al.; 2008).

Los ligandos para el receptor ErbB3 son miembros de la familia de las NRG. Los ligandos se unen directamente al dominio extracelular lo cual provoca un rearrreglo conformacional, este cambio expone el dominio de dimerización que conforma el core de la interface del dímero con otro miembro de la familia HER. Incluso en el cáncer con sobreexpresión de ErbB2 el dímero ErbB2:ErbB3 pueden formarse de una manera independiente a la unión del ligando (Mukherejee, et al.; 2011). Luego de la heterodimerización con otros miembros de la familia HER la región

tirosina quinasa del receptor es transfosforilada, esta transfosforilación crea sitios de unión que permiten el reclutamiento de proteínas que continúan la cascada de señalización. Estas señales incluyen: el receptor de unión al factor de crecimiento 7 (GRB7) que activa la vía RAS-MAPK a través de la proteína quinasa RAS. En suma en esta vía el receptor ERbB3 en su dominio citoplasmático contiene 6 sitios de unión para la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Campbell, et al.; 2010). Cuando PI3K se activa fosforila en la membrana a bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>), el cual forma trifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>3</sub>), el cual conlleva a activar la vía PI3K/AKT la cual controla muchos procesos biológicos (figura 3), que incluyen la sobrevida y ciclo celular, regulación metabólica, y traslación, procesos indispensables en la tumorigénesis.



**Figura 3.** Ilustración esquemática del rol de ErbB3 en la activación de la vía PI3K/Akt. A pesar de los tres receptores pueden activar la vía Ras-Raf-MAPK, solamente el receptor ErbB3 es capaz de activar directamente la vía PI3K/Akt. (Hsieh, Moasser; 2007).

La expresión de ErbB3 posee un valor pronóstico, dado que altos niveles de este receptor están asociados con una sobrevida más corta en pacientes que sobreexpresan ErbB2 (Kronqvist, et al.; 2011). A su vez, ErbB3 juega un rol compensatorio en la señalización asociada a la resistencia al tratamiento en cáncer de mama en tumores que sobreexpresan ErbB2. En los tratamientos que implican la inhibición de tirosina quinasa conllevan a un aumento en la señalización debido a un

cambio en el equilibrio desfosforilización-fosforilación del receptor; esto es debido a un aumento en la expresión en la membrana y por una disminución de la actividad fosfatasa (disminuyendo la acción de desfosforilización). Por mucho tiempo se ha asumido que el dominio quinasa es inactivo, por lo que se ha clasificado como una pseudoquinasa. Sin embargo hay evidencia (Shi, et al.; 2010) que es capaz de unir ATP y promover una trans-autofosforilación de su dominio intracelular en el contexto de un heterodímero. Esta actividad tirosina quinasa es 1000 veces más débil que para los otros miembros de la familia.

### **1.2.2. Expresión de ErbB3 y resistencia en el tratamiento**

De los cuatro receptores ErbB, ErbB3 es el más adecuado para activar la vía PI-3/Akt, dado que es el que posee un mayor número de residuos tirosina en su C-terminal, una vez son fosforilados son capaces de unirse a la subunidad p85 de PI-3k (Mattoon, et al.; 2004). De hecho a pesar de todos los complejos diméricos de la familia ErbB, el heterodímero ErbB2/ErbB3 es el más activo y potente en la señalización de la mencionada cascada. Desde que ésta es la vía de señalización más importante en la supervivencia de la proliferación celular, y su activación muchas veces es la responsable de la resistencia a muchos fármacos en el tratamiento del cáncer, es comprensible que una de las mayores consecuencias a nivel biológico de la activación de ErbB3 es la falla en los tratamientos oncológicos (Amin, et al.; 2010).

Existe en la literatura evidencia sólida que establece el rol crítico de ErbB3 como un co-receptor para la amplificación del oncogen ErbB2 (Campbell, et al.; 2010), más comúnmente observado en cáncer de mama, pero también se ha constatado en otros tipos tumorales.

De hecho si la expresión de ErbB3 es limitada o nula (*knock down*), los tumores con sobreexpresión de ErbB2 cesan de crecer y experimentan muerte celular por apoptosis (Holbro, et al.; 2003. Lee-Hoeflich, et al.; 2008). Considerando que la expresión de ErbB2 es generalmente constante en estos tipos de tumores, la regulación en la expresión de ErbB3 es un controlador en la señalización del dímero ErbB2/ErbB3. En este contexto el receptor ErbB3 es el activador alostérico de ErbB2 así como un sustrato crítico en la señalización, y como tal, cumple funciones tanto hacia arriba como hacia abajo en la cascada de señalización de ErbB2, redefiniendo la importancia del complejo ErbB2/ErbB3 como un funcionalmente relevante promotor oncogénico.

El principal reto técnico del receptor ErbB3, es que la diferencia de los otros miembros de la familia, es que la función de este receptor no está mediado por actividad catalítica enzimática, por ello es que ninguna clase de inhibidor de tirosina sería adecuado para este receptor.

La estrategia más tradicional para receptores tras membranas es interferir con el sitio de unión al ligando o con la activación inducida por éste. El éxito en esta hipótesis depende de asumir que la unión al ligando activa un cambio conformacional del receptor y esto fuerza la progresión tumoral.

El anticuerpo monoclonal anti-ErbB2, pertuzumab, fue desarrollado para unirse a la interface de dimerización de ErbB2, e impedir la inducción por ligando de la dimerización ErbB2/ErbB3. A pesar que pertuzumab es efectivo inhibiendo la señalización de ErbB3 inducida por neuregulina (Lee-Hoeflich, et al.; 2008), es mucho menos efectivo impidiendo la interacción y los niveles basales del dímero ErbB2/ErbB3 formado independientemente del ligando en células tumorales que sobreexpresan el ErbB2 (Cai, et al.; 2008). Esto no es sorprendente dado que la conformación del dominio extracelular del receptor ErbB3 unido o no al ligando es estructuralmente diferente. La naturaleza física de la interacción que produce la transactivación del dímero ErbB2/ErbB3, en la ausencia del ligando no está bien comprendida y en este punto el concepto de señalización independiente del ligando permanece sin un descriptor estructural.

El mayor reto estratégico en el desarrollo de un agente de unión ErbB3, es predecir la población de pacientes y estadificar los distintos subtipos de cáncer que serán sensibles a esta modalidad de tratamiento. De manera distinta a otros receptores blancos celulares la funcionalidad de ErbB3, no es debida directamente a su sobreexpresión, amplificación, o mutación, haciendo más difícil la identificación de tumores dependientes de este receptor. Es en este punto, que ha sido confirmada la función crítica de ErbB3 en la amplificación de ErbB2 en cáncer de mama, y fuertemente implicado en cáncer de pulmón (Campbell, et al.; 2010).

El receptor ErbB3 puede ser considerado como un biomarcador predictivo en la eficacia de la terapia de cáncer de mama que sobreexpresa el ErbB2. El desarrollo de agentes terapéuticos para este receptor ha demostrado ser una manera efectiva de evitar la resistencia a la terapia hormonal, quimioterapia y radioterapia. Por lo que la activación en la señalización de este receptor no sólo confiere resistencia a los fármacos en el tratamiento de cáncer sino que también promueve la metástasis tumoral (Katso, et al.; 2001). Por ello es de gran importancia monitorear la expresión de ErbB3 y diagnosticarlo *in vivo*, por eso sería deseable el desarrollo de un agente

de imagen. Dicho agente puede incluso mediar un efecto terapéutico ya sea a través de su interacción bloqueando al receptor o entregando un potente agente radioactivo o químico activo a la célula tumoral.

A pesar que hay descrito numerosos estudios de agentes terapéuticos utilizando anticuerpos monoclonales, esta clase de agentes no es siempre óptimo para alcanzar los tumores sólidos; debido al gran tamaño de las moléculas de IgG que tienen poca capacidad de penetración en tejidos (Chang, et al.; 2011), la cual puede limitar la eficacia en la distribución del anticuerpo a los tumores. En suma la larga vida media que presentan los anticuerpos *in vivo* resulta en señal alta en sangre lo que relativiza la relación tumor-sangre en un agente de imagenología molecular, por ello una estrategia más adecuada es la utilización de péptidos (Holliger, Hudson; 2005).

### **1.3. Phage display**

Tanto la biología molecular como las técnicas de ingeniería genética, han permitido la creación de amplias y diversas poblaciones de moléculas (por ejemplo anticuerpos, proteínas, péptidos), de los cuales han sido aisladas novedosas variantes individuales con mejor unión o propiedades catalíticas. La utilidad de estas bibliotecas genéticas ha sido ejemplificada en la expresión de péptidos o anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos a través de la técnica de *phage display* (McCafferty, Schofield; 2015).

Las bibliotecas de péptidos son una valiosa fuente para identificar péptidos bioactivos que interaccionen con blancos expresados en patologías como el cáncer (Mori; 2004).

*Phage display* es una técnica innovadora que se utiliza para seleccionar péptidos, proteínas o anticuerpos de una gran colección de fagos que exponen en sus superficies distintos péptidos, proteínas o anticuerpos. Esta colección de fagos se les llama genoteca, o biblioteca de péptidos, proteínas o anticuerpos. George P. Smith es considerado el padre de la técnica de *phage display*. Smith demostró en 1985 que manipulando el genoma de los fagos se podía obtener partículas con péptidos fusionados a proteínas de su cápside o superficie (Smith; 1985). Doce años después junto a la Dra. Petrenko presentaron detalladamente la nueva tecnología (Smith, Petrenko; 1997). La tecnología, técnica o sistema *phage display* consiste en exhibir péptidos, proteínas o anticuerpos en la superficie de partículas de fagos. Una característica importante de este sistema es la introducción de secuencias peptídicas exógenas dentro del sitio del genoma que codifica para las proteínas de la cápside del fago como la proteína pIII o pVIII (Smith, Scott; 1993).

Las partículas de fagos que presentan proteínas (péptidos o anticuerpos) en sus superficies pueden ser seleccionadas con una diana de interés (por ejemplo un antígeno) inmovilizada en la superficie de un inmunotubo o acoplada a partículas magnéticas. La diana tiene que tener cierta afinidad a la proteína expuesta en la superficie del fago para capturar aquellos fagos que tengan la proteína en su superficie. Todas las partículas de fagos que no se unan a la diana de interés son eliminadas mediante sucesivos lavados. Las partículas de fagos capturados son eluidos primeramente y después son utilizadas para infectar *Eschericia coli* (*E. coli*) y permitir la amplificación de estos fagos para ser utilizados en un nuevo ciclo de selección (Smith; 1985). De esta forma, se puede seleccionar de una gran población de fagos que expresen péptidos, proteínas o anticuerpos monoclonales en su superficie uno o varios clones que se unan de forma específica a una diana de interés. Una biblioteca típica contiene  $10^9$  péptidos y usualmente se pueden identificar más de uno que se una a la diana de interés con alta afinidad. Péptidos terapéuticos desarrollados a través de la técnica de *phage display* que actualmente se encuentran en estudios clínicos incluyen: DX-88 un inhibidor de killikrein para el tratamiento de angioedema hereditario (Ritchie; 2003), DX-890 un inhibidor de la elastasa neutrófila para el tratamiento de fibrosis cística (Wark; 2002). A su vez en numerosas publicaciones científicas se describen péptidos dirigidos a tumores o vasculatura tumoral (Landon, Deutscher; 2003; Zurita, et al., 2003; (Haubner, Wester; 2004). De estas grandes bibliotecas se han obtenido péptidos capaces de unirse casi que a cualquier blanco que sean expuestos, como ser receptores celulares (Johnson, et al.; 1998), enzimas (Atwell, Wells; 1999), ácidos nucleicos (Agris; 1999) y carbohidratos (Peletskaya, et al.; 1997).

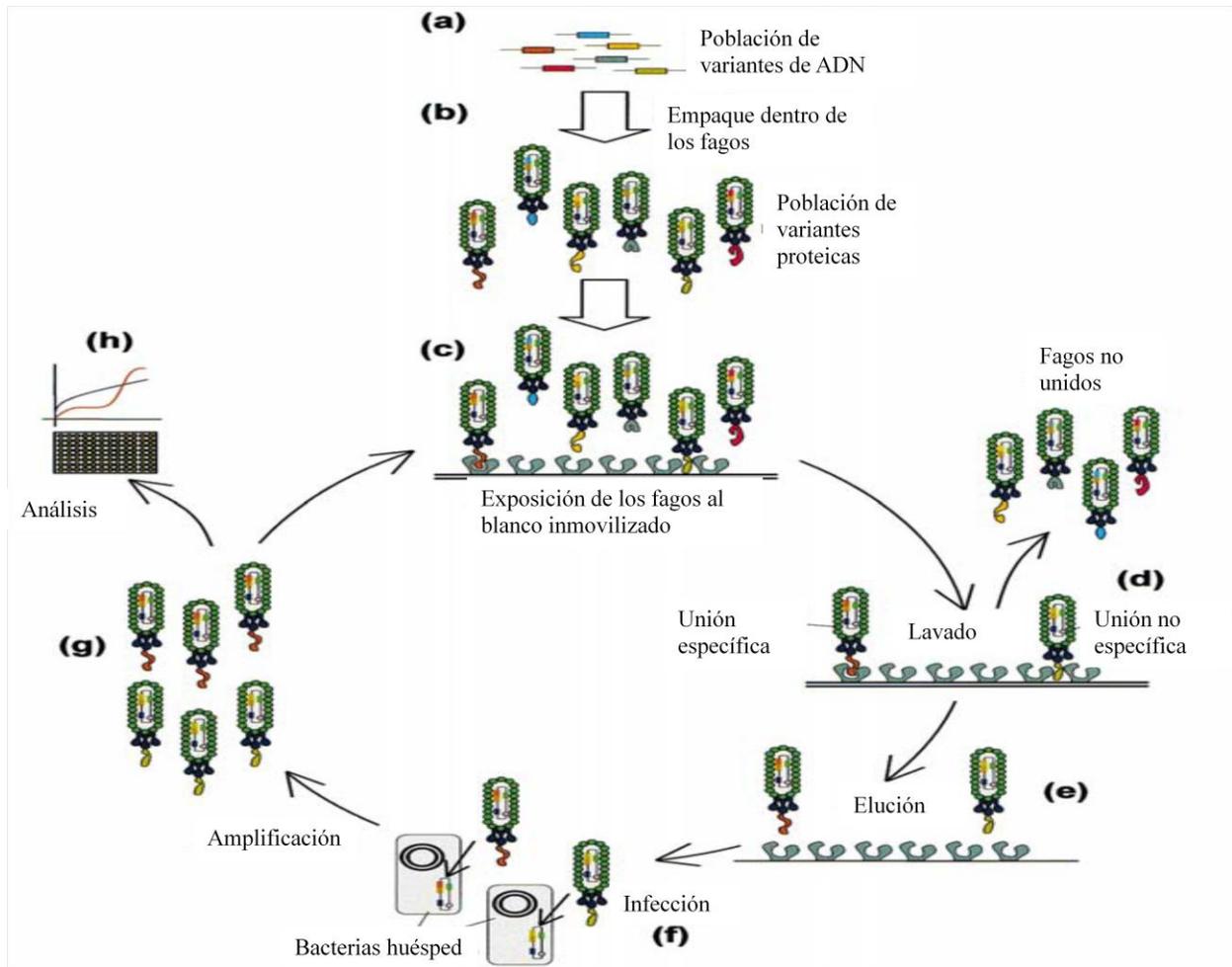
La utilidad de la tecnología de *phage display* radica en la biología del fago. Los fagos son virus que contienen ADN y pueden infectar bacterias, por tanto pueden ser modificados genéticamente de manera que expresen polipéptidos en su superficie a partir de ADN encapsulado en la partícula viral. Es por ello que el fenotipo del fago está estrechamente ligado a su genotipo.

Dos clases de bacteriófagos han sido utilizados en la técnica de *phage display*, fago filamentosos (M13, f1, y fd) y fagos líticos (T7, T4, y  $\lambda$ ) (Castagnoli, et al.; 2001). Las partículas de fago filamentosos tiene un diámetro aproximado de 5nm y  $1\mu$  de longitud. Los péptidos son expresados en el amino terminal de la proteína III (pIII), o en la proteína VIII (pVIII). P III es la proteína de cápside menor presentando cinco copias y ubicada en el extremo de la partícula del fago. Los péptidos fusionados a esta proteína son expresados en un menor número de copias o de

manera monovalente. P VIII es la proteína de cápside menor de M13, donde miles de copias encapsulan el genoma del fago. Los péptidos fusionados a esta proteína pueden ser expresados en un gran número de copias, lo que se conoce como *landscape phage display* (Petrenko, Smith; 2000).

La morfogénesis del fago puede ser dividida en tres pasos: Infección de la célula hospedero, Traslación y ensamblaje de las partículas del fago y Liberación al espacio extracelular. Los fagos filamentosos inician el proceso de infección con una interacción entre pIII y el F pilus de *E. coli*. Proceso que involucra proteínas tanto del fago como de la bacteria. Por otra parte los fagos líticos inician la infección a través de fibras de su cola y lipopolisacáridos de la superficie de *E. coli*, luego de esto el genoma del fago y sus proteínas son inyectadas en la célula hospedera a través de su cola (Kemp, et al; 2005). El ensamblaje de los fagos líticos ocurre en el citoplasma de *E. coli* y los viriones maduros son liberados por lisis celular.

Las bibliotecas de *phage display* son creadas con técnicas de biología molecular estándar, que implican la inserción de oligonucleótidos al azar en el marco que codifica para las proteínas de la cápside. Los péptidos así creados pueden ser seleccionados por afinidad ante un determinado blanco celular a partir de una compleja mezcla de billones de péptidos expresados, posteriormente propagados por amplificación y sujetos nuevamente a una nueva ronda de selección en un proceso llamado *biopanning*.

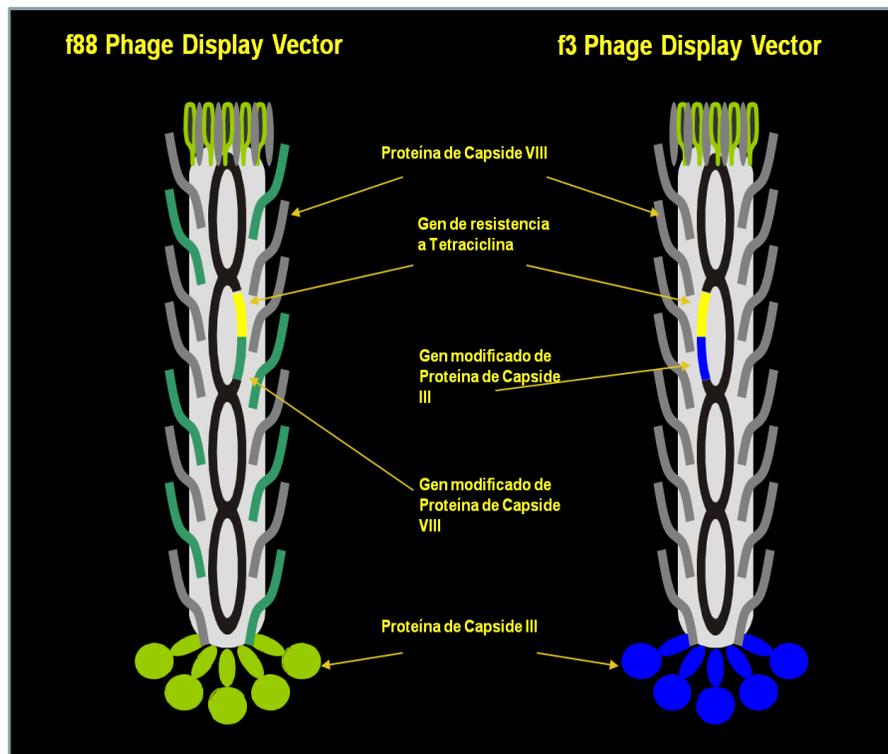


**Figura 4.** *Phage display*, Proceso de *Biopanning* (selección) *in vitro* ante una diana de interés inmovilizada, típicamente el proceso se repite 3-5 veces de modo de obtener un eluato con una afinidad deseada.

Con los pasos de *biopanning* (selección), una población de fagos que expresan péptidos (biblioteca de péptidos), proteínas o anticuerpos monoclonales (genoteca, biblioteca de anticuerpos) se va enriqueciendo de clones con mayor afinidad a la diana inmovilizada en una superficie. La biblioteca de péptidos es incubada con el blanco, lavado de manera de remover el fago unido no específicamente y luego eluido para colectar el fago de interés (figura 4). La nueva población de fagos es utilizada para realizar nuevos pasos de selección. Comúnmente se realizan 3-5 pasos de selección. En cada paso la población de fagos con afinidad a la diana de interés se va enriqueciendo con clones con mayor afinidad a la diana y se van eliminando aquellos clones con menor afinidad a ésta (Scott, 2001).

#### 1.4. Bacteriófago o fago

Los fagos filamentosos constituyen un vasto número de bacteriófagos con una forma, tamaño y ciclo vital similar. Los fagos más estudiados son f1, fd y M13, y todos ellos se replican en células de *E. coli*. La partícula de fago posee forma filamentosa y 930 nm de longitud, 6.5 nm de diámetro que contienen ADNss de aproximadamente 6400 bp, empaquetados en cinco proteínas de cubierta llamadas pIII, pVIII, pVI, pVII y pIX (Cabilly; 1999). La proteína, pVIII envuelve el ADN del fago con 2800 copias conformando una estructura simétrica helicoidal (figura 5). Cuando el ADN del fago es incrementado debido a una inserción, el número de copias de pVIII aumenta para compensar el incremento (Glucksman, et al.; 1992). En el extremo proximal del virión (el extremo más próximo a la membrana al dejar la célula huésped), las proteínas pVII y pIX forman una estructura de 30 Å. Estos son dos pequeños péptidos hidrofóbicos (32 y 33 kDa respectivamente) que juegan un papel importante en el ensamblaje de la cápside del fago, dado que sirven como núcleo para la subsecuente deposición de la proteína pVIII.



**Figura 5.** Representación esquemática de las partículas de los bacteriófagos filamentosos f88 y f3, destacando los sitios de expresión de péptidos en las proteínas de cápside pIII y pVIII.

La fusión de las partículas de fago en las células de *E. coli* ocurre por la interacción de los pili bacterianos y el dominio amino terminal de la proteína pIII (Riechmann, Holliger; 1997). Luego de una manera desconocida hasta el momento, este mecanismo provoca la retracción del pilus, y la partícula trasvasa la membrana celular, el ADNss penetra en el citoplasma en donde se replica a ADNds (la forma replicativa del fago). Una vez que las proteínas de superficie del fago son producidas por *E. coli*, éstas se mueven a la parte interna de la membrana de la bacteria y se asocia con ésta. El ADNss circular de las partículas de fago se propagan en el citoplasma bacteriano y las partículas asumen una estructura unida a dímeros de la proteína pV (Makowski; 1992).

De las cinco proteínas de la cápside sólo pIII, pVI y pVIII han sido utilizadas para expresar péptidos en la partícula viral, donde pIII es la proteína más grande, contando con 406 aminoácidos. Smith fue el primero en demostrar que el amino terminal de pIII, el cual protruye de la superficie de fago puede tolerar inserciones de polipéptidos por años (Smith, 1985).

El número de péptidos expresados en el virión está en concordancia con el número de proteínas de la cápside, 5 en pIII y 2800 en pVIII. Para algunos propósitos es ventajosa la multiplicidad de péptidos, pero esto limita la habilidad de distinguir fagos con diferentes afinidades de unión, o seleccionar péptidos con alta afinidad (Lowman, et al.; 1991).

### **1.5. Ventaja de la utilización de péptidos frente a anticuerpos**

La ingeniería de anticuerpos ha proporcionado muchos avances en la terapéutica y el diagnóstico específico de blancos tumorales. Los anticuerpos monoclonales recombinantes (mAb) poseen las propiedades generales de alta especificidad y afinidad por la diana molecular para lo que fueron diseñados, y actualmente se encuentran más 400 mAb en ensayos clínicos.

A pesar de que las terapias basadas en anticuerpos han aumentado la perspectiva de vida de muchos pacientes con cáncer, estas terapias son de eficacia limitada, especialmente contra tumores sólidos, (Stern, Herrmann; 2005) debido en parte al tamaño de las moléculas (aproximadamente de 160 kDa), la elevada presión intersticial en el tumor, captación no específicos en el sistema retículo endotelial y inmunogenicidad (Jiang, et al.; 2004).

Las investigaciones indican que las propiedades farmacocinéticas se mejoran con el uso de pequeños ligandos (Reilly, et al.; 1995). Como los péptidos son moléculas mucho más pequeños (1-2 kDa) que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y demuestran alta especificidad y

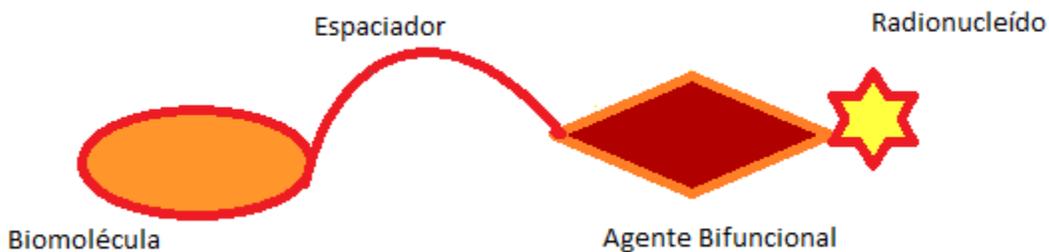
afinidad por sus blancos, éstos podrían subsanar en parte la complicaciones asociadas con la terapia con anticuerpos (Ladner, et al.; 2004).

En general, los péptidos presentan una mejor penetración tumoral y están sujetos a menor captación no específica, y no deberían provocar una respuesta inmune. Las bibliotecas de péptidos aleatorias producidas por tecnología de *phage display* son una valiosa fuente de recursos para la identificación de péptidos bioactivos que interactúan con blancos moleculares implicados en el desarrollo del cáncer (Mori; 2004).

### 1.6. Diseño de un radiofármaco en base a un péptido dirigido a un blanco celular

Los radiofármacos basados en péptidos, ya sean diseñados como agentes terapéuticos o de imagen molecular marcados con radionucleídos, pueden ser divididos en cuatro componentes (Oktavi, Maeckev; 2014):

- La biomolécula que actúa como vector específico
- El grupo o molécula espaciadora
- El agente quelante bifuncional
- El radionucleido



**Esquema 1.** Representación de la composición de un radiofármaco

El vector puede ser una gran biomolécula como es el caso de los anticuerpos, o moléculas más pequeñas, entre ésta y el radiometal se encuentra el agente bifuncional, donde por un extremo se encuentra unido covalentemente o a través de un espaciador a la biomolécula y por el otro coordina al radionucleído metálico.

Una gran variedad de agentes bifuncionales se encuentran disponibles hoy en día para la coordinación al radiometal y su elección dependerá de la naturaleza química del radionucleído que se empleará tanto para terapia como para diagnóstico. La elección del espaciador dependerá de las propiedades farmacocinéticas deseables, éstos pueden ser catiónicos, aniónicos, neutros o clivables metabólicamente. En el caso de los péptidos la función del espaciador usualmente es aumentar la hidrofiliidad de manera que sean eliminados por vía renal; dado que la naturaleza del vector es restringida por la naturaleza del receptor al que se une, el espaciador cumple la función de mejorar la farmacocinética del mismo. Otra función que cumple es justamente aumentar la distancia entre la biomolécula y el radionucleido para mejorar cualquier impedimento estérico que pueda darse entre ésta y el grupo de coordinación al metal.

La elección del radionucleído dependerá de:

- El tratamiento médico objetivo (terapia o diagnóstico)
- La disponibilidad
- La dosis requerida
- El período de semi-desintegración
- El costo

Los radionucleídos metálicos son la base de los radiofármacos y su coordinación es dependiente de su naturaleza química. El agente de coordinación en pequeños péptidos es determinante en su biodistribución, dado que en gran manera influencia la carga, tamaño y peso molecular del radiofármaco, es por ello que el diseño racional y una correcta elección del agente bifuncional es de vital importancia en el desarrollo de un radiofármaco que cumpla exitosamente su objetivo.

### **1.6.1. Agentes bifuncionales**

Estas clases de agentes cumplen con tener un sitio de coordinación al metal y un dominio que permita unir de forma covalente a la biomolécula. Generalmente hay dos estrategias para acoplar una biomolécula a un complejo metálico de coordinación, una estrategia de pre-conjugación u otra de post-conjugación (Oktavi, Maeckev; 2014). En la primera la química de marcación es bien definida dado que el radiometal se coordina al agente quelante previo al paso de coordinación con la biomolécula. De esta manera se evita que esta última se exponga a las duras condiciones de radiomarcado, permitiendo incluso un medio no acuoso para el paso de

conjugación; usualmente como este paso no es equivalentemente cuantitativo es requerido un paso extra de purificación. La desventaja que posee este método es que dado que es multietapa no es práctico pensando en una rutina a nivel clínico.

En el método de post-conjugación, el agente bifuncional se une al péptido durante su síntesis y posteriormente se introduce el radiometal luego de la conjugación del grupo de coordinación a la biomolécula. Esta estrategia es más adecuada para una práctica clínica dado que permite la formulación en forma de kits, donde al vial de marcación basta agregarle la solución conteniendo el radionucleído para que se dé la marcación.

Los ligando bifuncionales poseen un grupo reactivo en su estructura, pudiendo ser un grupo aromático isotiocianato, o un éster activado que reaccionarán con grupos nucleofílicos de la biomolécula ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$  o  $\text{OH}$ ). Para la conjugación del quelante a la biomolécula, es usual la transformación de un grupo carboxilato para formar un éster activo que reaccionará con una amina primaria ya sea de una cadena lateral de una lisina o el  $\text{NH}_2$  terminal del péptido. La mencionada reacción forma un enlace peptídico el cual es sumamente estable en condiciones fisiológicas.

### 1.6.2. $^{111}\text{In}$

El  $^{111}\text{In}$  es un radionucleído relevante para imágenes SPECT, con un período de semi-desintegración de 2.8 días y con energía gamma de 171 y 245 keV. La producción, purificación y aplicación de radiometales de indio son activas áreas de investigación en medicina nuclear, radioquímica e imagenología molecular. El  $^{111}\text{In}$  es producido comercialmente por irradiación de cadmio con protones, alternativamente puede ser producido en un acelerador irradiando un blanco de rodio ( $^{103}\text{Rh}$ ) con  $^{12}\text{C}$  o irradiando plata ( $^{107}\text{Ag}$ ) con  $^{11}\text{B}$  (Lahiri, et al.; 2013).

El  $^{111}\text{In}$  se ha utilizado para la marcación del anticuerpo monoclonal trastuzumab, desarrollando un agente de imagen para tumores que sobreexpresan el receptor ErbB2. Sin embargo la lenta eliminación del anticuerpo monoclonal brinda relaciones tumor-sangre y tumor-tejido normal bajos, lo que ha forzado a los investigadores a desarrollar sistemas más pequeños para mejorar la biocinética de los agentes de imagen, sin sacrificar la especificidad. Por ejemplo fragmentos de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab se han obtenidos con alta pureza radioquímica; sin embargo los valores de  $K_d$  para estos ligandos son dos veces menor que el anticuerpo (Lub-de Hooge, et al.; 2004).

Los estudios de biodistribución muestran relaciones tumor-tejido no blanco elevados, pero con alta captación a 72 h a nivel renal.

### 1.6.3. $^{177}\text{Lu}$

El  $^{177}\text{Lu}$  es un emisor beta de baja energía con un período de semi-desintegración de 6.75 días. Posee una energía máxima de 0.5 MeV y una penetración promedio en tejidos de 2 mm. El  $^{177}\text{Lu}$  también es emisor gamma, con una energía de 113 keV (6.4%) y 208 keV (11%), lo cual lo hace un radionucleído adecuado para la adquisición de imágenes SPECT. El  $^{177}\text{Lu}$  es producido en reactor a partir de  $^{176}\text{Lu}$  enriquecido. El  $^{177}\text{Lu}$  puede ser quelado por DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) o por DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), dado que es un elemento perteneciente a los lantánidos, en particular los mencionados elementos forman complejos más estables con DOTA que con DTPA (Oktavi, Maeckev; 2014).

Dependiendo de la localización y del tamaño del tumor la elección del emisor beta puede ser diferente. Un emisor de gran energía posee un rango de penetración en tejidos grande por lo que es menos efectivo para el tratamiento de pequeños tumores dado que la mayor cantidad de energía se deposita fuera del tumor. Es por ello que partículas beta de mayor energía (como lo es  $^{90}\text{Y}$ ) son más apropiados para el tratamiento de tumores de grandes dimensiones y con una distribución heterogénea de sus receptores.

### 1.6.4. $^{99\text{m}}\text{Tc}$

El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es un elemento artificial obtenido por el decaimiento  $\beta^-$  del  $^{99}\text{Mo}$  (Mazzi; 2007). Es el elemento 43 de la tabla periódica, fue descubierto por Carlo Terrier y Emilio Segré en una mezcla de productos de irradiación obtenida en el laboratorio Berkely y recibió el nombre de Tecnecio en 1947.

El descubrimiento se produjo a partir del bombardeo del molibdeno con deuterones de 8 MeV en un ciclotrón; que dio lugar a una especie radioactiva de molibdeno (vida media de 66 h) la cual decae por emisión  $\beta^-$  a un isótopo de corta vida media (6 h) con novedosas propiedades, que fue identificado como  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . El elemento pertenece al grupo VIIB de la tabla periódica, entre el manganeso y el renio. El radio atómico del tecnecio es similar al del renio, por tanto le confiere

similitudes en su química. La configuración electrónica del átomo neutro es  $[\text{Kr}]4d^65s^1$ , indicando en su capa de valencia los orbitales 4d y 5s, por lo que el Tc puede presentar muchos estados de oxidación, variando desde (VII) a (-I). Los estados más estables son VII, V, IV, III, I y O. El estado más alto de oxidación (VII) da lugar a la formación del anión pertecneiato ( $\text{TcO}_4^-$ ), forma química bajo la cual se eluye del generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . La reactividad química del pertecneiato es pobre, no se une directamente a ningún ligando.

Por ello, es necesaria la reducción del estado de oxidación VII a niveles de oxidación más bajos, en presencia de un ligando adecuado para la síntesis de moléculas marcadas. Durante la reducción, el ligando estabiliza el estado de oxidación, pero por otro lado se puede formar el coloide de  $\text{TcO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$  en un medio acuoso.

### **1.6.5. Radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$**

Estos radiofármacos han sido tradicionalmente clasificados en amplios términos basados en el rol del tecnecio sobre el destino final del complejo. Las dos categorías de los radiofármacos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  son comúnmente denominadas como agentes esenciales de tecnecio y agentes de marcado con tecnecio (Bartholoman, et al.; 2010). Para los radiofármacos de tecnecio esenciales, su incorporación es clave para determinar la estructura y carácter físicoquímico general, y por lo tanto la localización y destino biológico de la molécula. Esta clase de radiofármacos por lo general poseen bajo peso molecular, donde su distribución biológica está determinada por la perfusión y las características físicoquímicas de los complejos de coordinación, como ser: tamaño, forma, carga y lipofilia. Su captación en general, está orientada a los sistemas y procesos de alta capacidad, incluyendo la fagocitosis, remoción por los hepatocitos, filtración glomerular y absorción ósea.

La segunda clase (agentes marcados con tecnecio), la biodistribución del reactivo que contiene tecnecio se determina por algún sitio del receptor, o por la química o proceso enzimático asociado a la molécula transportadora del sustrato. En el caso ideal, la afinidad por el objetivo biológico debe ser independiente de la presencia del tecnecio.

Los primeros radiofármacos de tecnecio se desarrollaron aprovechando propiedades fisiológicas tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción de varios complejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , y fueron utilizados para obtener imágenes de la tiroides, hígado, huesos, riñones, etc. El cuidadoso diseño de nuevos complejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  llevó al descubrimiento de agentes para obtener imágenes

del flujo sanguíneo (perfusión) en el tejido muscular del corazón (miocardio) y el cerebro. En la actualidad, las imágenes SPECT con derivados del  $^{99m}\text{Tc}$  es a menudo un componente importante de la evaluación de pacientes con conocida o sospecha de enfermedades de las arterias coronarias (Beneficial Uses and Production of Radioisotopes, 2004).

También se descubrió que algunos de los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  utilizados para estudios renal y cardíaco también se acumulaban en algunas formas de tumores primarios, lo que ha llevado a la utilización de  $^{99m}\text{Tc}$  en investigaciones en el desarrollo de agentes de imagen para el cáncer en su mayoría utilizando como portador péptidos y anticuerpos contra moléculas blanco en los sitios tumorales (International Atomic Energy Agency, 2006).

Los radiofármacos pueden proporcionar información útil sobre el funcionamiento y la biología molecular del tumor mediante la medición de varios de los factores causales de la tumoración. En el futuro, las proyecciones específicas de los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  para la obtención de imágenes en oncología puede incluir, por ejemplo, el sistema linfático, en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y el seguimiento de la terapia génica.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo General**

Descubrimiento de un péptido anti-ErbB3 para imagenología molecular de tumores mamarios.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1.** Selección de distintos fagos anti-ErbB3 por la técnica de *phage display* para utilizarlos como vectores específicos para el desarrollo de radiofármacos.
- 2.2.2.** Selección de péptidos de cápside de los fagos anteriormente identificados para utilizarlos como vectores específicos para el desarrollo de radiofármacos.
- 2.2.3.** Desarrollo de tres sistemas de marcación a través de sistemas bifuncionales como lo son DOTA y HYNIC para los fagos y los péptidos.
- 2.2.4.** Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los radiofármacos obtenidos en el objetivo específico 2.2.3.

- 2.2.5.** Desarrollo de un sistema de marcación de los fagos con fluoróforos para la adquisición de imágenes ópticas *in vivo*.
- 2.2.6.** Determinación de las propiedades biológicas de los radiofármacos obtenidos en los objetivos específicos 2.2.3. y 2.2.5 utilizando como modelo tumoral cáncer de mama inducido por células MDA-MB 435 en ratones SCID.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Biotinización de la proteína ErbB3**

Se resuspendió 1 kit de NHS-biotina (Thermo) con 170  $\mu\text{L}$  de agua deionizada filtrada, luego se hizo una dilución 1/100 (2  $\mu\text{L}$  de (NHS-Biotina+ $\text{H}_2\text{O}$ ) + 98  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ). Separadamente se preparó 50  $\mu\text{L}$  de una solución de ErbB3 –ECD (Leinco) (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Se incubaron 48  $\mu\text{L}$  de esta solución con 5.2  $\mu\text{L}$  de solución 1/100 de NHS-biotina y se mantuvo en hielo por 2 h. Posteriormente se dializó la reacción en 1 L de PBS, pH = 7.5 a 4°C por 16 h.

#### **3.2. Selección de fagos**

Se mezcló la proteína biotinada (1  $\mu\text{L}$ ) con 39  $\mu\text{L}$  de TTDBA, éste última para prevenir la unión no específica. Se incubó en dos pocillos cubiertos con streptoavidina (Thermo) 20  $\mu\text{L}$  de esta solución y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de TTDBA de manera de cubrir el volumen del pocillo. Se cubrieron los pocillos con aluminio y se colocaron a 4°C durante toda la noche. Por otro lado se inoculó 10 mL de medio LB conteniendo 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamicina, con las bacterias *E. coli* (cepa K91 BluKan) y se mantuvieron en un agitador orbital a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se lavaron los pocillos 5 veces con TBS/Tween, se adicionaron los pocillos con 400  $\mu\text{L}$  de TTDBA, se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de una solución 10 mM de biotina y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 10  $\mu\text{L}$  por pocillo de la biblioteca 15 mer de fagos ( $1.71 \times 10^{14}$  viriones por mL) y se incubó a 4°C por 4 h.

Al mismo tiempo que se inició la selección de los fagos por la proteína ErbB3, se inició un cultivo de 4 h de *E. coli* sembrando 100  $\mu\text{L}$  del cultivo iniciado la noche anterior en 6 mL de medio LB con 6  $\mu\text{L}$  de kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se pusieron a crecer a 37°C. Transcurridas 3 h se realizó una medida de la DO a 600 nm de una dilución 1/10 en medio LB del cultivo de *E. coli* para determinar que estén en fase de crecimiento exponencial. Pasadas 4 h se aspiró el

contenido de los pocillos, se lavó 10 veces con TBS/tween, se agregan 400  $\mu\text{L}$  por pocillo del buffer de elución y se esperó 2 minutos, posteriormente se transfirieron los 800  $\mu\text{L}$  a un eppendorf y se neutralizó la solución con 100  $\mu\text{L}$  de una solución 1M de buffer Tris  $\text{pH}=9.1$ . En duplicado se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la elución de los fagos a 300  $\mu\text{L}$  de *E. coli* en fase de crecimiento y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Pasado este tiempo se transfirieron las células infectadas a un erlenmeyer de 250 mL conteniendo 40 mL de medio LB con 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetraciclina, se colocaron en agitador orbital a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Se removieron dos alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del cultivo y se realizaron diluciones seriadas de la muestra (en LB), se plaquearon las diluciones en placas de LB conteniendo 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina de modo de poder determinar el número de unidades formadoras de colonias de la selección. En simultáneo se agregó 40  $\mu\text{L}$  de la solución de tetraciclina (20  $\text{mg}/\text{mL}$ ) y 20  $\mu\text{L}$  de kanamicina en los 40 mL de cultivo, se incubó 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se pasó el cultivo a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se repitió la operación centrifugando a 8000 rpm. Se agregó al sobrenadante 5 mL de la solución PEG/NaCl y se mezcló. Se dejó precipitar los fagos manteniendo a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Se colectó el precipitado centrifugando a 12000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se disolvió el pellet en 1 mL de TBS y se transfirió la solución a un tubo eppendorf, se centrifugó un minuto a máxima velocidad de manera de limpiar la solución del material insoluble. Se transfirió el sobrenadante a un segundo tubo eppendorf y se le agregó 150  $\mu\text{L}$  de PEG/NaCl, se mezcló y se refrigeró 1 h. Pasado este tiempo se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. Se disolvió el pellet en 400  $\mu\text{L}$  de TBS, se centrifugó 1 min a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf. Este sobrenadante fue utilizado como *in put* de la siguiente ronda de selección.

### **3.3.Medida de DO de fagos**

Se realizó una dilución (1/50) con 10  $\mu\text{L}$  de los fagos seleccionados en 500  $\mu\text{L}$  de PBS,  $\text{pH}=7.5$ . Se agitó con vortex y se realizó un espectro de barrido midiendo la absorbancia de 200  $\mu\text{L}$  desde los 240 nm a los 320 nm. Se realizó la medida puntual de la absorbancia a 269 y 320 nm. Se calculó el número de los viriones/ mL de acuerdo a la siguiente fórmula:

**Viriones/mL= [(Abs<sub>269</sub>-Abs<sub>320</sub>) x (Factor de dilución) x 6x10<sup>16</sup>]/ Número de bases nucleotídicas por virion**

### **3.4. Titulación de los fagos**

Se transfirió una alícuota de K19 Blu Kan *E. coli* (100 µL) a 5 mL de medio NZY, manteniéndose el cultivo a 37°C con agitación vigorosa durante toda la noche. 100 µL del cultivo se usaron para inocular 5 mL de medio NZY, conteniendo 50 µg/mL de Kanamicina, y se incubó 3 h a 37°C. Pasadas 2 h del período de incubación, se colocó en una placa de 96 pocillos 20 µL de TBS gelatina en dos de las filas, cubriendo 24 pocillos; a su vez se agregó TBS gelatina a dos pocillos en el otro extremo de la placa para realizar los controles negativos. Se comenzó con las diluciones seriadas con 22 µL de la biblioteca de fagos, se transfirió 2 µL del stock de la biblioteca del primer pocillo al segundo y se mezcló bien. Se transfirió utilizando un nuevo tip 2 µL de la primera dilución al siguiente pocillo, este proceso se repitió por 12 veces.

Para monitorear el crecimiento del cultivo iniciado, se midió la turbidez mediante la lectura de DO a 600 nm de una dilución 1/10 del cultivo, utilizando medio NZY como disolvente y como blanco. Cuando la lectura de absorbancia se encontró entre 0.15 y 0.20, se consideró que el cultivo estaba listo para ser utilizado. Posteriormente, se agregó 20 µL del cultivo de *E. coli* a cada uno de los pocillos conteniendo las muestras de fago y a uno de los pocillos de control negativo, la placa se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Pasado este tiempo se agregó 200 µL de medio NZY, conteniendo 0.22 µg/mL, así como también al segundo pocillo de control negativo. La placa se incubó por 40 min a 37°C.

Se plaquearon gotas de 20 µL por duplicado de cada una de las diluciones en una placa cuadrada con patrón de grilla, conteniendo NZY agar con 100 µg/mL de kanamicina y 40 µg/mL de tetraciclina, así como también los controles negativos. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 37°C de forma invertida por toda la noche. Al día siguiente se contó el número de colonias en 20 µL y se calculó el número de unidades infectivas de acuerdo a la siguiente fórmula:

**[(X colonias/0.02 mL<sub>plaqueados</sub>)]x 0.24 mL<sub>volumen total</sub>) /0.002 mL<sub>fagos</sub>]]x factor de dilución= Unidades infectivas por mL (IU/mL)**

El proceso de titulación se efectuó cada vez que se realizó una ronda de selección de manera de determinar el rendimiento de cada ronda.

### **3.5.Extracción de ADN**

Se toma una colonia aislada de las placas y se inicia un cultivo en medio NZY por 12 h conteniendo 0.2 µg/mL de tetraciclina. Este proceso se realizó 50 veces de manera de obtener un muestreo representativo. El medio fue centrifugado a 12000 rpm durante 15 min a 4°C hasta la formación del pellet, el sobrenadante fue descartado. Posteriormente al pellet se le agregó 100 µL del buffer de lisis 7X (Zymo research group) y se mezcló invirtiendo el tubo eppendorf varias veces hasta que la coloración cambia a azul indicando la lisis completa. Al cabo de 2 min se agregó 350 µL de buffer de neutralización (Zymo research group) hasta que la muestra toma un color amarillo y se incubó por un par de minutos, posteriormente se centrifugó a 4000 g por 2 min. Se transfirió el sobrenadante, evitando romper el *pellet*, a una columna de extracción (Zymo research group) y se colocó la columna en un tubo eppendorf, de modo de poder colectar lo que se lave y se centrifugó por 15 segundos. Se descartó la elución y se volvió a colocar la columna en el eppendorf, se agregaron 200 µL del buffer *endo wash* (Zymo research group) y se centrifugó por 30 seg, posteriormente se agregó 400 µL del *wash buffer* (Zymo research group) y se centrifugó por 1 min. Luego se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf y se agregó sobre el centro de la matriz de la columna 30 µL del buffer de elución y se mantuvo a temperatura ambiente por 1 min, finalmente se centrifugó por 30 seg y se eluyó el ADN. La medida de la concentración final obtenida se realizó a través de una muestra de ADN de 1 µL midiendo su absorbancia a 260 nm en un equipo nanodrop (Thermo). Para su secuenciación se preparó la muestra de manera de obtener una concentración de ADN de 1000 ng en un volumen final de 16 µL, con el agregado del primero a una concentración de 20 pmol. Se realizó la secuenciación en un analizador de ADN 3730xl 96-capillary con Applied Biosystems Big Dye Terminator cycle sequencing chemistry.

### **3.6. Biotinilización de los fagos**

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se transfirieron 1 mL de la solución conteniendo el fago y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1M),  $\text{pH} = 7$  ajustado con  $\text{NaOH}$ .
2. Se preparó una solución 17 mM de NHS- $\text{PEO}_4$  -biotina en DMSO disolviendo 1 mg en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Inmediatamente se agregó el volumen necesario de los fagos para obtener un exceso molar de 1000 de biotina con respecto a los fagos. Se agitó 2 horas a temperatura ambiente.
3. Se centrifugó en microcentrífuga de manera de que la solución decante en el tubo, posteriormente se agregó 400  $\mu\text{L}$  de etanolamina (1 M),  $\text{pH} = 9$  ajustado con  $\text{HCl}$ , luego se agitó 1 h a temperatura ambiente para detener la reacción.
4. Nuevamente se centrifugó en microcentrífuga para que la solución decante en el fondo del tubo eppendorf, con una jeringa de 3 mL se cargó la solución dentro del cassette de diálisis (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific). Se lavó el tubo eppendorf con 1.5 mL de TBS y se agregó el volumen al casset. Se dializó dos veces por 1 h en 3500 mL de TBS, luego una tercer vez en el mismo volumen por 10 h. Al cabo de las 10 h se removió el contenido del cassette y se colocó en un tubo eppendorf.
5. Se realizó una dilución (1/50) de 10  $\mu\text{L}$  de fago en 500  $\mu\text{L}$  de TBS. Se agitó con vortex y se realizó un espectro de barrido midiendo la absorbancia de 200  $\mu\text{L}$  desde los 240 nm a los 320 nm. Se efectuó la medida puntual de la absorbancia a 269 y 320 nm.

### **3.7. ELISA #1**

Se preparó una solución de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ErbB3-ECD (Leinco), en buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 mM  $\text{pH} = 9.5$ , a partir de una solución 0.34 mM. Se incubó la mitad de una placa de ELISA de 96 pocillos (Immulon 2HB) con 100  $\mu\text{L}$  de la solución de ErbB3 por pocillo y la otra mitad con 100  $\mu\text{L}$  de buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 mM  $\text{pH} = 9.5$  por 24 h a 4  $^\circ\text{C}$ , la mitad de la placa sólo con buffer se usó para determinar la unión no específica de los fagos para cada concentración. Luego de 24 h se lavaron todos los pocillos 5 veces con 200  $\mu\text{L}$  de TBS+0.1% Tween. Se bloquearon los pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de TBS al 5% de BSA a temperatura ambiente por 2 h. Pasado este tiempo se aspiró el líquido de los pocillos. Se realizaron diluciones seriadas, en buffer ACINI, de los 4

fagos seleccionados biotinilados, con concentraciones de  $10^{12}$ ,  $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  viriones por mL (V/mL). Como control positivo se utilizó un anticuerpo comercial anti-ErbB3 (Calbiochem) con una dilución 1:500 de un stock 1 mg/mL. Se sembraron 100  $\mu$ L de cada concentración por duplicado, tanto en la mitad de la placa que contenía ErbB3 como en la que contenía sólo buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Posteriormente, se lavó toda la placa 2 veces con 200  $\mu$ L de TTBS. Se incubó por 30 min con 100  $\mu$ L de una solución de 10  $\mu$ L estreptoavidina derivatizada con HRP (SA-HRP) 1 mg/mL en 10 mL de TBS, en aquellos pocillos que contenían las diluciones de fago y 4 pocillos más, a modo de controles negativos, dos en la región de la placa cubierta con ErbB3 y dos con sólo buffer  $\text{NaHCO}_3$ . Los controles positivo se incubaron por 30 min con 100  $\mu$ L de una solución de 1  $\mu$ L de un anticuerpo anti-Fc murino derivatizado con HRP (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031, Santa Cruz) 0.4  $\mu$ g/mL en 1 mL de TBS. Finalmente se reveló con 100  $\mu$ L por pocillo de Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (SIGMA), se leyó en lector de placas (BioTek 100 Tigan St Winooski, VTUSA 05404) a una longitud de onda de 405 nm.

### **3.8.ELISA #2**

Se realizó una solución de 4  $\mu$ g/mL de ErbB3 –ECD (Leinco) en buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 mM pH= 9.5. Se incubó la mitad de una placa de ELISA (96 pocillos) (Immulon 2HB) con 100  $\mu$ L de la solución de ErbB3 por pocillo y la otra mitad con 100  $\mu$ L de buffer por 24 h a 4 °C. Posteriormente, se lavaron 5 veces los pocillos con 200  $\mu$ L de TTBS 5. Se bloquearon los pocillos con 200  $\mu$ L de TBS al 5% de BSA a temperatura ambiente por 2 h y se aspiró el líquido de los pocillos. Se realizaron diluciones seriadas en buffer ACINI de los fagos 3 y 4 (MSPC-3, MSPC-4) y un fago *wild type* (WT), con concentraciones de  $10^{12}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{10}$ ,  $10^9$  y  $10^8$  viriones por mL (V/mL) de los fagos biotinilados. Como control positivo se utilizó un anticuerpo comercial anti-ErbB3 (Calbiochem) con una dilución 1:500 de un stock 1 mg/mL. Se siembran 100  $\mu$ L de cada concentración por duplicado, tanto en la mitad de la placa que contenía ErbB3 como en la que contiene sólo buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Posteriormente, se lavó toda la placa con 200  $\mu$ L de TTBS 2 veces. Se incubó por 30 minutos con 100  $\mu$ L de una solución de 1/1000 estreptavidina derivatizada con HRP (SA-HRP) 1mg/mL, en los pocillos que contenían las diluciones de fago. Los controles positivo se incubaron por 30 min con 100  $\mu$ L de una solución de 1  $\mu$ L de un anticuerpo anti-Fc murino derivatizado con HRP (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-

2031, Santa Cruz) 0.4 µg/mL en 1 mL de TBS. Se reveló de igual manera que para el primer ELISA #1.

### **3.9.ELISA #3**

Se realizó una solución de 5 µg/mL de ErbB3 –ECD (SINO) en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH= 9.5 0.1 mM, una solución de ErbB2, BSA y Galectina 3 (Gal 3) con igual concentración (5 µg/mL). Se incubaron 9 pocillos de una placa de ELISA (Immulon 2HB) con 100 µL de la solución de ErbB3 por pocillo. Se realizó el mismo procedimiento para ErbB2, Gal 3 y BSA y se incubó por 24 h a 4°C. Luego de 24 h se lavó con 200 µL de TTBS 5 veces todos los pocillos. Se bloquearon los pocillos con 200 µL de TBS al 5% de BSA a temperatura ambiente por 2 h. Pasado este tiempo se aspiró el líquido de los pocillos. Se realizó una dilución en buffer ACINI de los fagos 3 y 4 (MSPC-3, MSPC-4) y un fago WT, con concentraciones de 10<sup>11</sup> viriones por mL (V/mL). Se sembraron 100 µL en 12 pocillos conteniendo las 4 proteínas en triplicado. Posteriormente se lavó 2 veces toda la placa con 200 µL de TTBS. Se incubó por 30 minutos con 100 µL de una solución de 1/1000 estreptoavidina derivatizada con HRP (0.1 mg/mL) en los pocillos que contenían las diluciones de fago. Se reveló de igual manera que para el primer ELISA.

### **3.10. Estudio de unión a células de los fagos anti-ErbB3 biotinilados**

Las células MDA-MB-435, MDA-MB-543, MDA-MB361, PC3, A431 y SKBR-3, fueron fijadas con un 4% de formaldehído en portaobjetos. Luego de la rehidratación con TBS, las células fueron bloqueadas con BSA al 6% (m/V). Los fagos anti-ErbB3 fueron diluidos en TBS al 0.1% en una concentración 1x10<sup>11</sup> (V/mL). Luego del bloqueo, 100 µL de las soluciones de fagos fueron agregados e incubados por 1 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las células fueron lavadas 3 veces con TBS. Posteriormente fueron agregados 100 µL del anticuerpo α-Biotin-Alexaflour 488 diluido 1:1000 en TBST al 0.1% e incubados por 1 h a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial anti-ErbB3 (Calbiochem). En las placas de control positivo se reveló con el anticuerpo anti Fc-murino derivatizado con HRP (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031, Santa Cruz).

Como control negativo se ensayó las líneas celulares solamente con anticuerpo  $\alpha$ -Biotin-Alexaflour 488 en ausencia de fagos. Como control negativo del anticuerpo anti-ERbB3 se trabajó con el anticuerpo anti-Fc murino derivatizado con HRP.

Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces con TBST al 0.1% y analizadas con el microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon T1-SM).

### 3.11. Marcado de los fagos con Dylight 680

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se pipeteó:

	Volumen Fagos ( $\mu$ L)	PBS <sup>a</sup> ( $\mu$ L)	Buffer de reacción 3x <sup>b</sup> ( $\mu$ L)
WT	153.8	179.2	167
MSPC-3	225.3	107.8	167
MSPC-4	465.5	0	44.6

<sup>a</sup> PBS (buffer fosfato 5 mM, pH= 7.0), <sup>b</sup>Buffer de reacción 3x (1.5M citrato de sodio, 0.3 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8.5),

La concentración de la proteína pVIII para los fagos WT (sin péptido en su cápside), MSPC-3, MSPC-4 fue: 1.30 mM, 887.54  $\mu$ M y 429.52  $\mu$ M respectivamente. Se completa con PBS de manera de obtener para los tres casos una concentración final de 429.52  $\mu$ M. Se realizó una dilución de 1 mg de Dylight 680 (950 g/mol, Thermo) en 23.8  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO) de modo de obtener una solución 25 mM. De esta solución stock se agregan 8  $\mu$ L en cada uno de los tubos conteniendo los fagos, PBS y el buffer de reacción, se agita en vortex y se incuba por 4 h a temperatura ambiente fuera de la luz, obteniendo una dilución con una concentración final de 392  $\mu$ M. Pasadas las 4 horas en cada tubo eppendorf se tomó 50  $\mu$ L de etanoalmina 3M pH= 9, se agitó en vortex, se centrifugó a bajas revoluciones y se dejó 1.5 h a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se cargan los fagos en un cassette de 3 mL con un *cutoff* de 10 KDa (Slide-A-Lyzer) utilizando una jeringa de 5 mL con aguja de 18Ga; se dializa tres veces en 900 mL de TBS. Luego de este proceso se remueve la solución de fagos marcados con Dylight 680 y se colocan en un vial. Utilizando el mismo TBS como blanco, se escanean las soluciones desde

320 a 240 nm, y luego de 600 a 800 nm. Para determinar el porcentaje de proteína VIII marcada con el fluoróforo se utilizó la siguiente ecuación:

**Concentración de Dylight 680= [(Abs<sub>680</sub>- Abs<sub>800</sub>) x Factor de dilución x Longitud del Camino óptico] / Coeficiente de extinción**

### **3.12 Modelo Animal**

Para generar los tumores de mama con sobreexpresión de ErbB3 para todos los experimentos, fueron inoculados en el hombro ratones hembras ICR SCID (Taconic) con  $10 \times 10^6$  células MDA-MB435. Pasados 40 días los animales pasaron a alimentarse con una dieta libre de biotina. Todos los protocolos experimentales que involucran animales fueron previamente aprobados por el Comité Nacional de Experimentación Animal (CHEA, Uruguay).

### **3.13 Biodistribución de los fagos marcados Dylight 680**

Al cabo de 42 días el pelo del área del tumor fue removido. A las 24 h los animales, n=6, (peso= 20.85 g) fueron inoculados I.V. (n=2) con 100  $\mu$ L de los fagos WT derivatizados con Dylight 680. Se inyectaron 200  $\mu$ L de MSPC-3 (n=2) y MSPC-4 (n=2) derivatizados con Dylight 680, en ratones con tumor de mama pesando 22.95 g y 24.40 g respectivamente.

Imágenes IVIS fueron tomadas a 2 y 4 h post-inyección, así como también imágenes pre-inyección para conocer la fluorescencia intrínseca de los tejidos con los animales bajo anestesia por vía inhalatoria. Inmediatamente luego de la obtención de la imagen a 4 h, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los órganos y tejidos de interés fueron disecados, pesados y colocados en una superficie negra para la adquisición de imagen IVIS (Equipo de alta sensibilidad para la adquisición de imágenes 2D *in vivo* no invasiva que permite la visualización y el seguimiento de la actividad celular y genética dentro de un organismo vivo, a tiempo real.)

### **3.14. Síntesis peptídica**

Los péptidos expresados en los clones MSPC-3 y MSPC-4 fueron sintetizados químicamente en la Universidad de Missouri, denominándolos MSP3 y MSP4. La síntesis

peptídica se realizó en fase sólida, en un sintetizador automático (Advanced Chem Tech 396) utilizando fluorenilmetiloxycarbonil (FMOC) como grupo protector.

Cada uno de los péptidos se unió covalentemente con biotina en su amino terminal, seguido del tripéptido espaciador glicina-alanina-cisteína (GAC).

Los péptidos también fueron conjugadas a ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) (Macroyclic, Inc. Dallas, TX), y a ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC) seguido del espaciador GAC .

### **3.15.ELISA #4**

Se preparó una solución de 5 µg/mL de ErbB3-ECD (Sino Biological Inc.), ErbB3-ECD (Leinco) (alícuota congelada por dos años) y de ErbB2-ECD (Leinco) en buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mM pH=9.5, a partir de una solución 0.34 mM. Se incubó dos filas de una placa de ELISA de 96 pocillos (Immulon 2HB) con 100 µL de la solución por pocillo de ErbB3 (Leinco), dos filas con la solución de ErbB3 (Sino Biological Inc) y dos filas con ErbB2-ECD; la otra mitad de la placa con 100 µL de buffer para determinar la unión no específica de los péptidos para cada concentración. Luego de 24 h se lavaron todos los pocillos 5 veces con 200 µL de TBS. Se bloquearon los pocillos con 200 µL de TBS al 5% de BSA a temperatura ambiente por 2 h. Pasado este tiempo se aspiró el líquido de los pocillos. Se realizaron diluciones, en buffer ACINI, de los péptidos biotinilados MSP3 y MSP4, con concentraciones de 10 µM. Como control positivo se utilizó un péptido biotinilado anti-ErbB2 KCCYSL (Kumar, et al.; 2007) con una dilución 10 µM. Se sembraron 100 µL de cada concentración por duplicado, tanto en la mitad de la placa que contenía los receptores ErbB\* como en la que contenía sólo buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Posteriormente, se lavó toda la placa 2 veces con 200 µL de TTBS. Se incubó por 30 min con 100 µL de una solución de 10 µL estreptoavidina derivatizada con HRP (SA-HRP) 1 mg/mL en 10 mL de TBS, en aquellos pocillos que contenían las diluciones de péptidos y 4 pocillos más, a modo de controles negativos, dos en la región de la placa cubierta con ErbB3 y dos con sólo buffer NaHCO<sub>3</sub>. Finalmente se reveló con 100 µL por pocillo de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (SIGMA), se leyó en lector de placas (BioTek 100 Tigan St Winooski, VTUSA 05404) a una longitud de onda de 405 nm.

### 3.16.FAC scan

Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares: MDA-MB 435, MDA-MB-453, PC3, A431, MDA-MB-361 y SKBR3. Se removieron las células, con PBS conteniendo EDTA (2 mM), de los frascos de cultivo T 75 cuando éstas tenían un nivel de confluencia del 80% (cada línea se encontraba por duplicado). Se centrifugó a 4500 rpm y se resuspendió el *pellet* en 5 mL de buffer HEPES 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Se tomaron alícuotas de 250 µL de los cultivos de las distintas líneas celulares por duplicado. Posteriormente, se agregaron a los correspondientes tubos eppendorf 250 µL de los péptidos biotinados MSP-3, MSP-4 a 50, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.0, 0.5, y 0.25 µM, se mezclaron y se incubaron a 37°C por 30 min. Se centrifugaron a 4500 rpm por 2 min y se resuspendió el *pellet* en 500 µL de PBS. Como controles negativos se utilizaron las líneas celulares sin el agregado de los péptidos, y las líneas celulares con estreptoavidina conjugada a Oregon green (SA-488) (Invitrogen Life Technologies). Se centrifugaron lentamente y se resuspendió en 250 µL de una dilución de 10 µL de una solución de SA-488 (1 mg/mL) en 10 mL de PBS, y se incubaron a 37°C por 30 min en la oscuridad. Pasado este tiempo se centrifugó a 4500 rpm por 2 min y se resuspendió en 500 µL de PBS, este paso se repitió dos veces. Se centrifugó a 4500 rpm y se fijaron las células en 250 µL de paraformaldehído al 4%. Finalmente se transfirieron las suspensiones de cada tubo eppendorf a tubos apropiados para FAC scan protegidos de la luz. Se trabajó con el software CellQuest, se conectó al clitómetro, se fijó el Acquisition Gate de manera que aceptase todos los eventos y que la resolución fuera 1024. Se fijó de manera que: P1=FSC( Foward scatter), P=2 SSC (Side scatter), P3= FL1 (Alexa 488).

### 3.17. Obtención del complejo <sup>99m</sup>Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4

Se realizó la marcación de 20 y 40 µg del péptido HYNIC-GAC-MSP4 con <sup>99m</sup>TcO<sup>4-</sup>, 15 µL de una solución de SnCl<sub>2</sub> (1 mg/mL) y 150 µL de una solución de tricina (100 mg/mL), con distintas actividades específicas y en aumento.

El análisis de la pureza radioquímica se realizó por HPLC empleando una columna C18 (Restek) y con un gradiente de 0 a 100% de B en 20 min, y de 100 a 0% de A en 20 min, siendo (A) H<sub>2</sub>O, Acetonitrilo (ACN) (B) ambas soluciones con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %. Se evaluó el

pH de marcado por medio de tiras de pH (Merck) rango 0-14, sembrando una gota del marcado previo a la inyección en el HPLC dado que en éste una vez purificado se obtiene con trazas de TFA.

Para todos los estudios fisicoquímicos el complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC -GAC-MSP4 se purificó por HPLC. Después de separado por HPLC se eliminó el disolvente con corriente de gas nitrógeno y se reconstituyó en 600  $\mu\text{L}$  PBS 0.1 M pH 7.4 y con 600  $\mu\text{L}$  PBS + tricina (100 mg/mL). El péptido reconstituido se controló por HPLC con el mismo sistema descrito.

### **3.18. Controles fisicoquímicos de $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4**

#### **3.18.1. Estudios de estabilidad en solución**

La estabilidad del péptido marcado, se estudió por HPLC a diferentes tiempos, frente a un gran exceso de una molécula con excelente afinidad por el  $^{99m}\text{Tc}$ , como es L-cisteína (10 mM). A cada fracción de 250  $\mu\text{L}$  de péptido marcado se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de cisteína de modo que la molaridad final alcanzada fue 10 mM. Se realizó la transquelación a 37°C, a 1, 2 y 3 h, en las dos condiciones de reconstitución del marcado, siendo éstas en PBS y en un medio PBS conteniendo tricina (100 mg/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado y se controlaron por HPLC empleando la misma columna y gradiente descritos anteriormente.

#### **3.18.2. Estudio de estabilidad en suero fetal bovino**

Para la realización de este ensayo, se purificó el péptido marcado por el proceso ya descrito. Posteriormente, se incubó una alícuota de 50  $\mu\text{Ci}$  en 500  $\mu\text{L}$  de suero fetal bovino (SFB) a 37°C, durante 1, 2 y 4 h. Las proteínas se precipitaron con 500  $\mu\text{L}$  de ACN y se centrifugaron (1750 g, 5 min, 4°C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en contador de pozo de NaI (ORTEC). Finalmente el sobrenadante fue analizado por HPLC para evaluar la estabilidad de los complejos de  $^{99m}\text{Tc}$ , el cual se controló por HPLC empleando la misma columna y gradiente descritos anteriormente.

### 3.18.3. Estudio de lipofilia (logP)

Para evaluar la hidrofiliidad del complejo, se determinó el coeficiente de reparto octanol/agua, (logP). Para ello se purificaron por HPLC el conjugado de HYNIC-GAC-MSP4 marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando tricina como co-ligando. El disolvente fue eliminado y el conjugado marcado (30  $\mu\text{Ci}$ ) fue reconstituido en PBS (pH 7.4, 0.1 M, 2 mL). Tubos conteniendo 500  $\mu\text{L}$  de octanol y 500  $\mu\text{L}$  del conjugado marcado disuelto en PBS, fueron vigorosamente agitados, centrifugados a 13000 rpm durante 10 min. Seis fracciones de 100  $\mu\text{L}$  fueron colectadas de ambas fases, para la medición de sus respectivas cuentas en un contador de pozo de NaI. El coeficiente de reparto se calculó como el log (cuentas en octanol/cuentas en fase acuosa). Se confirmó la presencia del péptido marcado mediante el empleo de HPLC en columna C18 en el mismo sistema de disolventes y gradiente empleados para la realización de controles fisicoquímicos.

### 3.19. Estudios de metabolización *in vitro* de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-GAC-MSP4

Se realizó el estudio de metabolización del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC--GAC-MSP4, exponiendo a éste a la digestión con la fracción microsomal como a la fracción citosólica de hepatocitos de hígado de ratas (Boiani et al., 2009).

En el procedimiento para la metabolización microsomal, se colocó en un eppendorf:  $\text{MgCl}_2$  (130mM) 10 $\mu\text{L}$ , NADP+ (40mM) 10 $\mu\text{L}$ , glucosa- 6-fosfato (350mM) 10 $\mu\text{L}$ , glucosa 6-fosfato deshidrogenada (50 u/mL) 10 $\mu\text{L}$ , buffer fosfato 0.1 M, 1.5 mM EDTA pH=7.4 610  $\mu\text{L}$ , fracción microsomal 242  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  de  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4. La reacción fue incubada por 10, 30 y 60 min a 37°C. Al cabo de estos tiempos se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de MeOH de modo de detener la reacción. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad (10000 rpm) por 5 min, donde fue tomado el sobrenadante (50  $\mu\text{L}$ ) y éste controlado por HPLC en columna C18 (Restek) para evaluar la pureza radioquímica, con un gradiente de 0 a 100% de B en 20 minutos de: (A)H<sub>2</sub>O:Acetonitrilo(B) ambas soluciones con TFA al 10%.

Para la reacción citosólica se realizó el mismo procedimiento sólo que fueron colocados 113  $\mu\text{L}$  de la mencionada fracción y 740  $\mu\text{L}$  del buffer fosfato 0.1M ,1.5mM EDTA, para mantener el mismo volumen que la reacción microsomal y por tanto obtener resultados comparativos.

Como control negativo se colocaron para la digestión:  $\text{MgCl}_2$  (130mM) 10 $\mu\text{L}$  NADP<sup>+</sup> (40mM) 10 $\mu\text{L}$ , glucosa-6-fosfato (350mM) 10 $\mu\text{L}$ , glucosa-6-fosfato deshidrogenada (50 u/mL) 10  $\mu\text{L}$ , buffer fosfato 0.1 M, 1.5 mM EDTA pH= 7.4 840  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-GAC-MSP4, de modo de tener todos los cofactores y el complejo de estudio. La mezcla una vez incubada a 37°C por 60 min, fue centrifugada a 10000 rpm por 5 min y el sobrenadante (50  $\mu\text{L}$ ) se controló por HPLC en el sistema descrito anteriormente. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

### **3.20. Estudios de unión a células de <sup>99m</sup>Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4**

Los estudios de unión e internalización se realizaron en células MDA -MB-435(ErbB3 +++) y PC3 (ErbB3 -). Un millón de células en medio RPMI fueron incubadas en una placa de 24 pocillos durante toda la noche de manera de permitir su adherencia.

Luego de lavarlas con medio de cultivo, las células fueron incubadas a 25 °C por 10, 20, 30, 40, 60 y 90 min con 300000 cpm del péptido <sup>99m</sup>Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4 en 300  $\mu\text{L}$  de RPMI. Posteriormente, fueron lavadas con PBS 0.01M al 0.2 % de BSA pH 7.4. La unión del péptido radioactivo fue determinado cuantificando tanto el péptido unido en la membrana como internalizado. Para ello las células se lavaron con una solución buffer ácida (40 mM acetato de sodio, pH= 4.5) de manera de remover el <sup>99m</sup>Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4 unido a la membrana. La actividad remanente en las células se recuperó por lisis con NaOH 1N por 10 min. La cuantificación del péptido marcado tanto unido a membrana como internalizado fue determinado en un contador gamma de NaI (ORTEC).

Par determinar la especificidad del péptido marcado, se realizó un estudio de bloqueo con 10  $\mu\text{g}$  del mismo péptido sin marcar (frío). Éste se incubó con las células MDA-MB-435 por un período de 2 h a 25 °C previo a la incubación con el radiopéptido. Posteriormente, el péptido se removió y las células MDA-MB-435 se incubaron con 300  $\mu\text{L}$  de <sup>99m</sup>Tc-tricina/HYNIC-GAC-MSP4 en RPMI (300000 cpm) a 25 °C, por 10, 20, 40, 60 y 90 min. Luego de los respectivos tiempos de incubación, es cuantificada la actividad que permanece unida a la membrana y la actividad internalizada.

### 3.21. Estudios *in vivo* de $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4

La evaluación biológica *in vivo* del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 se llevó a cabo mediante la realización de estudios de biodistribución e imagenológicos. Estos estudios se realizaron en ratones Balb/c normales (n=4). Se inyectó una actividad entre 1-6 MBq, por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a varios tiempos post-inyección. Los órganos y tejidos de interés fueron disecados, pesados y su actividad medida en un contador de centelleo sólido. La actividad captada en los tejidos fue expresada como porcentaje de actividad por gramo de órgano/tejido (% Act/g) y como el porcentaje de actividad inyectada (% Act). El valor total de sangre se consideró como un 7% del total del peso corporal.

Posteriormente se realizaron estudios imagenológicos en ratones SCID portadores de tumor inducido por células MDA-MB-435 (n=2). A las 2 h post-inyección del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 Act = 1.2 mCi (44.4 MBq). El complejo se purificó por el sistema de HPLC descrito anteriormente, se purgó con una suave corriente de nitrógeno y se agregó PBS, pH= 7 para ser inyectado en los ratones a través de la vena de la cola. Se realizó la imagen de un ratón con bloqueo, comprendiéndose por ello la co-inyección de péptido frío junto al complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4, para obtener un exceso de 100 (w/w) del péptido frío sobre el marcado. Tras realizar las imágenes se practicó una biodistribución de los mencionados ratones portadores de tumor, donde los órganos y tejidos de interés fueron disecados, pesados y medidos en un contador gamma Wallac 1480 (Perkin Elmer, Wellesley, MA). La actividad captada fue expresada como porcentaje de actividad por gramo de órgano/tejido (% Act/g).

### 3.22. Obtención de $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4

Se resuspendió el péptido (MSP3 o MSP4) derivatizado con DOTA en agua (concentración 1 mg/mL). Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}$ ) y se colocan en 500  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de amonio 0.5 mM pH= 5.4. Se agregaron 120  $\mu\text{L}$  de  $^{111}\text{InCl}_3$ , Act = 600  $\mu\text{Ci}$  (22.2 MBq). Se incubó en baño de agua a 37, 50 y 80  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min.

Posteriormente al marcado se controla en HPLC (columna C18 ,  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% TFA:ACN 0.1% TFA), con gradiente 0-5 min (5% ACN), 5-7 min (20% ACN), 7-12 min (20% ACN), 12-37 min

(20- 45% ACN), 37-42 (45-95% ACN), 42-45 min (95%ACN), 45 -47 min (95-5% ACN), 47-55 min (5%ACN). Finalmente se colectó la actividad correspondiente al pico del marcado y se midió en calibrador de dosis CAPINTEC.

El marcado se controló hasta 24 h en solución de marcado, por medio del mismo sistema HPLC descrito anteriormente.

### **3.23.Estudio de propiedades fisicoquímicas de $^{111}\text{In}$ –DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ –DOTA-MSP4**

#### **3.23.1.Estudio de estabilidad en suero murino**

Primeramente se purificaron los péptidos marcados con  $^{111}\text{In}$  ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4) a 80 °C por el proceso ya descrito. Posteriormente, se incubó una alícuota de 100  $\mu\text{Ci}$  en 500  $\mu\text{L}$  de suero murino a 37 °C, durante 1, 2 y 3 h por duplicado. Las proteínas se precipitaron por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 4 °C). Se midió la actividad del precipitado y del sobrenadante en calibrador de dosis CAPINTEC. Finalmente, el sobrenadante fue analizado por HPLC para evaluar la estabilidad de los complejos de  $^{111}\text{In}$ , se controló con HPLC (columna C18,  $\text{H}_2\text{O}$  0.1% TFA:ACN 0.1% TFA), con gradiente 0-5 min (5% ACN), 5-7 min (20% ACN), 7-12 min (20% ACN), 12-37 min (20- 45% ACN), 37-42 (45-95% ACN), 42-45 min (95% ACN), 45 -47 min (95-5% ACN), 47-55 min (5% ACN).

#### **3.23.2.Estudio de lipofilia (logP)**

Para evaluar la hidrofobicidad de los complejos, se determinó el coeficiente de reparto octanol/agua (logP). Para ello se purificaron por HPLC los péptidos marcados  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4. Tubos conteniendo 200  $\mu\text{L}$  de octanol y 200  $\mu\text{L}$  del conjugado marcado por triplicado, fueron vigorosamente agitados, centrifugados a 10000 rpm durante 10 min. Dos fracciones de 50  $\mu\text{L}$  fueron colectadas de ambas fases, para la medición de sus respectivas cuentas en calibrador de dosis CAPINTEC. El coeficiente de reparto se calculó como el log (cuentas en octanol/cuentas en fase acuosa).

### 3.24. Estudios de unión a células de $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4

Los estudios de unión e internalización se realizaron en células MDA -MB-435(ErbB3 +++), MDA-MB-361(ErbB3+) y PC3 (ErbB3-). Un millón de células en medio RPMI fueron incubadas en una placa de 24 pocillos durante toda la noche de manera de permitir su adherencia. Luego de lavarlas con medio de cultivo, las células fueron incubadas a 25 °C por 10, 20, 30, 40, 60 y 90 min con 100000 cpm de los péptidos marcados en 300  $\mu\text{L}$  de medio RPMI. Posteriormente, fueron lavadas con PBS 0.01M al 0.2 % de BSA pH= 7.4. La unión del péptido radioactivo fue determinado cuantificando tanto el péptido unido en la membrana como internalizado. Para ello las células se lavaron con una solución buffer ácida (40 mM acetato de sodio, pH= 4.5) de manera de remover el  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP\* unido a la membrana. La actividad remanente en las células es recuperada por lisis con NaOH 1N por 10 min. La cuantificación de los péptidos marcados tanto unidos a membrana como internalizado fue determinado en un contador gamma Wallac 1480 (Perkin Elmer, Wellesley, MA).

### 3.25. Estudios *in vivo* de $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4

Se realizaron estudios de biodistribución en ratones SCID portadores de tumor inducido por células MDA-MB-435 (n=4), a 1 y 2 h post-inyección de los complejos purificados por HPLC (y purgado con corriente de nitrógeno para quitar el TFA)  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3, Act =  $144.38 \pm 20.80 \mu\text{Ci}$  (5.3MBq) y  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4, Act =  $123.08 \pm 11.05 \mu\text{Ci}$  (4.6 MBq). Del mismo modo se realizó la biodistribución en ratones portadores (n=4) de tumor con bloqueo, comprendiéndose por ello la co-inyección de péptido frío junto al complejo marcado, para obtener un exceso de 100 (w/w) del péptido frío sobre el marcado. Los órganos y tejidos de interés fueron disecados, pesados y medidos en un contador gamma Wallac 1480 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) La actividad captada fue expresada como porcentaje de actividad por gramo de órgano/tejido (% Act/g).

### 3.26. Obtención de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 y control de estabilidad

Se resuspendió el péptido (MSP3 o MSP4) derivatizado con DOTA en agua (concentración 1 mg/mL). Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}$ ) y se colocaron en 500  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de amonio 0.5

mM pH= 5.4. Se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de  $^{177}\text{LuCl}_3$  diluido en HCl 0.05M, Act = 75  $\mu\text{Ci}$ . Se incubaron en baño de agua a 37, 50 y 70  $^\circ\text{C}$  por 30 min.

Posteriormente al marcado se controla con HPLC (columna C18 ,  $\text{H}_2\text{O}$  0.1%TFA:ACN 0.1% TFA), con gradiente 0-5 min (5% ACN), 5-7 min (20% ACN), 7-12 min (20% ACN), 12-37 min (20- 45% ACN), 37-42 (45-95% ACN), 42-45 min (95% ACN), 45 -47 min (95-5% ACN), 47-55 min (5% ACN). Finalmente se colectó la actividad y se midió en calibrador de dosis CAPINTEC. El marcado se controló hasta 24 h en solución de marcado, por medio del mismo sistema HPLC descripto anteriormente.

### **3.27. Estudios de unión a células de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4**

Los estudios de unión e internalización se realizaron en células MDA -MB-435(ErbB3 +++), MDA -MB-361 (ErbB3 +), y PC3 (ErbB3-). Un millón de células en medio RPMI fueron incubadas en una placa de 24 pocillos durante toda la noche de manera de permitir su adherencia. Luego de lavarlas con medio de cultivo, las células fueron incubadas a 25  $^\circ\text{C}$  por 40 min con 1000, 10000 y 100000 cpm de los péptidos ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4) marcados a 50 y 70  $^\circ\text{C}$  en 300  $\mu\text{L}$  de medio RPMI. Paralelamente, las células fueron incubadas a 25  $^\circ\text{C}$  por 10, 30, 60, 90, 120 y 150 min con 100000 cpm de los péptidos (DOTA-MSP3 y DOTA-MSP4) marcados a 50 y 70  $^\circ\text{C}$  con  $^{177}\text{Lu}$ , purificados por HPLC y diluidos en 300  $\mu\text{L}$  de medio RPMI.

Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 0.01M al 0.2 % de BSA pH= 7.4. La unión del péptido radioactivo fue determinado cuantificando tanto el péptido unido en la membrana como internalizado. Para ello las células son lavadas con 300  $\mu\text{L}$  de una solución buffer ácida (40 mM acetato de sodio, pH= 4.5) de manera de remover el  $^{177}\text{Lu}$ -MSP\* unido a la membrana. La actividad remanente en las células es recuperada por lisis con 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N por 10 min. La cuantificación de los péptidos marcados tanto unidos a membrana como internalizado fueron determinado en un contador gamma Wallac 1480 (Perkin Elmer, Wellesley, MA)

### **3.28. Estudio de unión a los receptores ErbB2 y ErbB3**

Se preparó una solución de 1 µg/mL de ErbB3-ECD (Sino Biological Inc.), y de ErbB2-ECD (Leinco) en buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mM pH= 9.5, a partir de una solución 0.34 mM. Se incubaron 3 filas de una placa de ELISA de 96 pocillos (Immulon 2HB) con 100 µL de la solución por pocillo de ErbB3 y 3 filas con ErbB2-ECD; el resto de la placa con 100 µL de buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mM pH= 9.5 por 24 h a 4 °C, la mitad de la placa sólo con buffer se usó para determinar la unión no específica de los péptidos para cada concentración. Luego de 24 h se lavaron todos los pocillos 5 veces con 200 µL de TBS. Se bloquearon los pocillos con 200 µL de TBS al 5% de BSA a temperatura ambiente por 2 h. Pasado este tiempo se aspiró el líquido de los pocillos. Se realizaron diluciones seriadas, en buffer PBS pH= 7, de los péptidos marcados con <sup>177</sup>Lu y purificados por HPLC. Los péptidos fueron incubados por 1 h a temperatura ambiente. Pasado éste tiempo fueron lavados con PBS al 0.01% de tween y la elución de los mismo se realizó con 100 µL de NaOH (0.1 N) por 5 min. Posteriormente, la solución fue transferida a tubos y contados en un contador gamma Wallac 1480 (Perkin Elmer, Wellesley, MA).

### **3.29. Imágenes ópticas obtenidas con fagos derivatizados con biotina**

Primeramente se inocularon 3 ratones SCID portadores de tumor inducido con células MDA-MB-435, con 50 µL (1 mg/mL) de ultraavidina (Leinco), al cabo de 24 h a cada ratón se le inyectó 75, 100 y 150 µL de ATTO-680 biotina (Sigma Aldrich). Luego de 1 h imágenes IVIS fueron adquiridas en un equipo Xenogen IVIS 200 (Xenogen Corp., Alameda, CA), así como también imágenes pre-inyección para conocer la fluorescencia intrínseca de los tejidos con los animales bajo anestesia por vía inhalatoria.

En un segundo experimento, 2 ratones portadores de tumor de mama inducido por células MDA-MB-435 fueron inoculados con 100 µL de los fagos ( $1 \times 10^{12}$  V/mL) biotinilados MSPC3 y MSPC4. Al cabo de 4 h fueron inyectados con 50 µL (1mg/mL) de ultraavidina. Pasado este tiempo fueron inoculados con 100 µL de ATTO-680 biotina. Finalmente luego de 1 h fueron adquiridas imágenes IVIS con los animales bajo anestesia por vía inhalatoria, luego de ello los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y colectados los tejidos de interés, pesados

y medida su fluorescencia en el mismo equipo donde se realizaron las imágenes. Los resultados fueron expresados como unidades de fluorescencia total/g.

### 3.30. *Click chemistry in vitro*

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se transfirieron 1 mL de la solución conteniendo el fago MSPC-3 ( $1 \times 10^{13}$  V/mL) y MSPC-4 ( $1 \times 10^{13}$  V/mL). Se preparó una solución de TCO-carbonato Trans-Cicloocteno-NHS éster (NHS-TCO) (Kerafast) en DMSO disolviendo 1 mg en 100  $\mu$ L de DMSO. Inmediatamente se agregó el volumen necesario de los fagos para obtener un exceso molar de 1000 NHS-TCO con respecto a los fagos. Se agitó 2 h a temperatura ambiente. Se centrifugó en microcentrífuga para que la solución decante en el fondo del tubo eppendorf, con una jeringa de 3 mL se cargó la solución dentro del cassette de diálisis (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific). Se lavó el tubo eppendorf con 1.5 mL de TBS y se agregó el volumen al cassette. Se dializó dos veces por 1 h en 3500 mL de TBS, luego una tercera vez en el mismo volumen por 12 h. Al cabo de las 12 h se removió el contenido del cassette y se colocó en un tubo eppendorf. Se realizó una dilución (1/50) de 10  $\mu$ L de fago en 500  $\mu$ L de TBS. Se agitó con vortex y se realizó un espectro de barrido midiendo la absorbancia de 200  $\mu$ L desde los 240 nm a los 320 nm. Se efectuó la medida puntual de la absorbancia a 269 y 320 nm.

Luego de la diálisis se realizó una prueba de *dot blot*. Se sembraron 2  $\mu$ L de fago MSPC-3-TCO ( $1 \times 10^{13}$  V/mL) y MSPC-4-TCO ( $1 \times 10^{13}$  V/mL) por duplicado, como control negativo se utilizaron 2  $\mu$ L de los fagos ( $1 \times 10^{14}$  V/mL) sin TCO en duplicado. Se bloqueó el papel con 5% (w/vol) Dry Milk en PBS, se lavó el *blot* en PBS (buffer fosfato 5 mM, pH= 7.0), posteriormente se incubó el *blot* con 1  $\mu$ g/mL 3-(*p*-benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina-Cy5 (tetrazina-Cy5) (Jena Bioscience) por una hora y se lavó con TBS-Tween20. En paralelo se sembró una serie de tetrazina-Cy5 comenzando por una dilución de 1 mg /mL y realizando diluciones seriadas al 1/10 sucesivamente. Se adquirió la imagen con un equipo de fotón Technology International (Deltascan Ilumination system) conectado a un ordenador Dell equipados con Software de análisis de fluorescencia Felix. La medición se recolectó de 5 a 20 s. El obturador de excitación permaneció cerrado durante pre-equilibrado de la muestra y fue abierto sólo durante la adquisición de datos para reducir al mínimo el foto-blanqueo de la muestra.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Selección de fagos

La selección de los fagos se realizó empleando la técnica de *phage display* desarrollada por G. Smith en 1997. En ella se utiliza la propagación de vectores que interaccionen con los receptores blancos con los cuales se quiere interactuar.

En una primera etapa se preparó un stock suficiente de *E. coli* cepa BluKan K91 para la realización del proyecto. Estas bacterias son las utilizadas (Smith, Petrenko; 1997) para la propagación de vectores fd-tet para la realización de la técnica de *phage display*. Una vez finalizada la primera ronda, se procedió a la amplificación en *E. coli* de los fagos seleccionados, observándose un aumento en la turbidez del cultivo y cuantificado por espectrometría UV-vis a 600 nm, obteniendo una lectura de absorbancia de 0.186. El rendimiento de la selección se calculó mediante titulación analítica tanto del *in-put* como del *out-put* de las unidades transformadas (UT). La concentración de las partículas de fago se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula, (Smith, Petrenko; 1997),

$$\text{Concentración de partículas de fago} = 50x (\text{Abs}_{269})x 6x10^{16}/6408.$$

Se obtuvo un eluato con 3 órdenes menos de UT, se observó crecimiento de colonias características en las placas. Efectuado esto último se procedió a la realización de dos rondas de selección.

Posteriormente a la obtención de una buena concentración de fagos, se procedió a la extracción de ADN de los mismos pudiendo efectuar la secuenciación de los péptidos expresados en su cápside (figura 6).

	<b>Secuencia</b>	<b>Ronda 1</b>	<b>Ronda 2</b>
1	GGRFFGVGLPFDARW	4	3
2	DLCYRRPLPFPFRPL	1	2
3	CAWCLVISPARAADG	0	2
4	SVRDNAFLFSARSVG	1	1
5	IYNPLSLLKWELPPF	0	1
6	SHFWFPPSNDDSIVS	0	1
7	ERLLYFAFPFGAQH	3	0
8	FSVSFPSLPAPPDRS	2	0
9	LWLRPDEFECGDVS	1	0
10	RAHFCTRNLRLHVTD	1	0
11	SCAALFNSFGCVLLR	1	0

**Figura 6.** Secuencias obtenidas y frecuencia de las mismas en las dos rondas de selección.

Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos por 2 algoritmos diferentes de alineación de la secuencia, por medio de ClustalW2 alignment website y de MUSCLE alignment website, en busca de posibles candidatos (figura 7) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

De las cuatro secuencias más frecuentes se obtuvieron los clones denominados MSPC-1 (DLCYRRPLPFPFRPL), MSPC-2 (GGRFFGVGLPFDARW), MSPC-3 (SVRDNAFLFSARSVG) y MSPC-4 (CAWCLVISPARAADG).



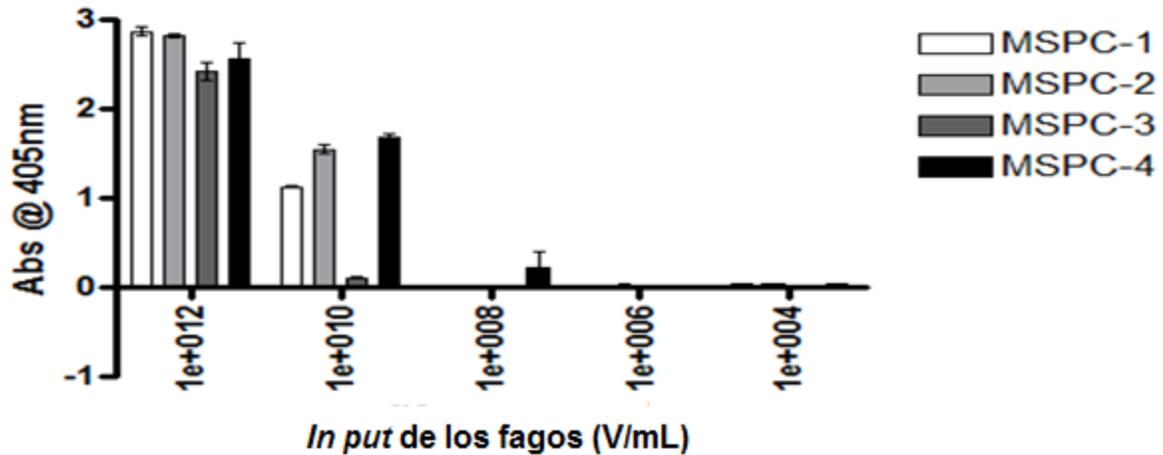
**Figura 7.** Comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos: izquierda alineamiento empleando el algoritmo MUSCLE y derecha alineamiento empleando el algoritmo CLUSTALW2

#### 4.2. Interacción de los clones de fagos seleccionados con receptores ErbB3

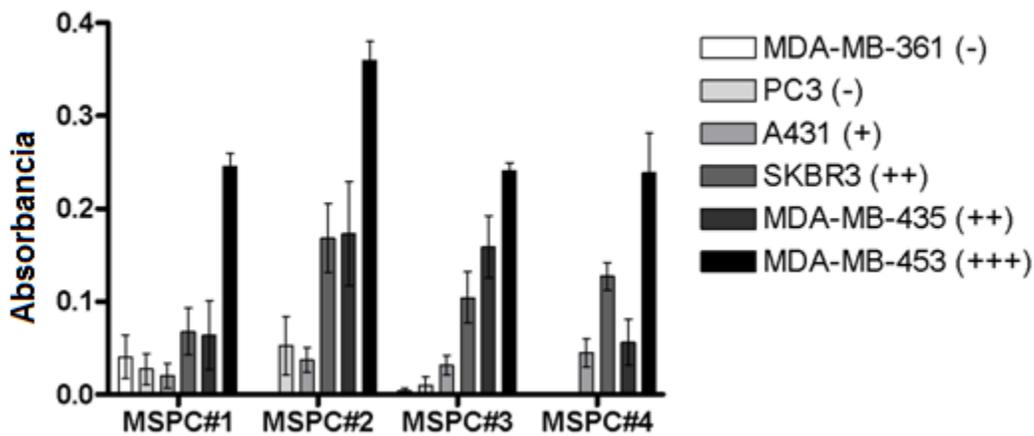
Para determinar la capacidad de los fagos de interactuar adecuadamente con los receptores ErbB3 tanto en sí mismo como en la serie de líneas que sobreexpresión en diferente medida los receptores se utilizó una serie de ensayos ELISA usando anticuerpos anti-ErbB3 como forma de cuantificación del receptor.

De los resultados de los ensayos de ELISA contra el dominio extracelular del receptor ErbB3 y contra las distintas líneas celulares con distintos niveles de expresión del receptor (figuras 8 y 9) se desprende que los fagos con mayor selectividad y mayor reconocimiento de los cuatro fagos seleccionados son MSPC-3 y MSPC-4.

Esto se debe a que son los dos clones que presentan menor unión en las células con menor o nulo nivel de expresión del receptor ErbB3 (figura 9). También se desprende de estos resultados que el rango óptimo de trabajo para el nivel de fagos (*in put*) en viriones por mililitro a utilizar es de  $1 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^8$  (figura 8). Niveles utilizados en los posteriores ensayos de ELISA.

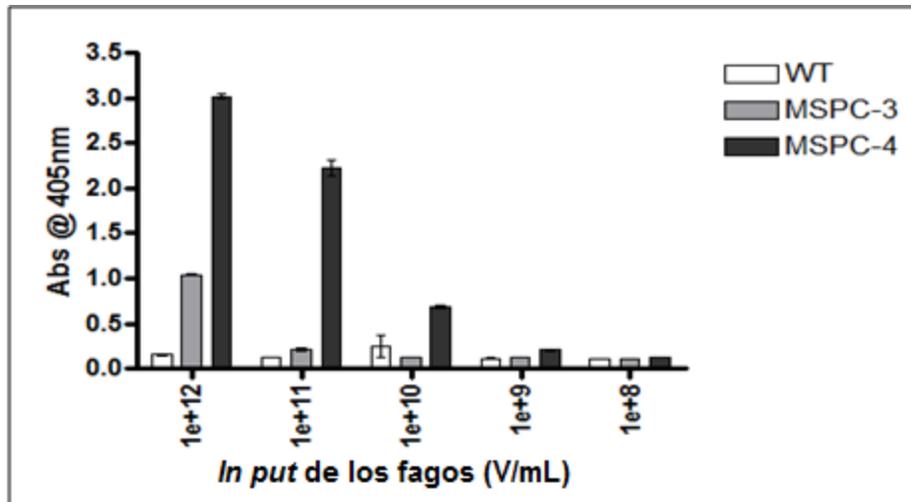


**Figura 8.** Ensayo de unión de los fagos anti-ErbB3 contra el dominio extracelular del receptor purificado (ErbB3-ECD). Las barras indican una Desviación Estándar.

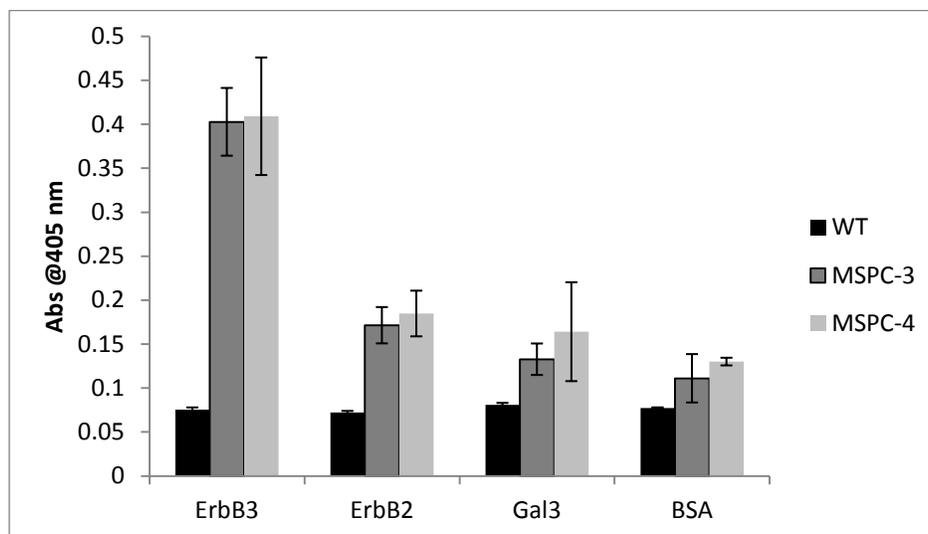


**Figura 9.** Ensayo de ELISA con los 4 clones seleccionados en células con distintos niveles de ErbB-3. Los signos de (+) representan el nivel de expresión del receptor en la línea celular. El signo (-) representa que la línea no presenta expresión de ErbB-3. El nivel de fondo realizado con un fago WT fue sustraído a los valores de absorbancia. Las barras indican una Desviación Estándar.

Es de destacar que la unión de ambos clones por el receptor ErbB-2 (figura 11) no es significativa, lo que demuestra que no presentan reacción cruzada con este receptor de la misma familia y su especificidad por el receptor para el cual fueron seleccionados. En la misma figura se denota que los niveles de unión a proteínas como ser BSA y Gal 3 es prácticamente del mismo orden que para ErbB2 lo cual confirma la especificidad de los clones por el receptor ErbB3.

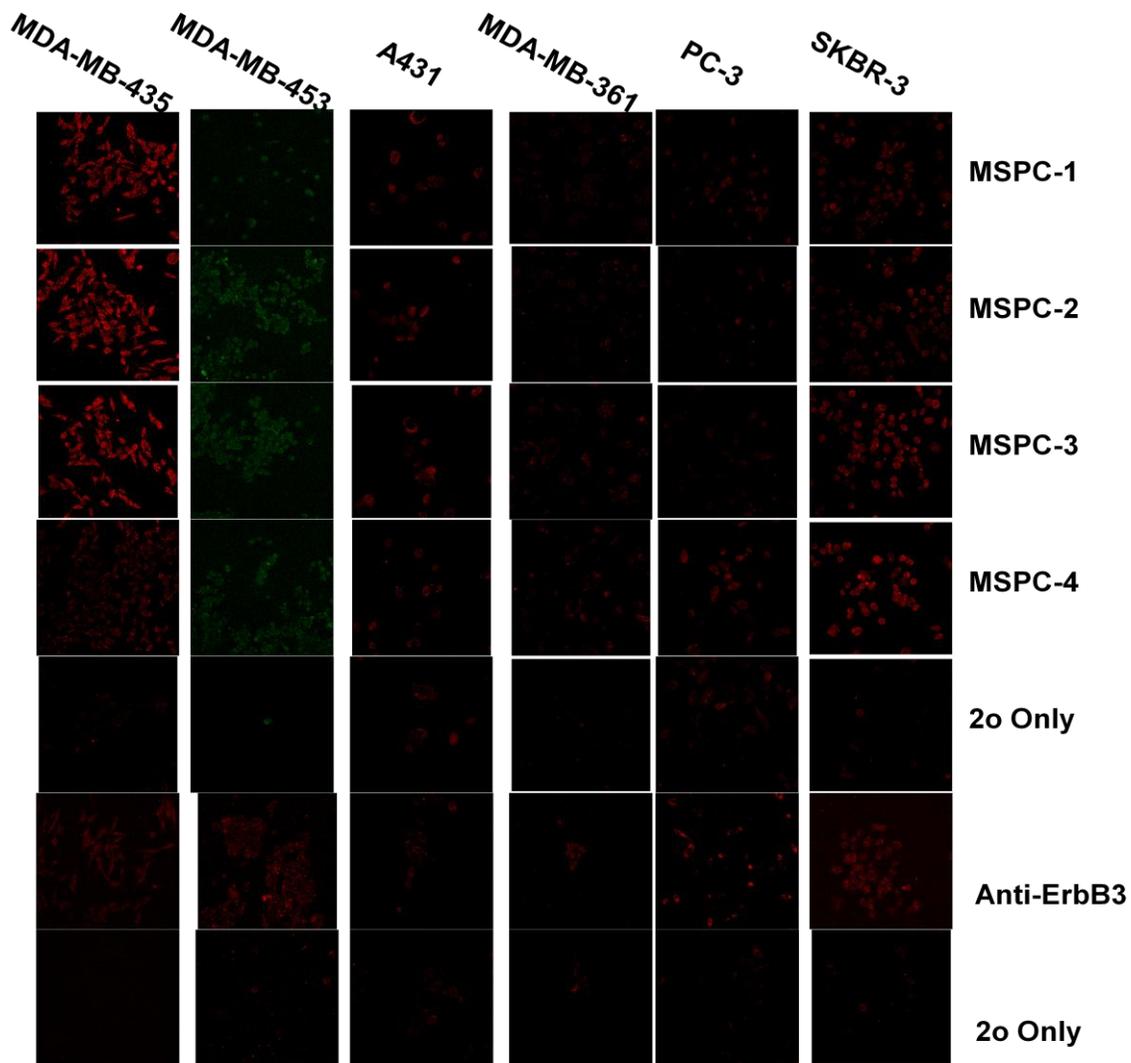


**Figura 10.** Ensayo de unión de los fagos anti-ErbB3 contra el dominio extracelular del receptor purificado (ErbB-3-DEC). Las barras indican una Desviación Estándar.



**Figura 11.** Ensayo de unión de los fagos anti-ErbB3 y una cepa WT contra distintas dianas celulares. Las barras indican una Desviación Estándar.

Como forma de corroborar la interacción del receptor ErbB3 con los fagos se procedió a la biotilización de los mismos para ser reconocidos por anticuerpos que porten un fluoróforo utilizando las mismas líneas celulares que en el apartado anterior.

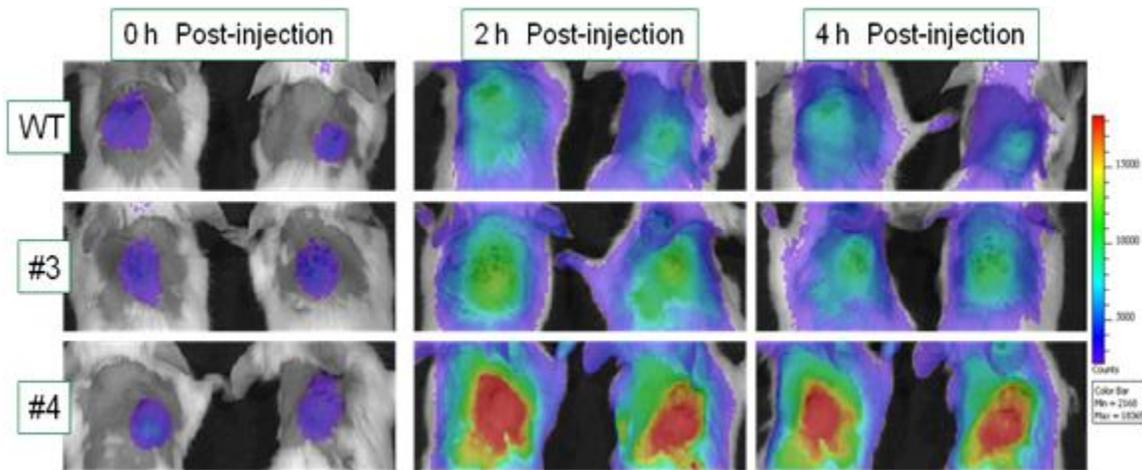


**Figura 12.** Estudio de unión a distintas líneas celulares de los cuatro clones seleccionados, MSPC-1, MSPC-2, MSPC-3 y MSPC-4. Como control negativo (2° Only) se trabajó con el anticuerpo  $\alpha$ -Biotin-Alexaflour en ausencia de fago. Como control positivo el anticuerpo monoclonal comercial anti-ErbB3. Como control negativo del anticuerpo anti-ERbB3 se trabajó con el anticuerpo anti-Fc murino derivatizado con HRP

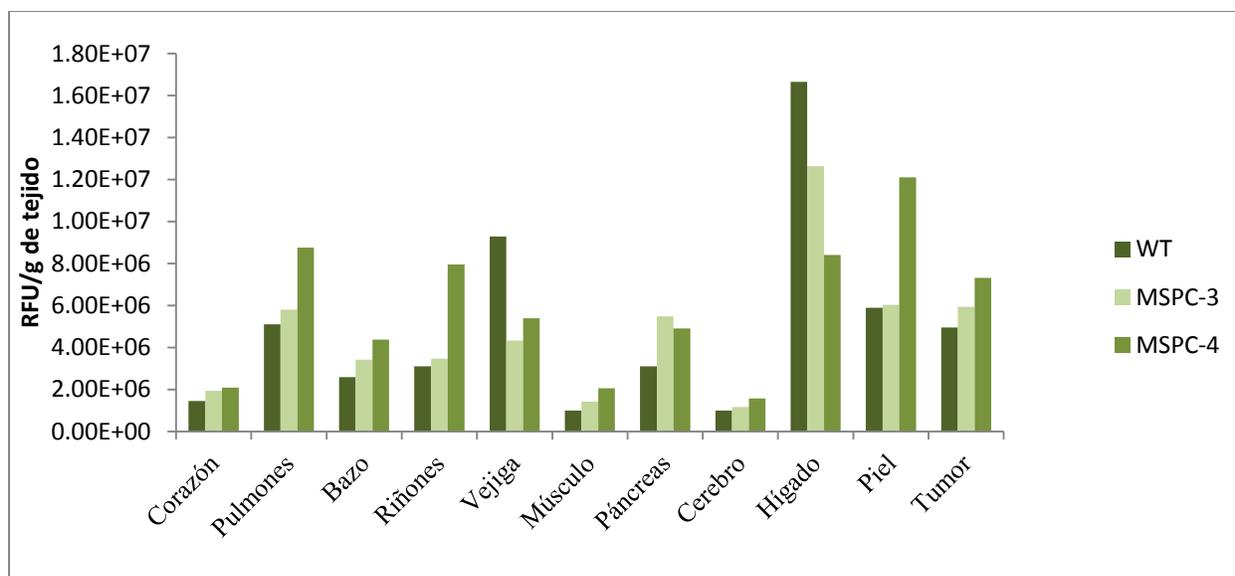
Las líneas celulares con mayor expresión de ErbB3 como son MDA-MB-435 y MDA-MB-453 presentan una mayor señal, para los cuatro clones seleccionados, que las líneas celulares con nivel intermedio de expresión (SKBR-3, A431 y MDA-MB-361). La línea celular PC3 (ErbB3 negativa) presenta un nivel de señal para los cuatro clones de igual intensidad que para el control negativo, mostrando de esta manera la especificidad de los clones seleccionados (figura 12).

### 4.3. Estudios *in vivo* en animales con tumores mamarios que sobreexpresan ErbB3

En estos ensayos se puede apreciar una considerable captación de los fagos por el tumor con sobreexpresión del receptor ErbB3 inclusive a las 2 h post inyección (figura 13). Observándose a 4 h relaciones tumor/músculo de 5 y 4 para los fagos MSPC-4 y MSPC-3 respectivamente, inclusive para ambos clones se obtienen relaciones cercanas a 1 cuando se compara tumor/hígado (figura 14), siendo el hígado la principal vía de eliminación de los fagos (Valadon, et al.; 2006).



**Figura 13.** Imagen de la biodistribución de los fagos anti-ErbB3 marcados con Dylight680. #3 y #4 representa los fagos MSPC-3 y MSPC-4.



**Figura 14.** Biodistribución a 4 h post-inyección de los clones anti-ErbB3, MSPC-3 y MSPC-4 marcados con Dylight680. Los datos se muestran en unidades de fluorescencia por gramo de tejido u órgano.

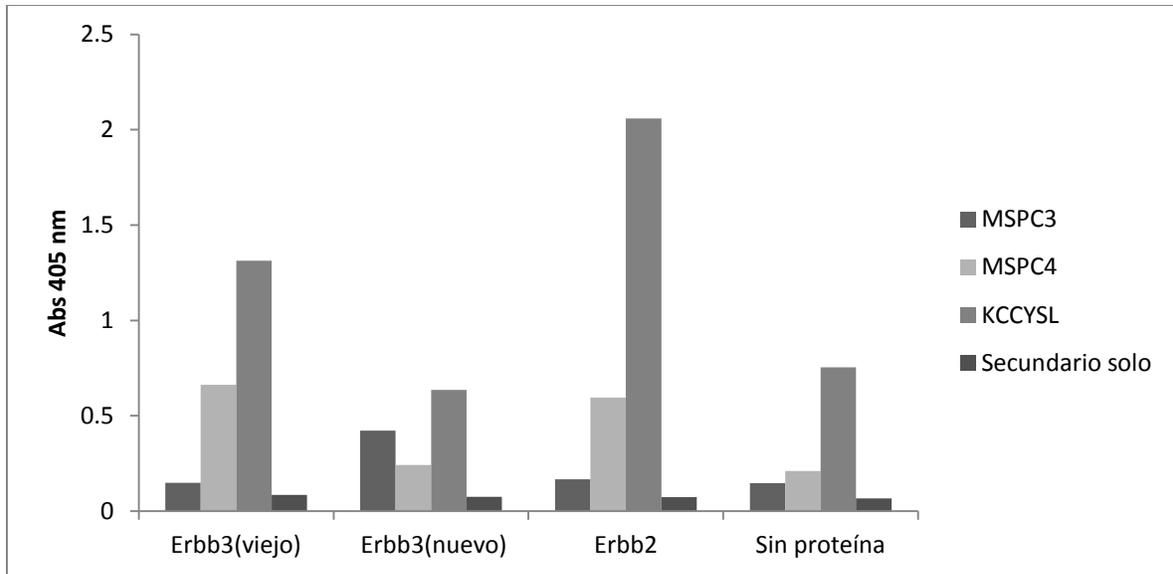
#### 4.4. Interacción de los péptidos seleccionados con receptores ErbB3

Como forma de estudiar la selectividad de los péptidos seleccionados a partir de los clones de los fagos obtenidos a partir de la biblioteca de *phage display* se los enfrenta a los receptores ErbB directamente y a diferentes líneas celulares que sobreexpresan en diversas formas a los receptores.

En cuanto a la interacción con los receptores ErbB2 y ErbB3 como forma de observar la selectividad se puede apreciar que ambos péptidos, MSP3 y MSP4, presentan baja a moderado reconocimiento por el receptor ErbB2 respectivamente (figura 15). A su vez se puede destacar que MSP3 es más específico dado que presenta menor unión a ErbB2, menor nivel de unión inespecífica (denotado por el bajo nivel en la placa sin proteína, control negativo).

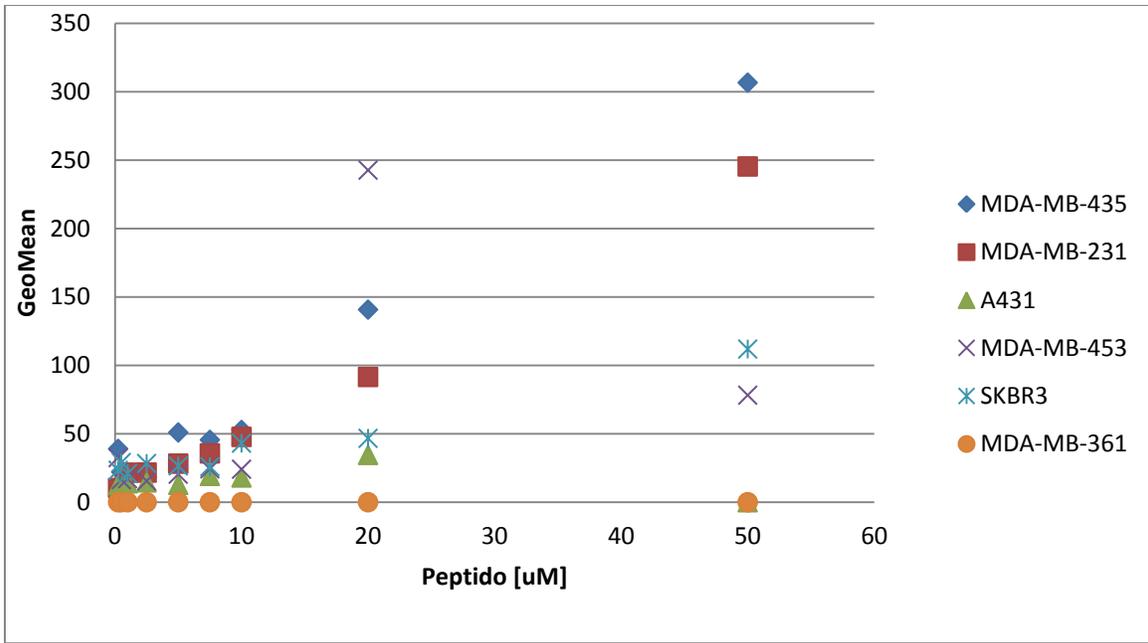
Como control positivo se utilizó el péptido obtenido por *phage display*, anti-ErbB2, KCCYSL.

Si bien el péptido anti-ErbB3 no presenta una unión con tan alta afinidad como si lo presenta el péptido KCCYSL, si posee una muy alta especificidad por el receptor ErbB3 dado que la reacción cruzada con el receptor ErbB2 está a niveles de unión inespecífica.

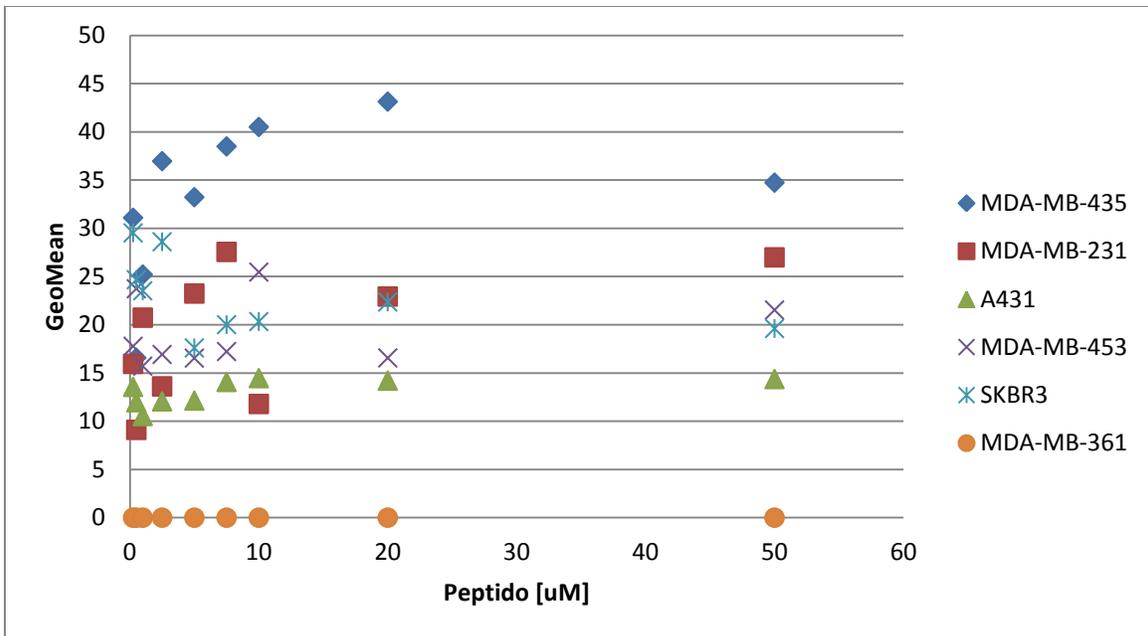


**Figura 15.** Estudio de unión a los receptores ErbB3 y ErbB2 de los péptidos MSP3, MSP4 y KCCYSL biotinilados.

En el estudio de FAC scan para los péptidos MSP3 y MSP4, enfrentados a diferentes líneas celulares, se observa que este último tiene mayor reconocimiento por el receptor ErbB-3, (figuras 16 y 17). Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos para los que expresan en su superficie las mismas secuencias peptídicas (fagos MSPC-3 y MSPC-4). Los niveles de expresión de ErbB-3 en las células se observa claramente reflejado en el comportamiento de unión de los péptidos, lo cual demuestra su especificidad.



**Figura 16.** FAC scan. Análisis de la unión a distintas líneas celulares de MSP-4 biotinilado. Nivel de expresión del ERbB3 para las líneas utilizadas: MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-231 (++) , MDA-MB-453(+++), MDA-MB-361(+), A431 (+), SKBR3 (+).

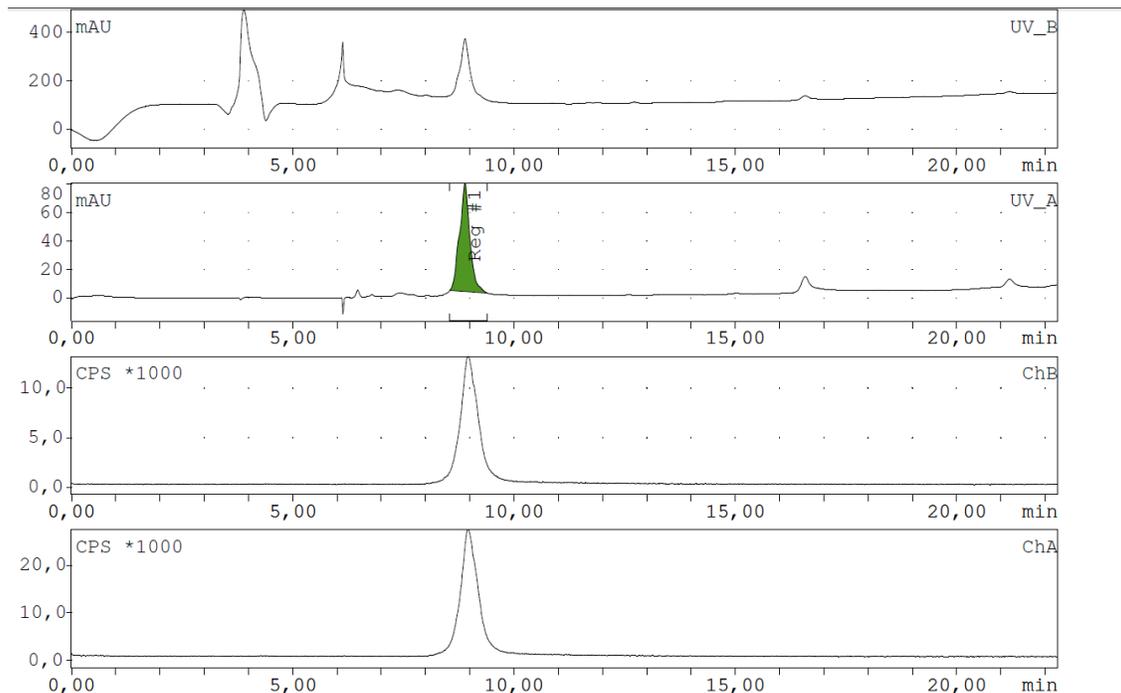


**Figura 17.** FAC scan. Análisis de la unión a distintas líneas celulares del péptido MSP-3 biotinilado MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-231 (++) , MDA-MB-453(+++), MDA-MB-361(+), A431 (+), SKBR3 (+).

#### 4.5. Obtención del complejo $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4

Para ello se realizó la marcación de 20 y 40  $\mu\text{g}$  péptido HYNIC-GAC-MSP4 con  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , en presencia de  $\text{SnCl}_2$  (1 mg/mL) y solución de tricina (100 mg/mL), con actividad específicas distintas y en aumento, obteniéndose para todas las marcaciones purezas radioquímicas superiores al 95 %.

El análisis de la pureza radioquímica se realizó por HPLC en columna C18 (Restek) y con un gradiente de 0 a 100% de B en 20 minutos de: (A)  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (B) ambas soluciones con TFA al 10%. Por este método se logra separar el péptido no- marcado (frío) del marcado ya que poseen tiempos de retención de 8.9 y 9.0 min (figura 18).

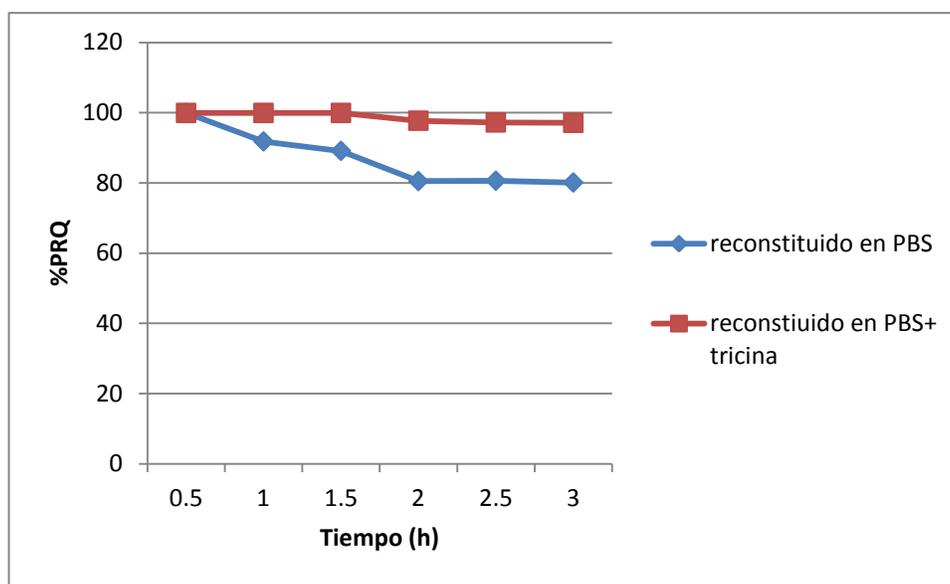


**Figura 18.** Perfil de HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4, Ch 1 y 2 se corresponden al detector UV y Ch3 y Ch4 al detector gamma.

## 4.6. Estabilidad de $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4

### 4.6.1. Estudio de estabilidad en diferentes condiciones de reconstitución

El estudio de estabilidad del complejo se realizó a distintos tiempos, previamente purificando por HPLC el péptido marcado. Posteriormente, se elimina el disolvente con corriente de nitrógeno y se ensaya reconstituir en 600  $\mu\text{L}$  PBS 0.1 M pH= 7.4 y con 600  $\mu\text{L}$  PBS + tricina (100 mg/mL). Se controla por HPLC con el mismo sistema descrito y se denota una mejor estabilidad con el segundo procedimiento, manteniéndose el porcentaje de pureza radioquímica mayor al 95% en los tiempos estudiados (figura19).



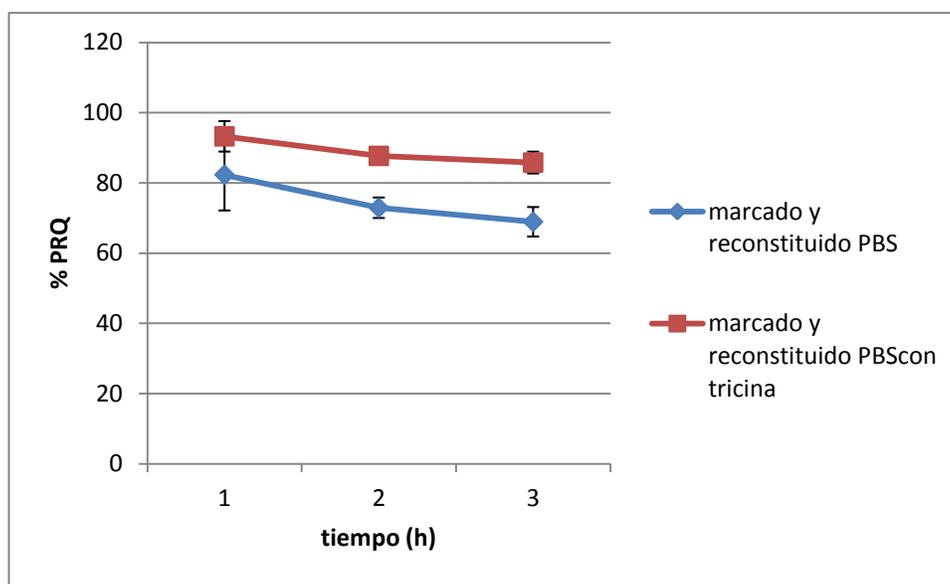
**Figura 19.** Estudio de estabilidad de marcado de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 a 37°C.

### 4.6.2. Estudio de estabilidad frente a sustancias con afinidad por el $^{99m}\text{Tc}$

La estabilidad del complejo se estudió frente a un gran exceso de una molécula con excelente afinidad por  $^{99m}\text{Tc}$ , como es la cisteína a una concentración de 10 mM. Se realizó el ensayo de transquelación a 37 °C, a distintos tiempos, en las dos condiciones de reconstitución del marcado, por triplicado y se controla por HPLC. Se puede observar una mejor estabilidad del péptido marcado y reconstituido con PBS + tricina (figura 20), lo que es concordante con el

hecho que en la esfera de coordinación del  $^{99m}\text{Tc}$  las moléculas de tricina pueden ser intercambiadas con las que se encuentran en el medio.

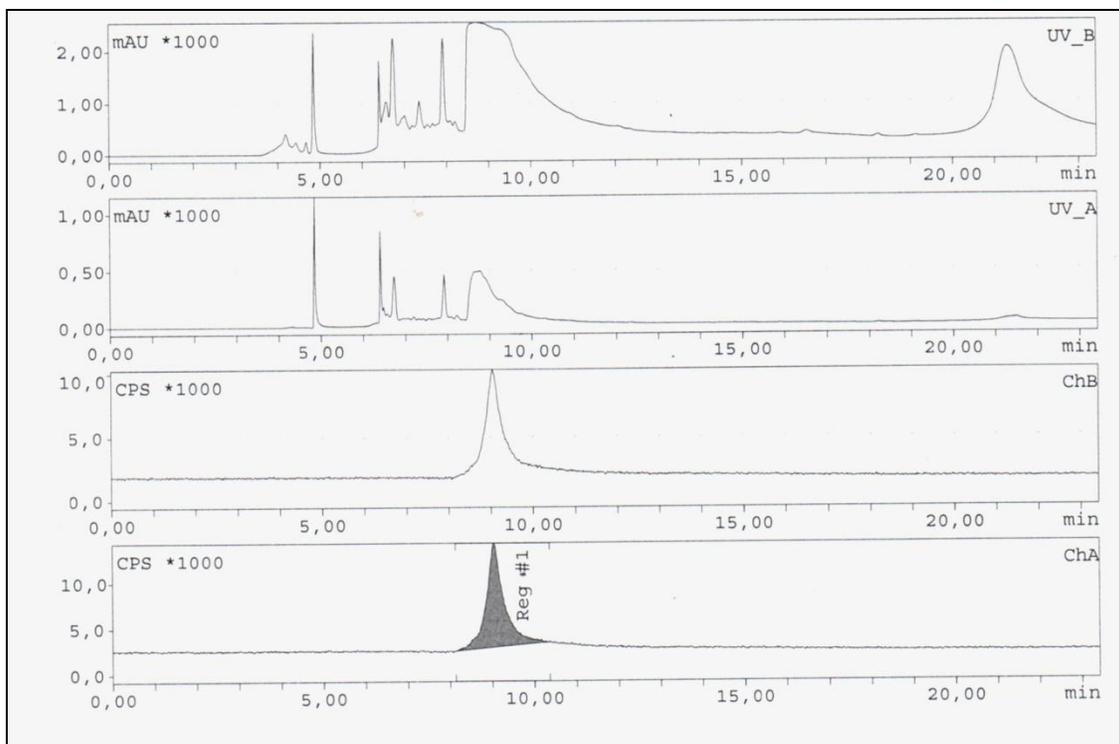
Para evaluar la hidrofilia/lipofilia, se purificó por HPLC el conjugado de HYNIC-GAC-MSP4 marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando tricina como co-ligando. El disolvente fue eliminado y el conjugado marcado (30  $\mu\text{Ci}$ ) fue reconstituido en PBS (pH= 7.4, 0.1M, 2 mL). El coeficiente de reparto obtenido como el log (cuentas en octanol/cuentas en fase acuosa), obteniéndose un valor de log P de -0.8233. Lo que denota que el complejo es hidrofílico, lo que puede indicar que los estudios de biodistribución muestren eliminación urinaria y disminución en la captación hepática.



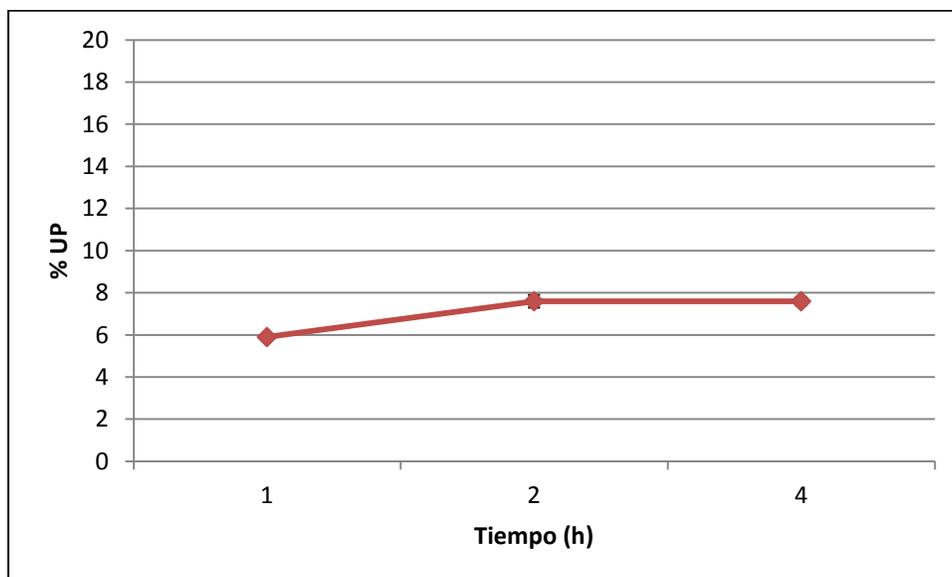
**Figura 20.** Estudio de transquelación de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 a 37°C con una solución de cisteína 10 mM, a tiempos de 1, 2 y 3 horas. Las barras indican una Desviación Estándar.

#### 4.6.3. Estudio de estabilidad en suero fetal bovino

Del estudio de la estabilidad del conjugado  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 *in vitro* en SFB, se observó una estabilidad mayor a 95 % a 4 h del radioconjugado (figura 21). Cuando se estudio el grado de unión a proteínas en suero fetal bovino, se observó que el complejo presenta poca unión a proteínas, cercano al 8 % sin variación significativa a lo largo del tiempo (figura 22).



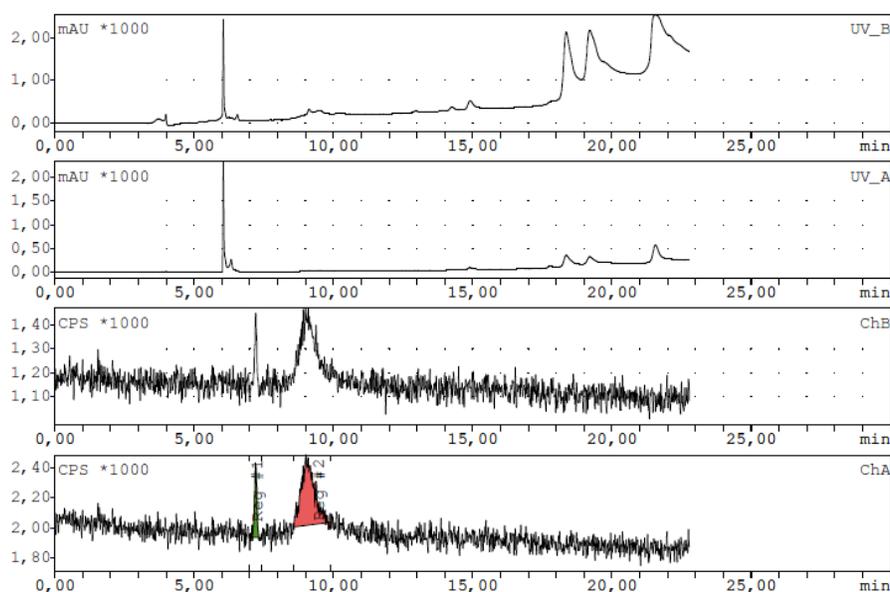
**Figura 21.** Perfil de HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 en SFB, Ch 1 y 2 corresponden a detección UV a las longitudes 280 y 220 nm respectivamente y Ch3 y Ch4 detección gamma.



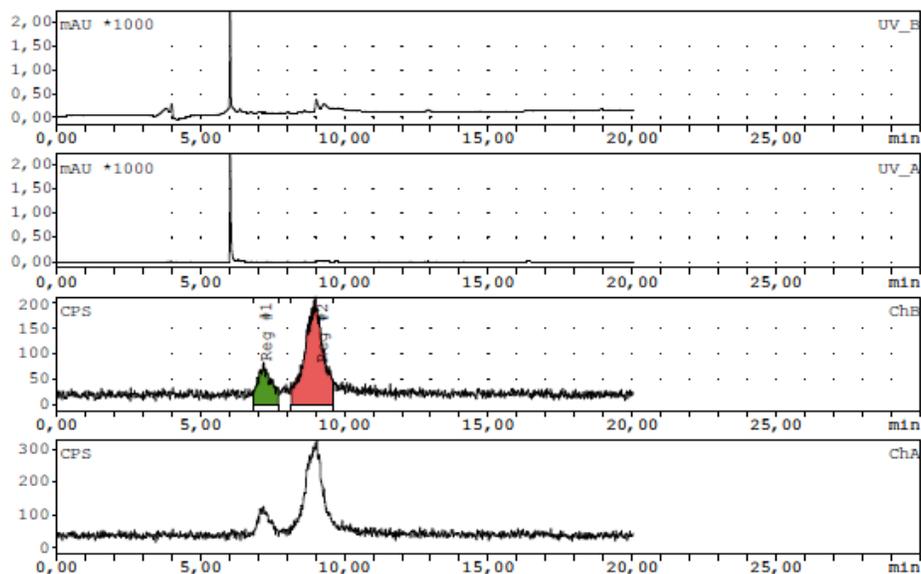
**Figura 22.** Estudio en SFB de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 a 37 °C a tiempos de 1, 2 y 4 horas. Las barras indican una Desviación Estándar.

#### 4.6.4. Estudio de metabolización *in vitro*

La estabilidad metabólica de los péptidos *in vitro* se realizó utilizando las fracciones microsomal y citosólica de hepatocitos de rata. Para ello se incuban los péptidos con las fracciones en presencia de sistemas generadores glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato a diferentes tiempos y se siguen las reacciones por HPLC en las mismas condiciones anteriormente empleadas (Boiani et al, 2009).

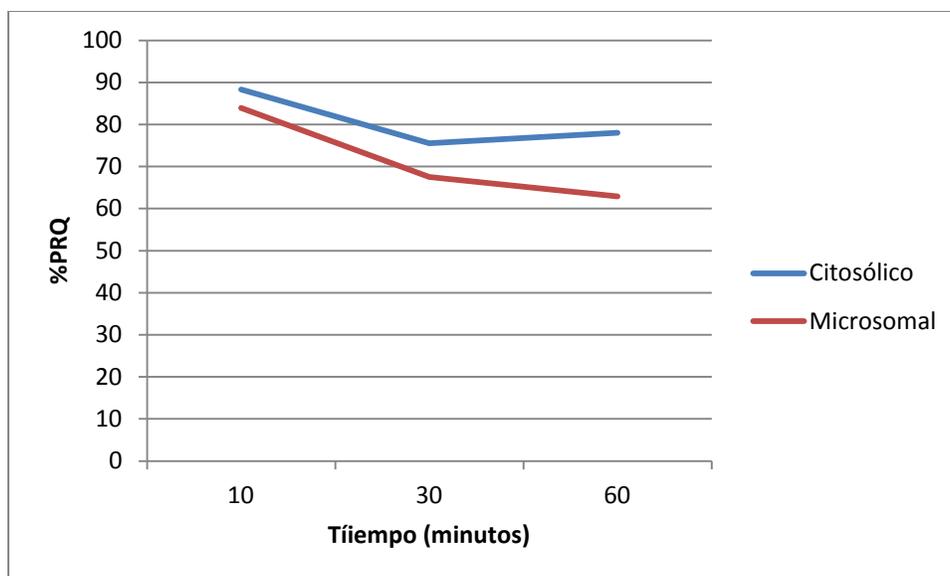


**Figura 23.** Perfil de HPLC del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 purificado e incubado por 10 min a 37 °C con la fracción microsomal. Los dos primeros canales muestran detección UV a 280 y 220 nm respectivamente y los dos últimos detección gamma.



**Figura 24.** Perfil de HPLC del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 purificado e incubado por 60 min a 37 °C con la fracción citosólica. Los dos primeros canales muestran detección UV a 280 y 220 nm respectivamente y los dos últimos detección gamma.

Como se muestra en las figuras 23 y 24 se logra diferenciar el péptido marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  de las proteínas o productos de metabolización tanto con la fracción microsomal como citosólica. De acuerdo al análisis del HPLC a los diferentes tiempos de incubación se observa que incluso a los 10 min de incubación el péptido radiomarcado disminuye su pureza radioquímica llegando incluso a los 60 min a valores cercanos al 60% en el caso de la fracción microsomal. El péptido presenta una mayor estabilidad frente a la fracción citosólica que a la microsomal, mostrando así una posible metabolización por esta última vía (figura 25).



**Figura 25.** Pureza radioquímica del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-GAC-MSP4 incubado a 37 °C con la fracción microsomal, o con la fracción citosólica a tiempos de 10, 30 y 60 minutos.

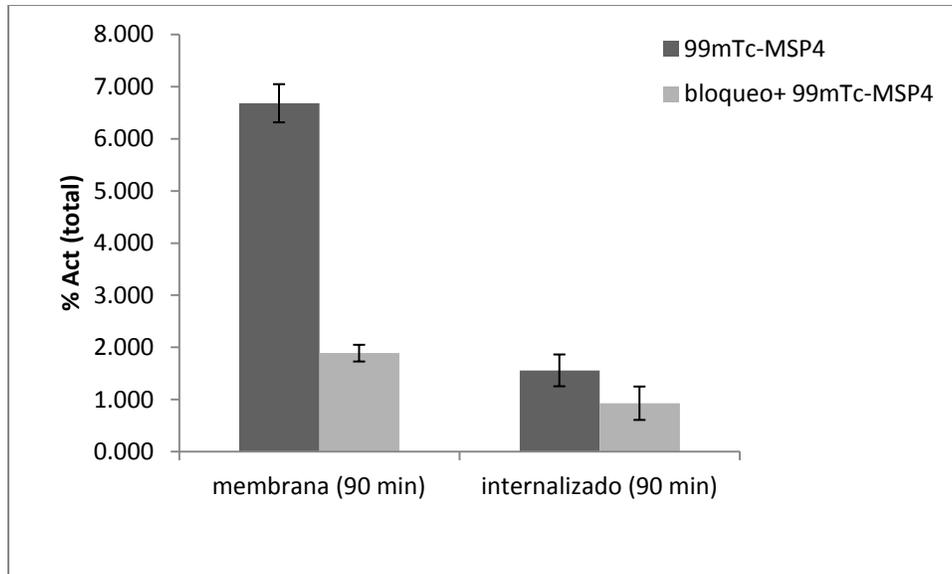
#### 4.6.5. Unión e internalización celular de $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4

Para estudiar *in vitro* la unión a membranas y a la internalización del péptido MSP4 marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  se incubó éste con las líneas celulares MDA-MB-435 (+++) y PC3(-) y posteriormente se permitió la internalización del péptido, el proceso se siguió por recuento de radioactividad.

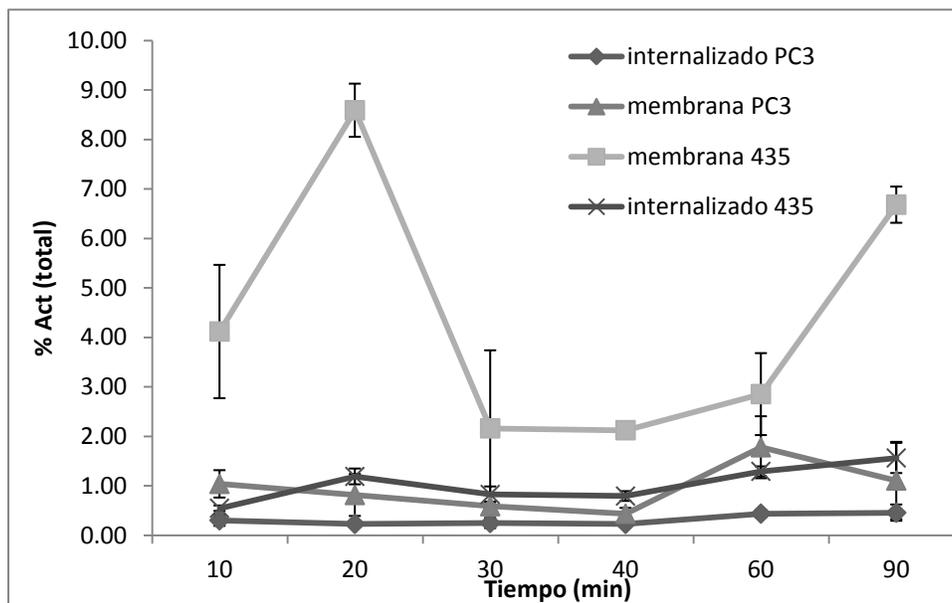
El porcentaje de actividad del radiopéptido que permaneció unido al cabo de 1.5 horas de incubación con la membrana mostró que 6.5% de actividad mientras que la unión del péptido en el estudio de bloqueo con el péptido frío MSP4 rindió un 2 % de actividad. En el caso del internalizado fue mucho menor sólo del 2% en ambas condiciones (figura 26).

A lo largo del tiempo estudiado se observó una rápida unión al receptor ErbB3 seguido de su internalización, así como un cierto grado de retención del péptido en su interior (figura 27).

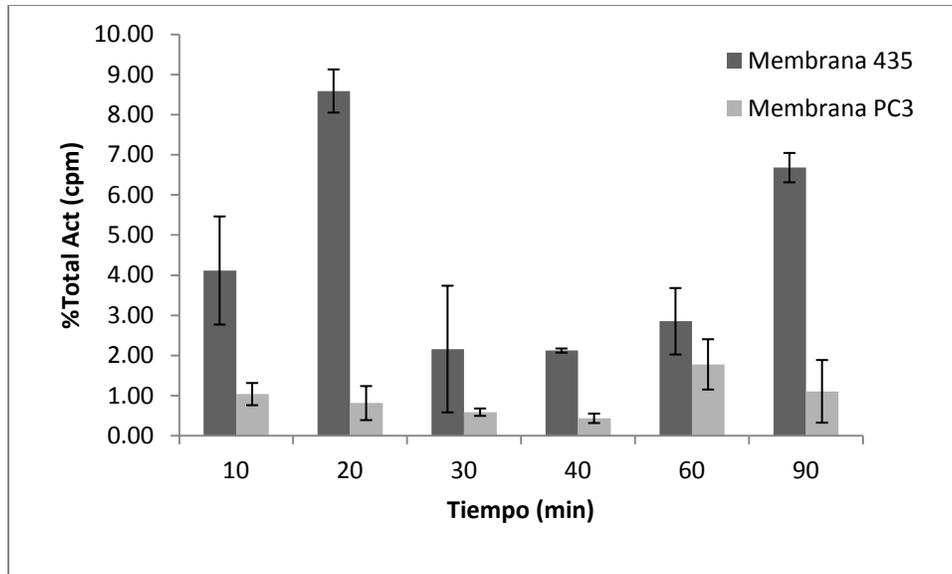
Es apreciable la especificidad del péptido por el receptor ErbB3 dada la baja unión y retención que presenta  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 en la línea celular PC3 (ErbB3-) (figuras 28 y 29).



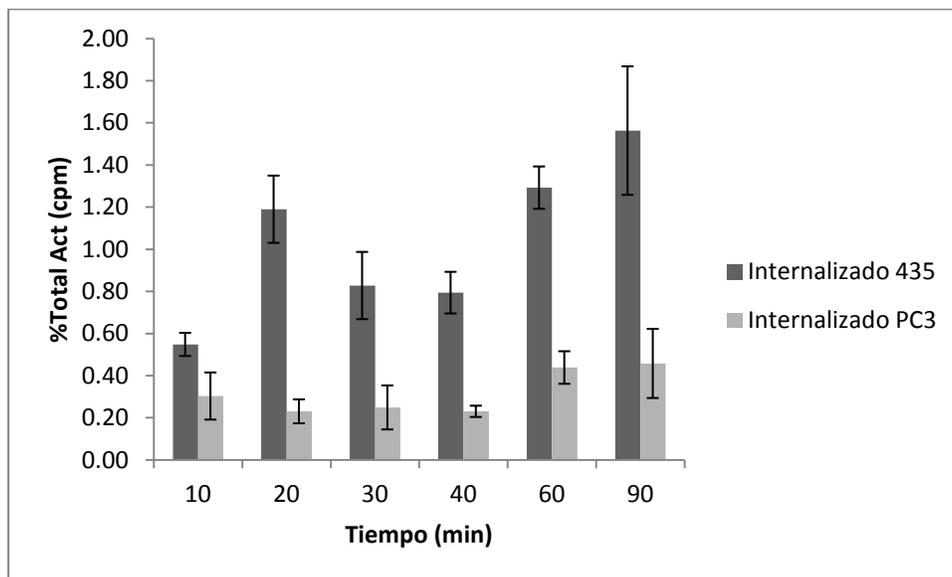
**Figura 26.** Estudio de unión en células MDA-MB-435 de 99mTc-tricina/HYNIC-MSP4 a 90 min de incubación. La actividad retenida en la membrana es expresada como porcentaje (%) de la actividad total incubada. Las barras indican una Desviación Estándar.



**Figura 27.** Estudios de unión in vitro a las líneas celulares MDA-MB-435 (+++) y PC3(-) del 99mTc-tricina/HYNIC-MSP4 a los diferentes tiempos estudiados. Las barras indican una Desviación Estándar.



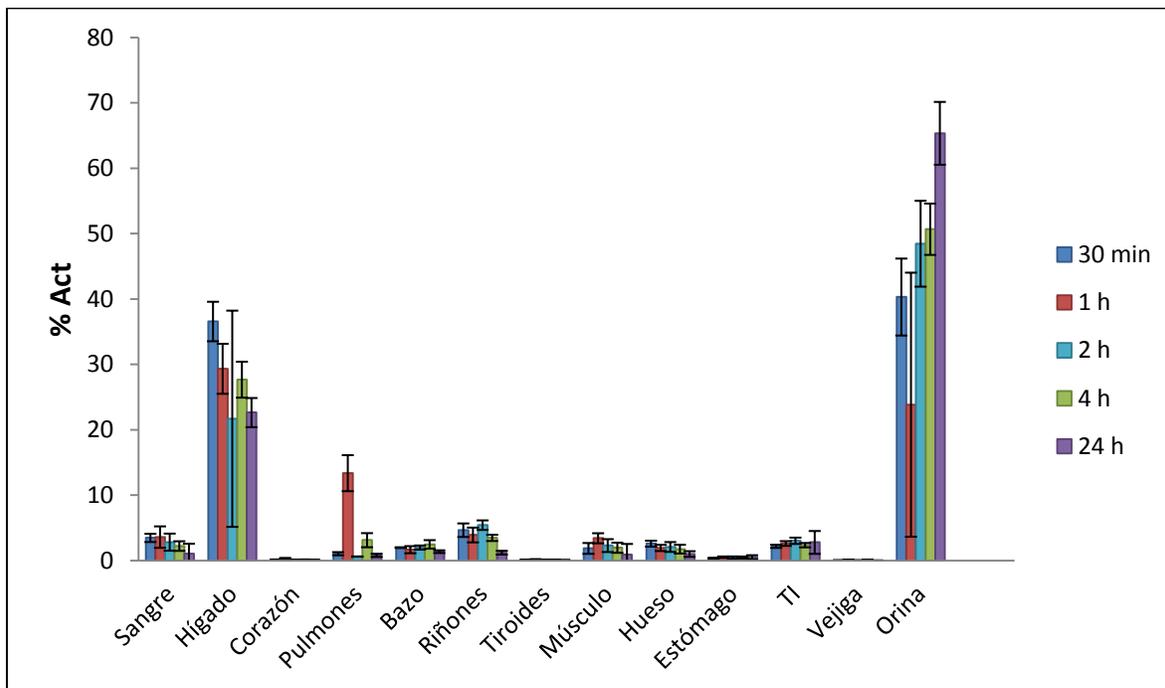
**Figura 28.** Estudio comparativo de unión en membrana del  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 en las líneas celulares MDA-MB-435 (+++) y PC3(-) a distintos tiempos. Las barras indican una Desviación Estándar.



**Figura 29.** Estudio comparativo de internalización celular en las líneas MDA-MB-435 (+++) y PC3(-) del  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 a los diferentes tiempos estudiados. Las barras indican una Desviación Estándar.

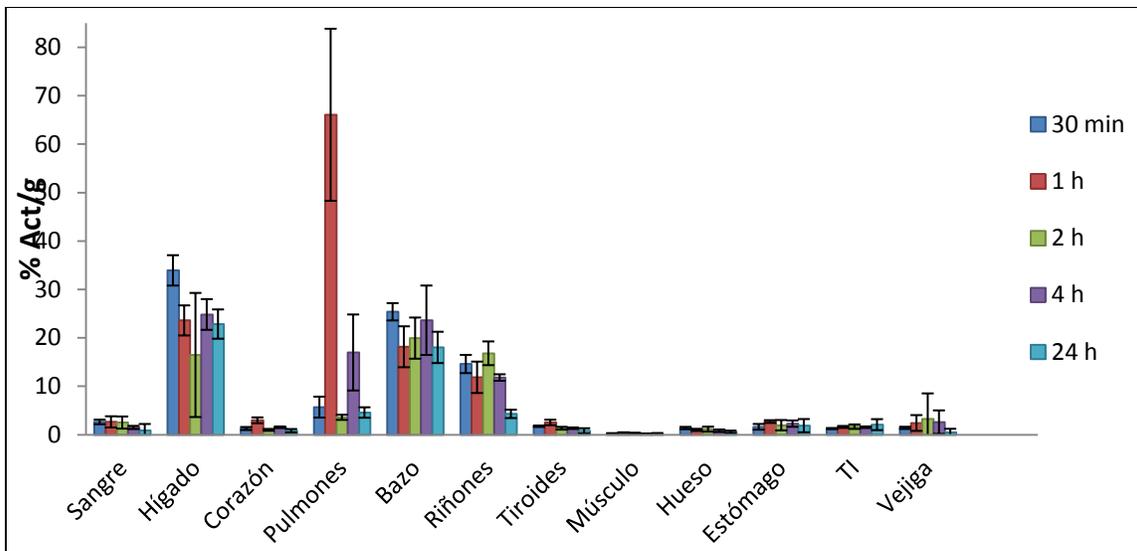
#### 4.6.6. Estudios *in vivo* de $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4

Como forma de corroborar en un modelo murino la biodistribución (distribución y eliminación) del radiofármaco generado se plantea por un lado el estudio en ratones normales y posteriormente en ratones portadores de tumores mamarios que sobreexpresen el receptor ErbB3.



**Figura 30.** Biodistribución del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 en ratones Balb/c normales. (n=4, %A  $\pm$  DS).

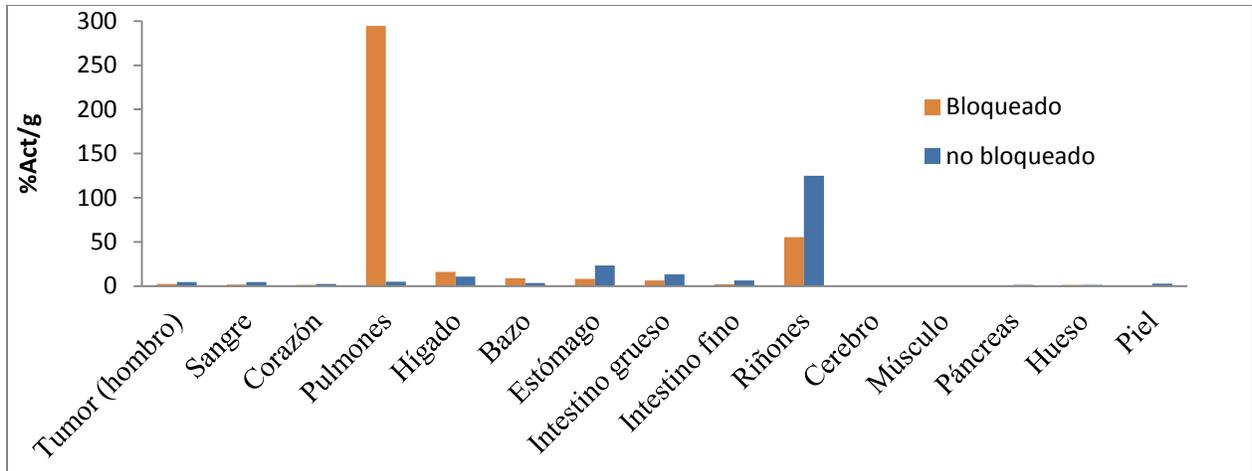
Las biodistribuciones fueron realizadas a las 0.5, 1, 2, 4 y 24 h (n = 4). La eliminación de  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 fue muy rápida (figura 30), observándose un  $48.45 \pm 6.56$  % de la actividad en orina luego de 2 h de administración del péptido, presentando baja retención inespecífica en riñones. La captación en órganos normales generalmente fue < de 5 % A/g, para el radiopéptido, excepto en riñones, hígado y bazo (figura 31) en todos los tiempos investigados. Se observó un aumento en la captación de pulmones a 1 h post inyección (~65% A/g) regresando a valores normales en las siguientes horas de biodistribución



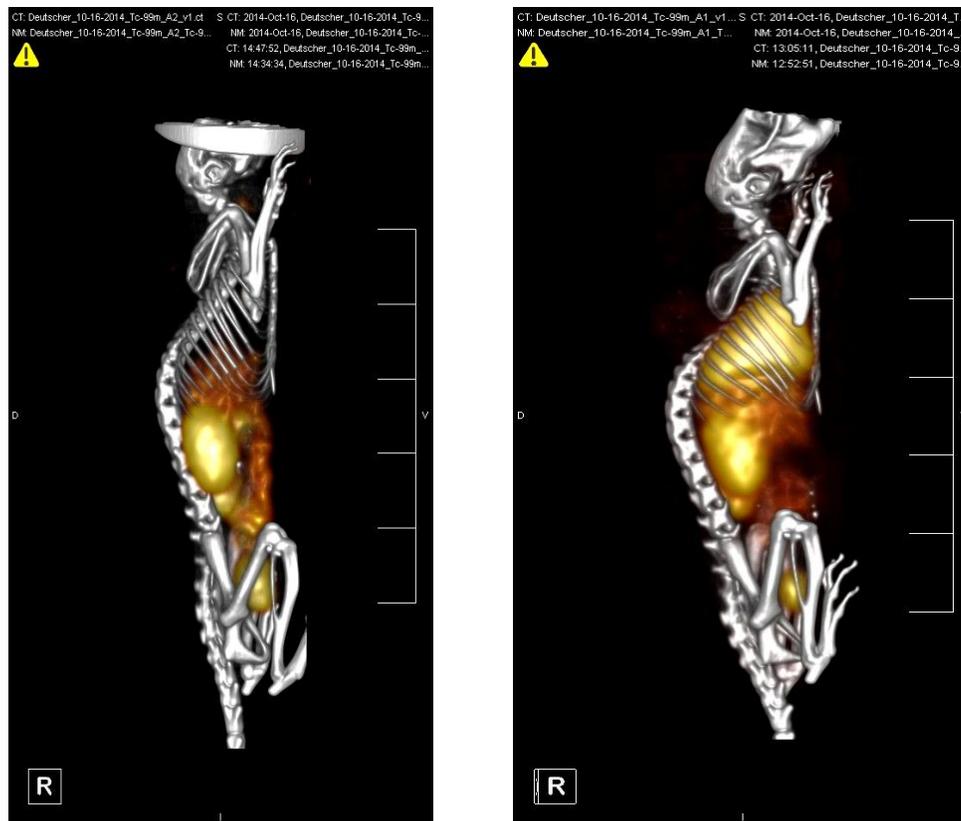
**Figura 31.** Biodistribución del péptido marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  en ratones Balb/c normales. (n=4). Los resultados se expresan en %A/g  $\pm$  DS.

La biodistribución a 2 h de los ratones SCID portadores de tumores mamarios inoculados con el péptido marcado a los cuales se le efectuaron las imágenes SPECT, presentaron una eliminación similar a los ratones Balb/c, con alta eliminación a nivel renal (figura 32), nótese por la alta captación en riñones (55.2 %). Al igual que los ratones Balb/c a 1 h presentaron una elevada captación a nivel pulmonar.

La relación tumor/músculo rindió un valor de 7.4 y en el caso de la relación tumor/sangre de 1.8. Este hecho resultó coherente con la imagen obtenida por SPECT de los animales con tumor de mama inducido por células MDA-MB-435 (figura 33), presentado una captación baja a nivel tumoral.



**Figura 32.** Biodistribución a 2 h post-inyección del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 en ratones SCID portadores de tumor de mama inducido con células MDA-MB-435. Los resultados se presentan en % Act/g.

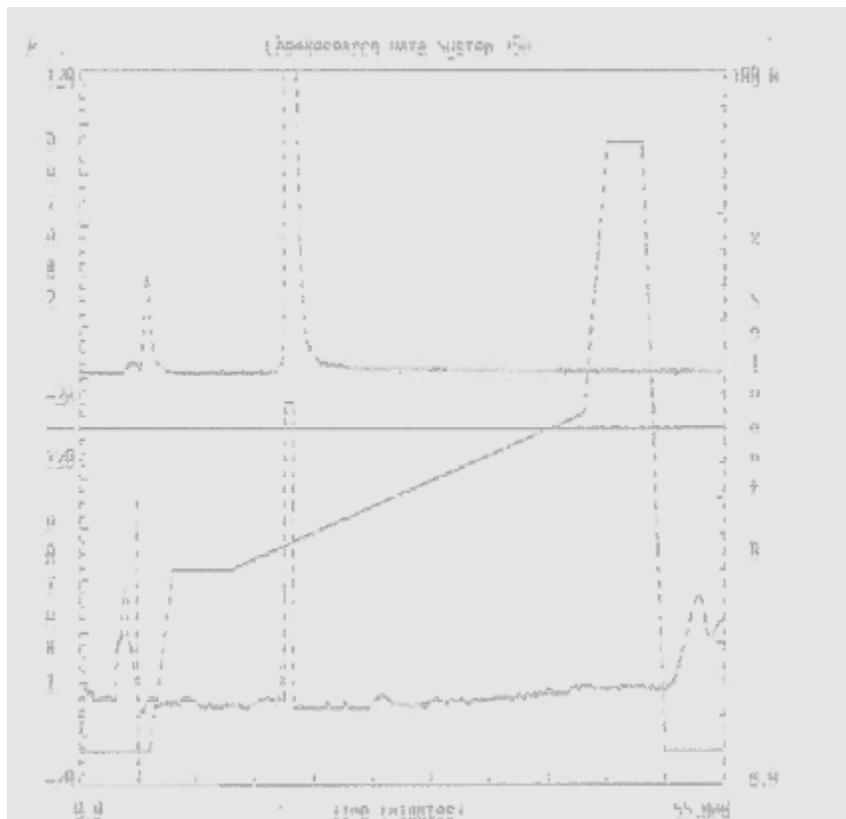


**Figura 33.** Imágenes SPECT del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4 a 2 h post-inyección en ratones SCID portadores de tumor de mama inducido por células MDA-MB-435. A la derecha se presenta el ratón bloqueado con un exceso de péptido frío 100 veces mayor al radiomarcado (w/w). A la izquierda el ratón inyectado con el complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4.

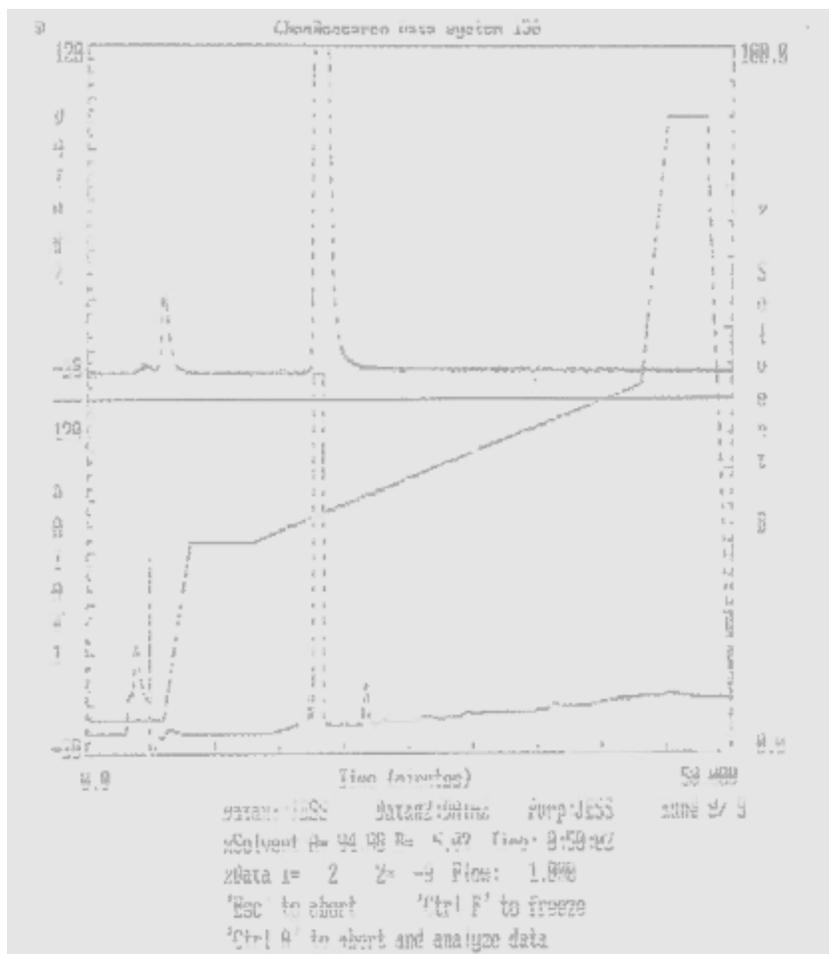
## 4.7. Obtención de los complejos de $^{111}\text{In}$ con los péptidos MSP3 y MSP4

### 4.7.1. Estudio del marcado

Se estudió la marcación con  $^{111}\text{In}$  a distintas temperaturas, con la misma actividad específica, pudiéndose apreciar que para el péptido MSP3 la temperatura óptima de marcado fue 80 °C. El péptido MSP4 presentó una buena marcación a la misma temperatura presentando un mismo perfil (figura 35), pudiéndose marcar con una eficiencia menor (57 %) a los 50 °C. Para la temperatura de 37 °C las eficiencias de marcado para ambos péptidos es menor al 50%, por tanto no se continuaron las marcaciones a esta temperatura, coincidiendo con lo que fue descrito en bibliografía para las marcaciones de péptidos con DOTA (Kumar, et al., 2007).



**Figura 34.** Estudio de marcación de  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4. Se muestra el péptido marcado a 80 °C a las 24 h en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma.



**Figura 35.** Estudio de marcación de  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3. Se muestra el péptido marcado a 80 °C en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma.

#### 4.7.2. Estudio de lipofilia

Para evaluar la hidrofilia/lipofilia, se purificaron por HPLC los péptidos marcados con  $^{111}\text{In}$ . El disolvente fue eliminado y el conjugado marcado fue reconstituido. El coeficiente de reparto se determinó como el log (cuentas en octanol/cuentas en fase acuosa), obteniéndose un valor de logP de -1,86862 y -2,14892 para  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 respectivamente. Lo que demuestra que es más hidrofílico que en el caso de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-GAC-MSP4.

#### 4.7.3. Estudio de estabilidad en suero murino

En el estudio de la estabilidad *in vitro* del complejo de  $^{111}\text{In}$  tanto para DOTA-MSP3 como para DOTA-MSP4 en suero murino, se observó una estabilidad mayor a 80% a 3 h del radioconjugado. Cuando se estudió el grado de unión a proteínas en suero, se observó que el complejo presenta poca unión a proteínas, ~15 % y ~12 % con una variación mínima a lo largo del tiempo (tabla 1).

**Tabla 1.** Ensayo de unión a proteínas plasmáticas a 37 °C en suero murino a distintos tiempos.

Tiempo (h)	PRQ <sup>a</sup> ( $^{111}\text{In}$ -MSP3)	PRQ <sup>a</sup> ( $^{111}\text{In}$ -MSP4)
1	84.74	84.74
2	84.38	87.50
3	87.50	87.50

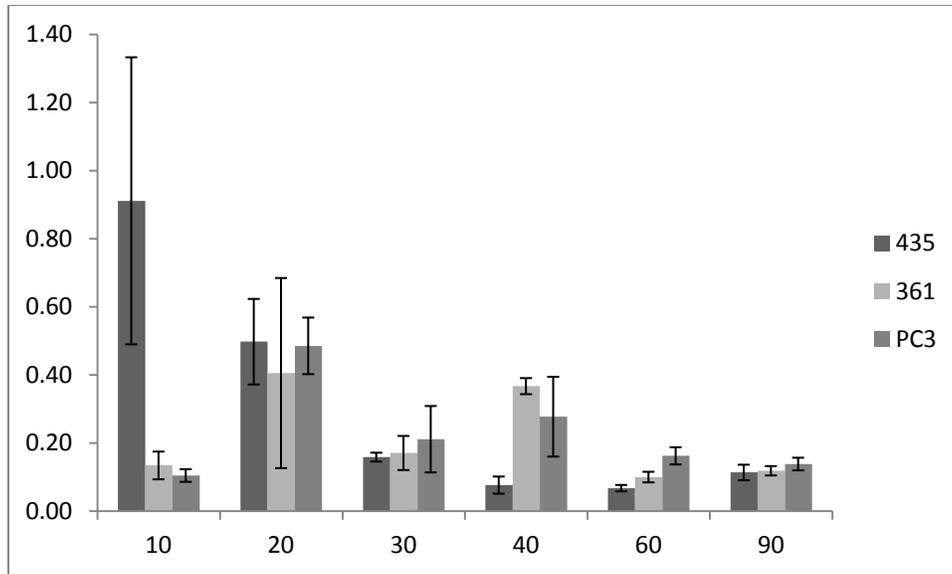
<sup>a</sup>PRQ= porcentaje de pureza radioquímica

#### 4.7.4. Estudio de unión a células de $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4

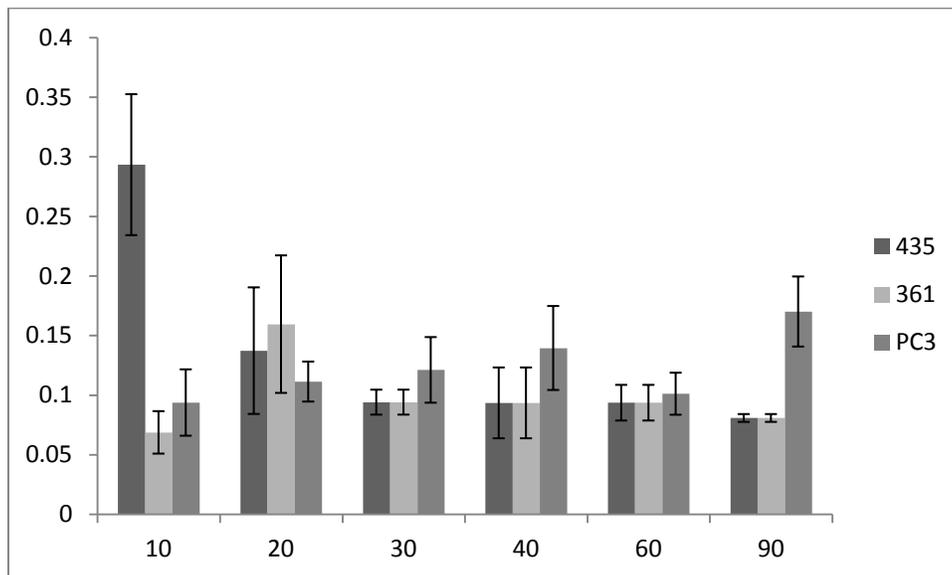
Como se muestra en las figuras 36 y 38 el péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 presenta mayor unión a membrana que el péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 a los 10 min de incubación manteniéndose ambos en los mismos niveles (entorno a 0.2) pasado este tiempo para las líneas celulares estudiadas.

El péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 muestra un máximo de internalización al cabo de 30 min, manteniéndose a los 40 min para la línea celular MDA-MB-361 (figura 39). En la línea celular PC3 el nivel de internalización es menor para los mencionados tiempos como era esperable, presentando un mayor nivel de internalización a los 90 min.

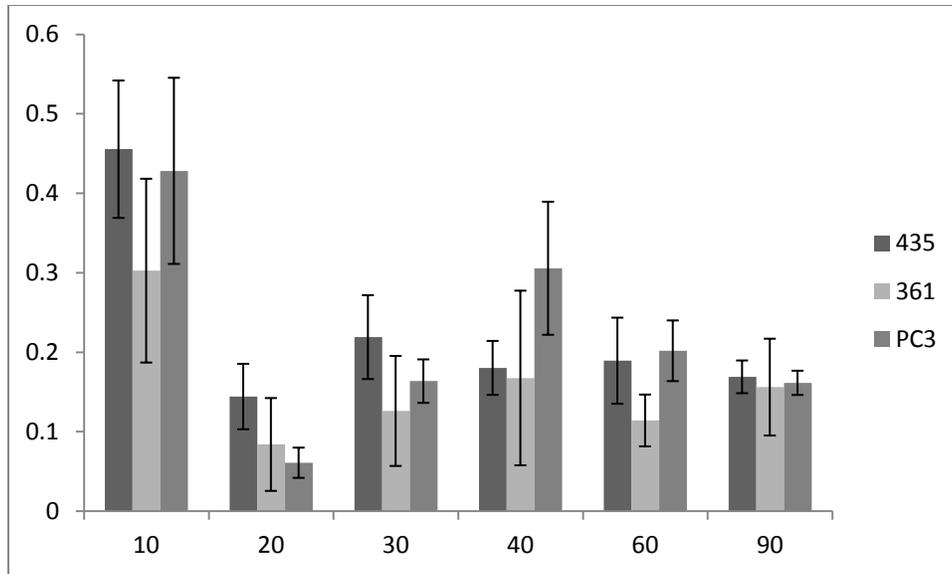
Es de destacar que el radio-péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 presenta una cinética de unión diferente a la del radio-péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4, propiedad denotada por los distintos niveles de internalización que muestran ambos péptidos para los mismos tiempos estudiados.



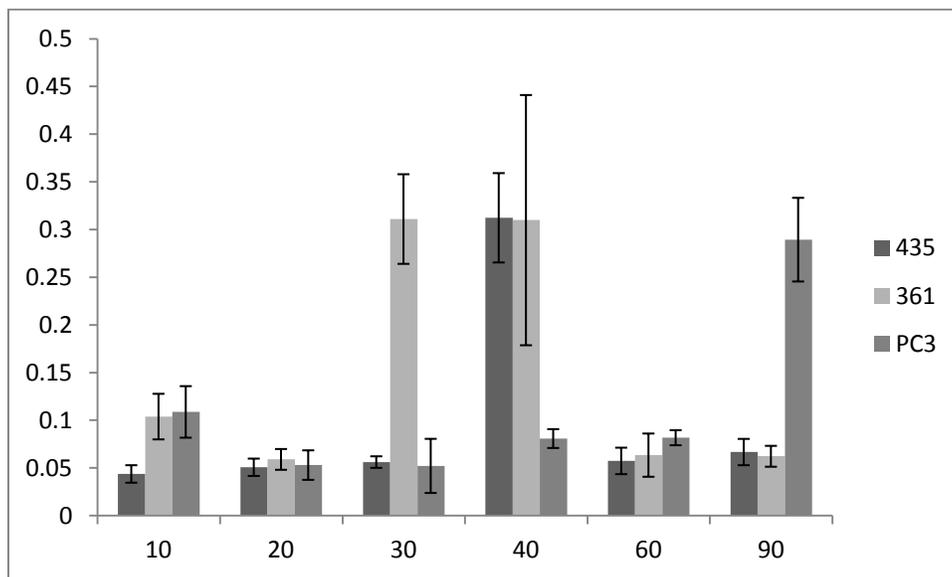
**Figura 36.** Estudio de unión a membrana del péptido  $^{111}\text{In-DOTA-MSP3}$  en las líneas celulares MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-361(+) y PC3(-). Las barras indican una Desviación Estándar.



**Figura 37.** Estudio de internalización del péptido  $^{111}\text{In-DOTA-MSP3}$  en las líneas celulares MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-361(+) y PC3(-) a distintos tiempos. Las barras indican una Desviación Estándar.



**Figura 38.** Estudio de unión a membrana del péptido  $^{111}\text{In-DOTA-MSP4}$  en las líneas celulares MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-361(+) y PC3(-). Las barras indican una Desviación Estándar.



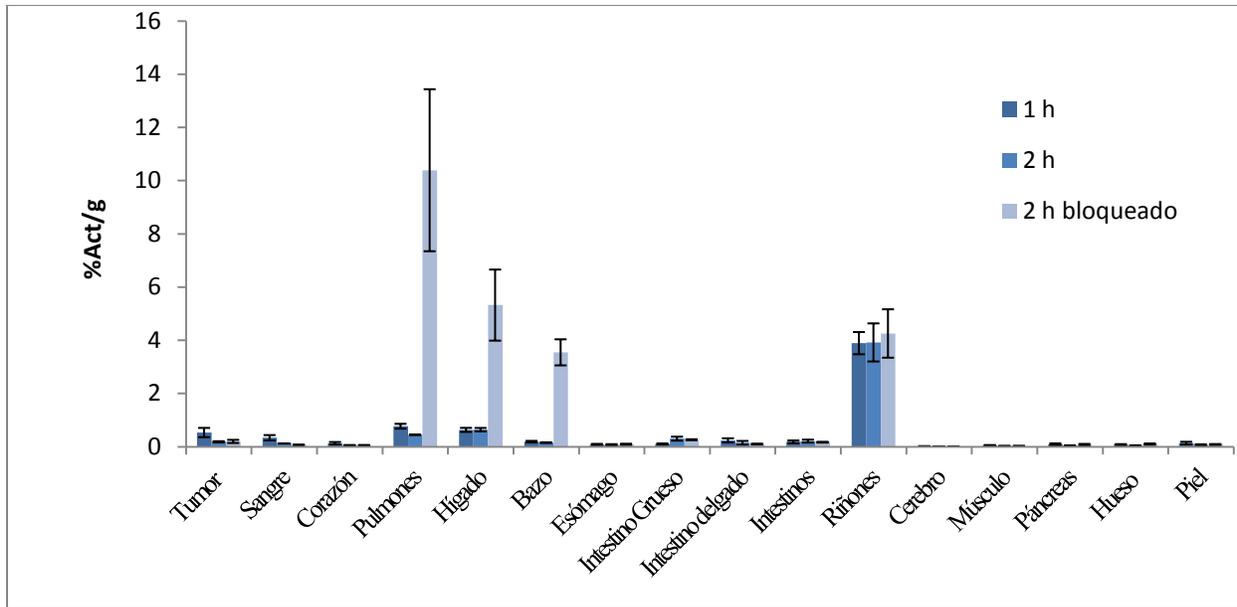
**Figura 39.** Estudio de internalización del péptido  $^{111}\text{In-DOTA-MSP4}$  en las líneas celulares MDA-MB-435 (+++), MDA-MB-361(+) y PC3(-) a distintos tiempos. Las barras indican una Desviación Estándar.

#### 4.7.5. Estudio de biodistribución de los péptidos marcados con $^{111}\text{In}$

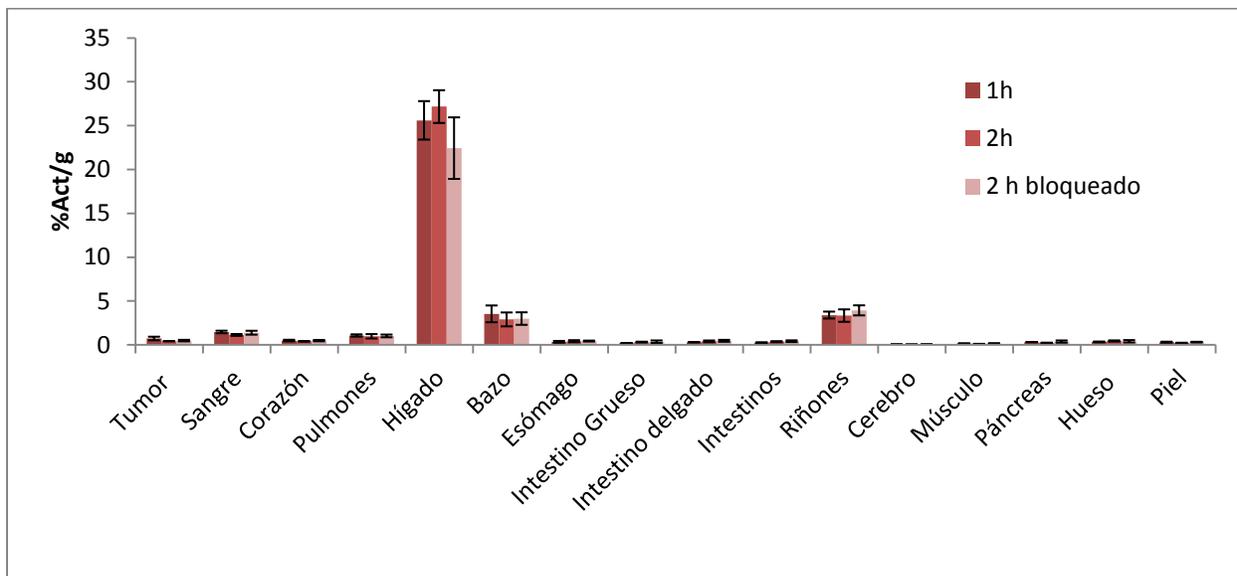
Se pudo apreciar un patrón de distribución diferente para ambos péptidos marcados, el radio-péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 presentó una alta captación hepática (figura 41) y a nivel de bazo, mientras que la principal vía de eliminación del radio-péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 es la renal. En este último se aprecia un leve aumento en la captación a nivel de riñones, pasando de  $(3.89\pm 0.42)$  a  $(4.25\pm 0.91)$  cuando los animales fueron bloqueados con un exceso (100 % (w/w)) de péptido frío; así como un aumento en la captación de un 83.1% y 23.60% a nivel hepático y de bazo respectivamente. Se destaca a su vez un claro aumento en la captación a nivel de pulmones pasando de  $(0.45\pm 0.005)$  a  $(10.39\pm 3.04)$  cuando los animales se encuentran bloqueados. La relación tumor músculo fue de 10.96 y la relación tumor/sangre de 1.58 al cabo de 1 h de biodistribución, manteniéndose los valores muy próximos pasado una hora.

Sin embargo el perfil de biodistribución del péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 a 2 h con o sin bloqueo no presenta grandes variaciones, manteniéndose la captación hepática en niveles similares  $(27.16\pm 1.86)$  y  $(22.4\pm 3.5)$  respectivamente. La captación tumoral presentó valores de  $(0.72\pm 0.20)$  a 1 h, descendiendo a  $(0.42\pm 0.01)$  al cabo de 2 h de biodistribución.

Cabe mencionar que la principal vía de eliminación tanto  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 como para  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 es la renal con un % Act total en orina de un  $(94.4\pm 1.3)$  y de un  $(53.8\pm 6.7)$  respectivamente, típica distribución de un péptido marcado con  $^{111}\text{In}$  (Kumar, et al.; 2007).



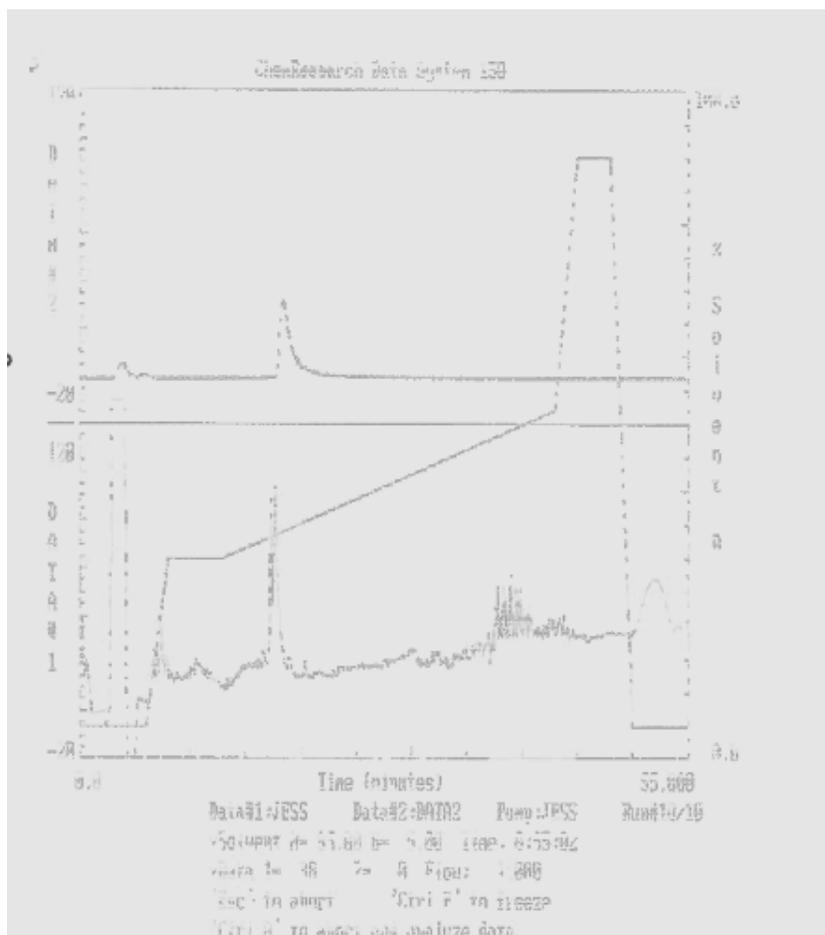
**Figura 40.** Estudio de biodistribución del péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 (n=4), en ratones SCID portadores de tumor de mama inducido con células MDA-MB-435 a 1 y 2 h post-inyección, así como a 2 h post-inyección con la co-inyección de péptido frío en un exceso de 100 veces respecto al péptido marcado. Los resultados se expresan en %A/g  $\pm$  DS.



**Figura 41.** Estudio de biodistribución del péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 (n=4), en ratones SCID portadores de tumor de mama inducido con células MDA-MB-435 a 1 y 2 horas post inyección, así como a dos horas post inyección con la co-inyección de péptido frío en un exceso de 100 veces respecto al péptido marcado. Los resultados se expresan en %A/g  $\pm$  DS.

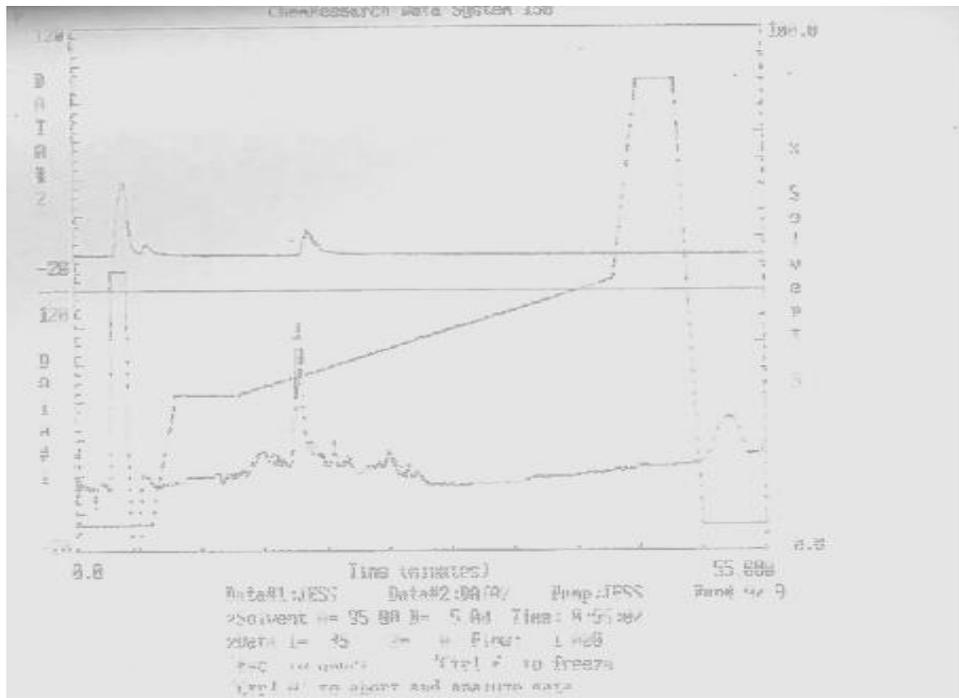
## 4.8. Obtención del complejo de $^{177}\text{Lu}$ con los péptidos MSP3 y MSP4

### 4.8.1. Marcación de los péptidos

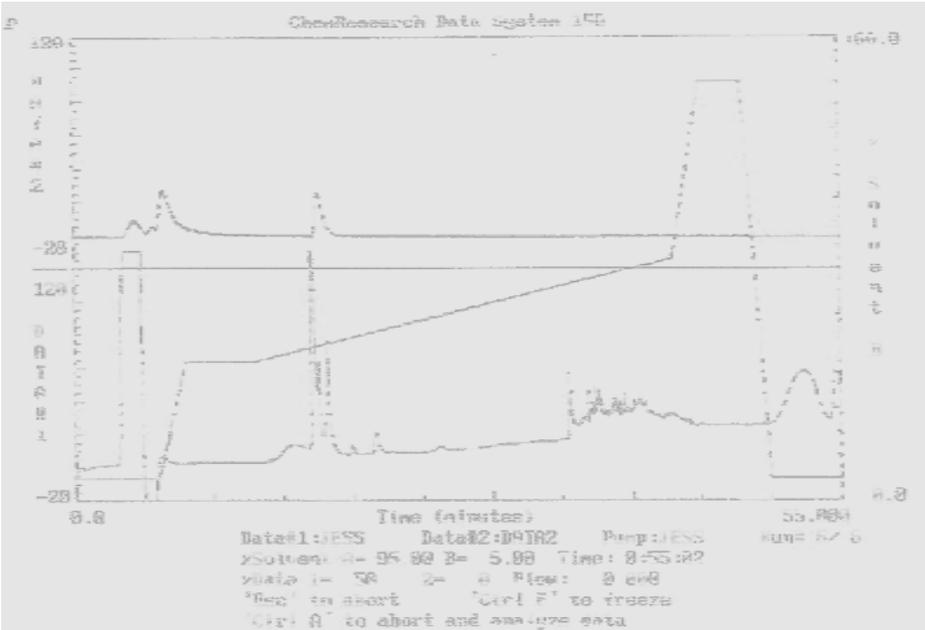


**Figura 42.** Estudio de marcación de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4. Se muestra el péptido marcado a 70 °C en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma.

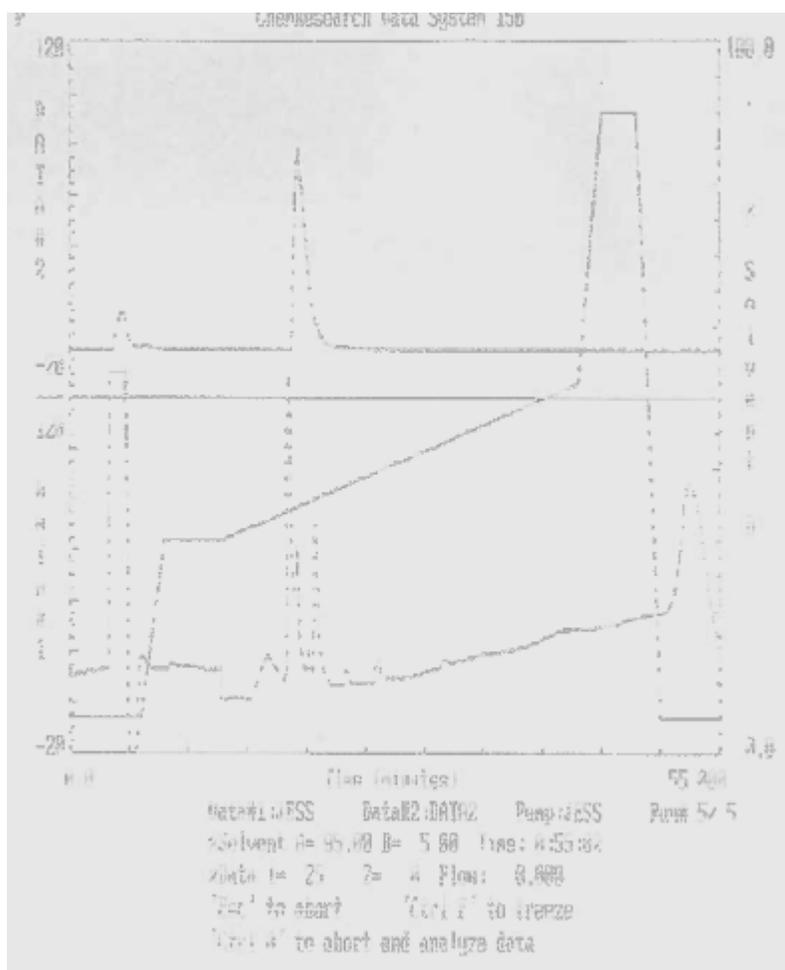
Los estudios con HPLC fueron conducidos para estudiar la estabilidad de los péptidos marcados con  $^{177}\text{Lu}$ , a temperaturas de 37, 50 y 70 °C a distintos tiempos, hasta 24 h post-marcación. Los péptidos marcados eluyeron a los mismos tiempos que el péptido nativo (frío) en todos los puntos estudiados. Sin embargo, la temperatura fue un factor crucial en la marcación, esto se puede constatar en las figuras 42, 43 y 44, donde se observa un aumento del radiopico que eluyó antes que los péptidos marcados a medida que descende la temperatura de marcación, correspondiendo este pico a  $^{177}\text{Lu}$  libre. El mismo comportamiento se observó para  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3.



**Figura 43.** Estudio de marcación de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4. Se muestra el péptido marcado a 50 °C en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma



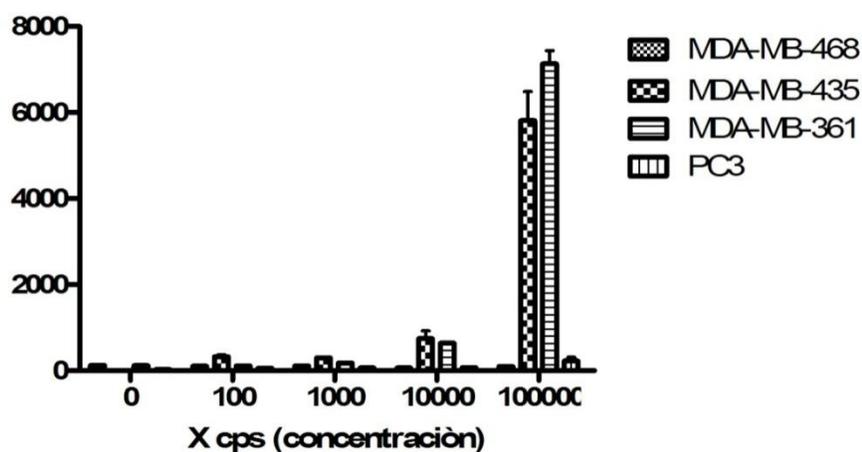
**Figura 44.** Estudio de marcación de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4. Se muestra el péptido marcado a 37 °C en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma



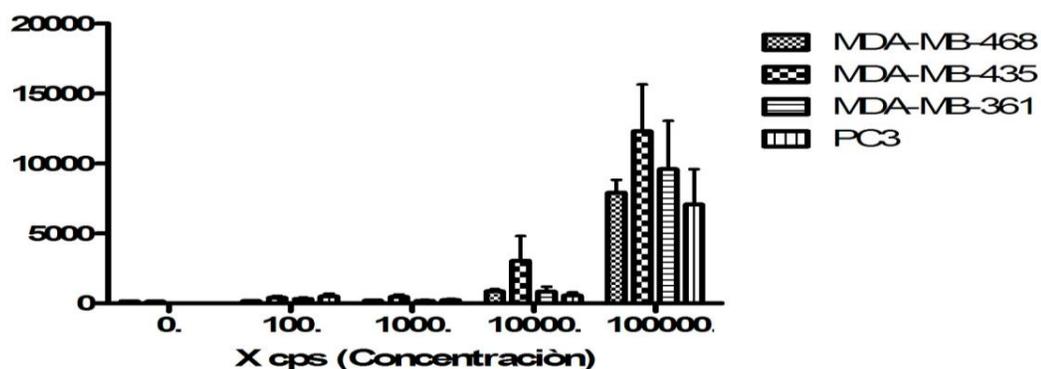
**Figura 45.** Estudio de marcación de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3. Se muestra el péptido marcado a 70 °C en solución de marcado. En la parte superior se muestra detección UV a 214 nm y en la parte inferior detección gamma

#### 4.9. Ensayo de unión a células de $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4

Como forma de evaluar la concentración óptima a utilizar con los péptidos marcados en las diferentes líneas celulares se realizó una curva de calibración utilizando diferentes líneas celulares que expresan en forma diferencial el receptor ErbB 3. De este estudio se obtuvo que la concentración óptima a utilizar de ambos péptidos fue la de 100000 cuentas por min, dado que fue donde se logró apreciar una diferencia en la unión por las distintas líneas celulares y se garantizó así una saturación de los lugares de unión (figuras 46 y 47).



**Figura 46.** Estudio de unión del péptido purificado por HPLC  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 en concentraciones ascendentes y su unión a 40 min a temperatura ambiente a las distintas líneas celulares. Las barras indican una Desviación Estándar

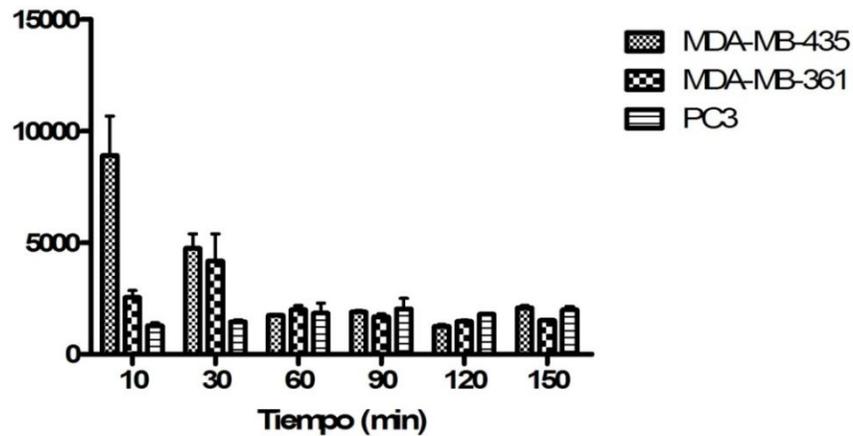


**Figura 47.** Estudio de unión del péptido purificado por HPLC  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 en concentraciones ascendentes y su unión a 40 min a temperatura ambiente a las distintas líneas celulares. Las barras indican una Desviación Estándar

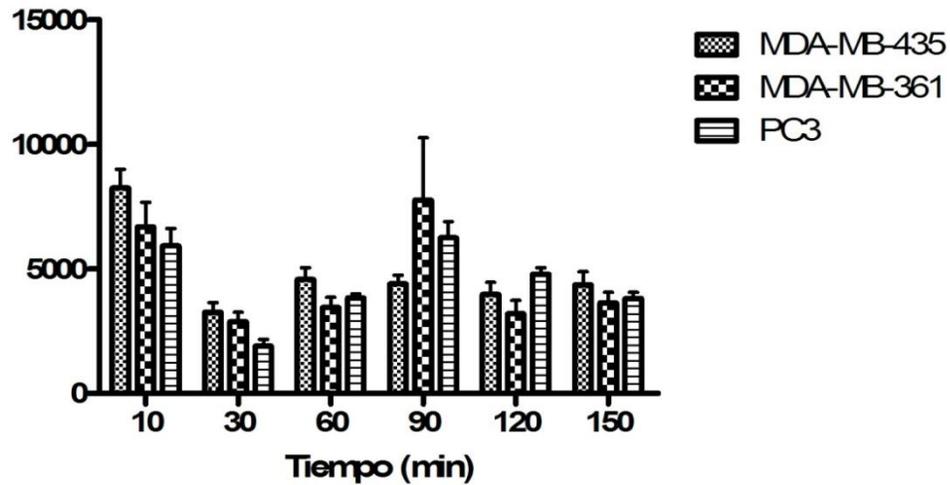
El péptido  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 mostró un mayor nivel de unión en la línea celular MDA-MB-435, pero sin embargo también presentó unión apreciable a la línea PC3 utilizada como control negativo, datos que señalaron una unión inespecífica mayor que el péptido  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3. EL radiopéptido MSP3 presenta un nivel de unión máximo a la línea celular MDA-MB-435 al cabo de 10 min (figura 48) disminuyendo en un 38% pasado 20 min, manteniendo valores

constantes de unión a lo largo de los tiempos estudiados. Pasados los 60 min los niveles de unión para las distintas líneas celulares estudiadas mostraron valores muy similares, pudiéndose atribuir a un nivel constante de péptido internalizado de manera no específica.

Con respecto al radiopéptido MSP4 (figura 49) se observó que pasados 30 min todas las líneas presentaron valores menores a las 5000 cuentas por min con excepción de la línea MDA-MB - 361 en donde exhibió un máximo a los 90 minutos. Estos niveles de unión son superiores que su par el péptido MSP3, demostrando de esta manera valores de unión inespecíficos mayores.



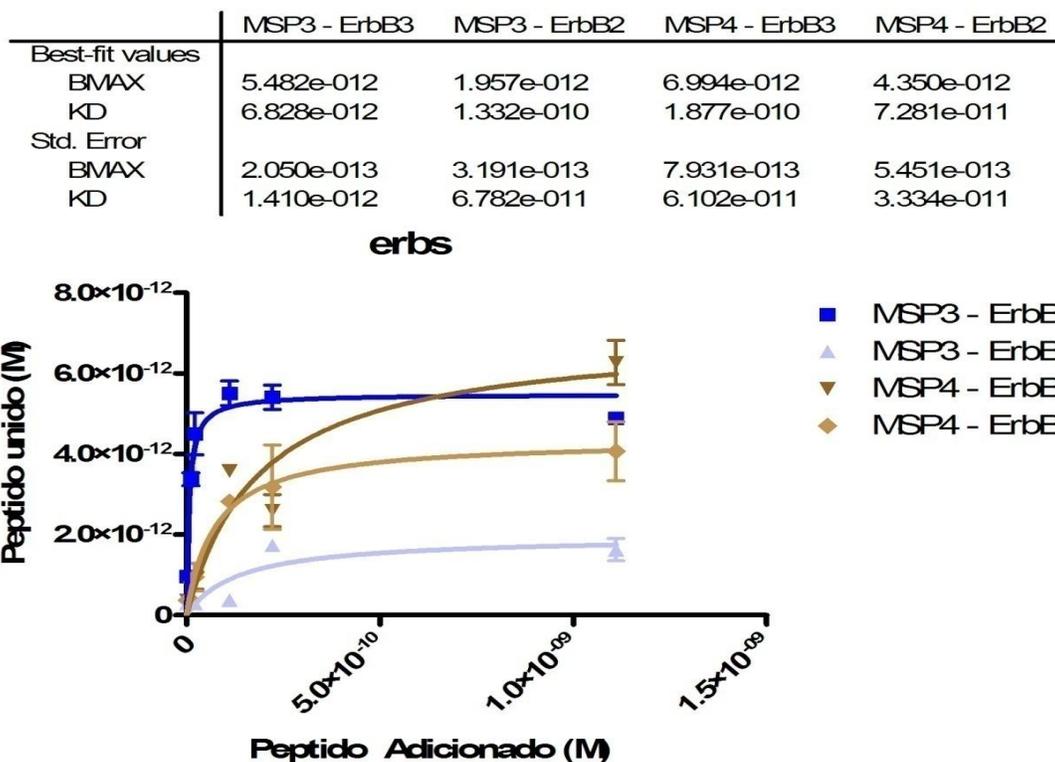
**Figura 48.** Estudio de unión del péptido purificado por HPLC  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y su unión a diferentes tiempos a 25 °C a las líneas celulares MDA-MB-435(+++), MDA-MB-361(++) y PC3(-).Las barras indican una Desviación Estándar



**Figura 49.** Estudio de unión del péptido purificado por HPLC  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 y su unión a diferentes tiempos a 25 °C a las líneas celulares MDA-MB-435(+++), MDA-MB-361(++) y PC3(-). Las barras indican una Desviación Estándar

#### 4.10. Ensayo de unión a los receptores ErbB2 y ErbB3

Los experimentos de unión a receptor fueron realizados en los receptores ErbB2 y ErbB3 de modo de evaluar si la conjugación a DOTA y posterior marcación cambia la cinética y fuerza de unión al receptor.



**Figura 50.** Estudio de unión de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 y  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 a la fracción extracelular de los receptores ErbB2 y ErbB3. Se muestra el cálculo de las constantes de unión Kd con su respectiva desviación estándar.

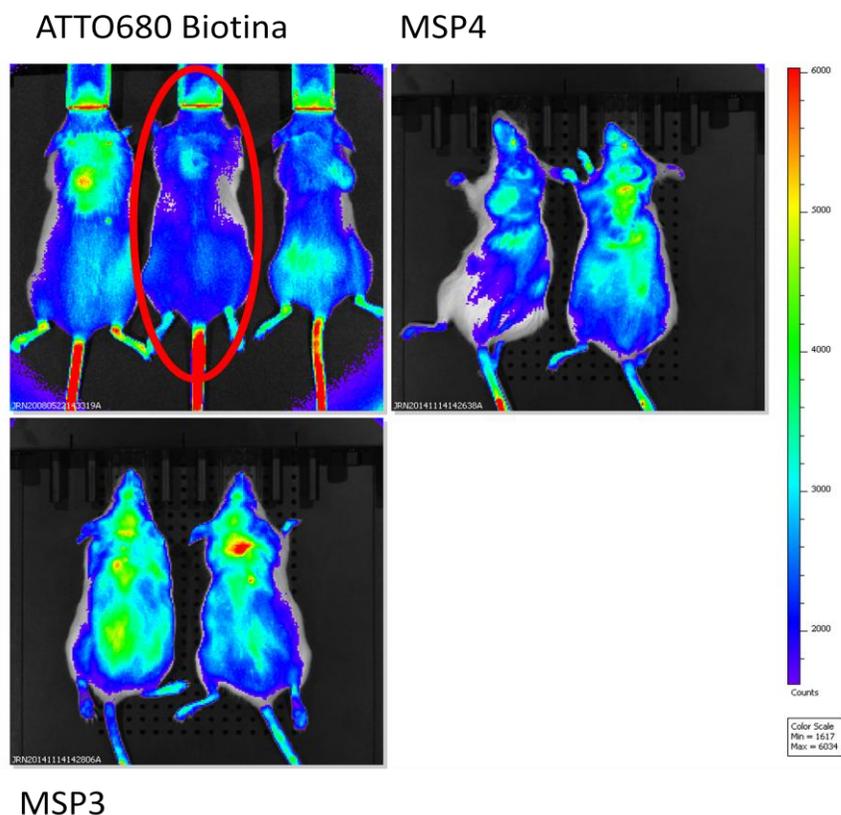
Fueron empleados para el cálculo de la constante de equilibrio de disociación (Kd) el programa Graph PAD Prism 4.0 utilizando la ecuación de Langmuir con un sitio de unión.

Como se observa en la figura 50, si bien ambos péptidos presentan niveles de unión de saturación en el mismo orden de magnitud ( $\times 10^{-12}$ ), Bmax, los valores de Kd para  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3 ( $6.8 \times 10^{-12}$ ) y para  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 ( $1.87 \times 10^{-10}$ ) difieren en dos órdenes de magnitud cuando se compararon con respecto a la unión por el receptor ErbB3. Esto confirma la mayor afinidad del péptido MSP3 por el mencionado receptor. Este comportamiento también fue evidencia por el hecho que el radiopéptido MSP4 presentó un orden mayor de valor de Kd cuando se unió al receptor ErbB3 que con respecto al receptor ErbB2, demostrando un cierto nivel de reacción cruzada. En el péptido MSP3 marcado con  $^{177}\text{Lu}$  sin embargo presenta dos órdenes de diferencia entre los valores de Kd de unión al receptor ErbB2 y ErbB3, presentando por tanto una mayor constante de asociación por este último.

#### **4.11. Obtención de imágenes ópticas en tres pasos.**

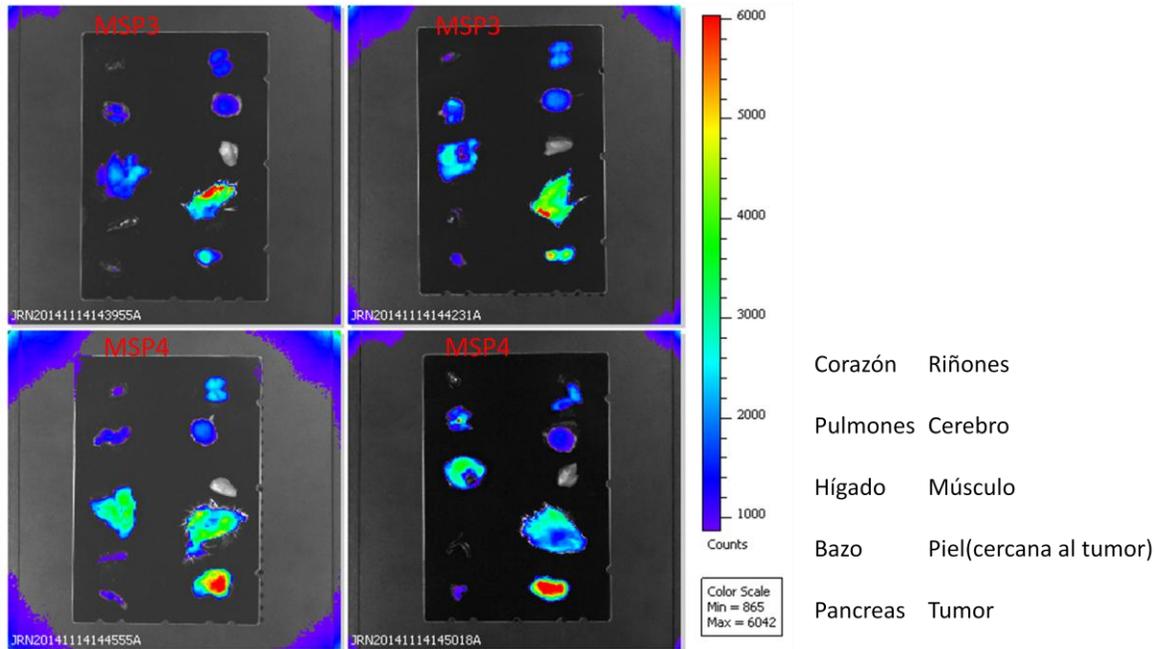
Para el estudio de biodistribución de los fagos empleando un sistema de imagen obtenido *in vivo* se estudió la capacidad de los fagos derivatizados con biotilina de unirse *in situ* al fluoróforo avidina-ATTO680 de modo obtener los fagos fluorescentes para la detectarlos mediante imágenes ópticas.

Para ello se realizó un proceso en tres pasos en donde se evaluó primero la capacidad de captación inespecífica por parte del fluoróforo avidina-ATTO680 de forma de determinar la concentración más adecuada para su uso. Por otra parte, se inocularon los fagos-biotilinizados a los ratones de modo que ocurriera la biosdistribución y posteriormente se inocularon la avidina y el fluoróforo. En la figura 51 se muestran las imágenes obtenidas en este proceso.

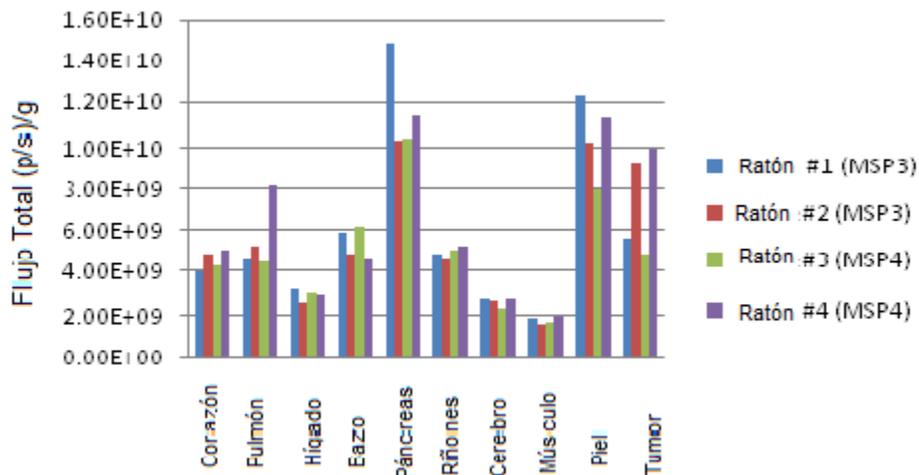


**Figura 51.** En el cuadrante superior izquierdo se observa la imagen IVIS de los ratones inoculados con avidina y al cabo de 24 h con concentraciones crecientes de biotina-ATTO 680, siendo la señalada la utilizada para los ensayos en tres pasos. En el cuadrante superior derecho los ratones son inoculados con el fago MSPC4 biotinilado y su imagen adquirida post-inyección de avidina y biotina-ATTO680. En el cuadrante inferior se muestran los ratones inoculados con el fago MSPC3 biotinilado y su imagen adquirida post-inyección de avidina y biotina-ATTO680.

Se optimizó primero la cantidad de biotina-ATTO680 a emplear, siendo 100  $\mu$ L (1 mg/mL) la utilizada para el resto de los estudios pues garantiza una unión apreciable a avidina y un buen nivel de adquisición por el sistema óptico utilizado, en suma los niveles de *background* (unión no específica a tejidos) son bajos.



**Figura 52.** Imagen IVIS *ex vivo* de los órganos y tejidos de interés de los ratones inoculados con los fagos biotinizados MSPC3 y MSPC4, al cabo de 4 h inoculados con avidina y a las 24 h con biotina-ATTO680.



**Figura 53.** Estudio de biodistribución del sistema en tres pasos fago3/4 anti-ErbB3-avidina-biotina ATTO680. Los resultados se muestran en porcentaje de fluorescencia total/g.

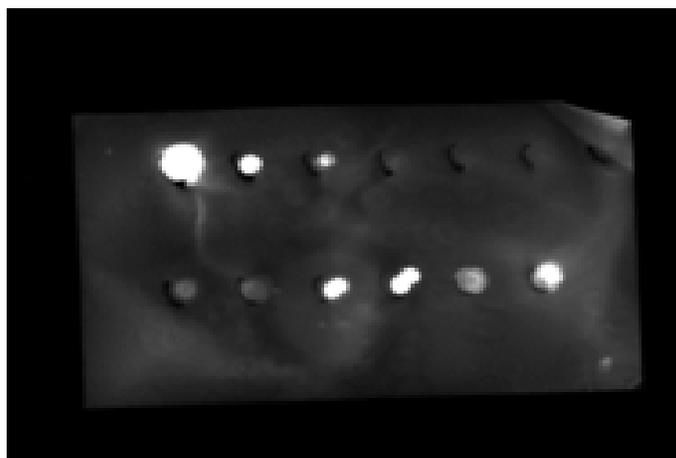
Ambos fagos MSPC3 y MSPC4 presentaron una captación apreciable a nivel tumoral (figura 51), datos que fueron confirmados con el posterior estudio de biodistribución y de imágenes *ex*

*vivo* (figura 52), donde se observó un nivel de captación tumoral superior a la captación en hígado y riñones principales vías de eliminación de la biotina marcada.

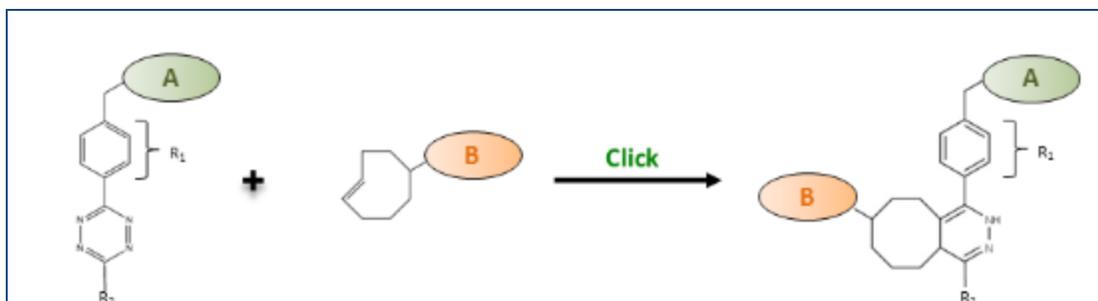
Cuando se compararon los valores de fluorescencia por gramos de tejido u órgano (figura 53) se apreció una relación tumor/músculo de 5 y tumor/hígado de 3.4 para el fago MSPC4. Los valores altos en piel pueden deberse a que ésta fue la zona peritumoral y por tanto la vasculatura pudo ser aberrante. Los niveles apreciables en corazón y páncreas podrían deberse a niveles en pool sanguíneo un tanto elevados, pudiéndose mejorar estos niveles con un tiempo de biodistribución mayor a 1 h.

#### 4.12. *Click chemistry in vitro*

Como forma de estudiar *in vitro* la capacidad de los fagos para unirse covalentemente a grupos reactivos que pueden unirse a especies fluoróforas o radiometales para desarrollar así especies marcadas que puedan trasladarse a usarse *in vivo*.



**Figura 54.** Ensayo de *Dot blot*, línea superior: dilución seriada de 1, 0.1, 0.01, 0.001,  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL de tetrazina-Cy5. Línea inferior Spot#1 = fago sin TCO ( $2 \mu\text{L}$  de  $1 \times 10^{14}$  V/mL), Spot#2 = fago sin TCO, Spot#3 = MSPC3-TCO ( $2 \mu\text{L}$  de  $1 \times 10^{13}$  V/mL), Spot#4 = MSPC3-TCO, Spot#5 = MSPC4-TCO ( $2 \mu\text{L}$  de  $1 \times 10^{13}$  V/ml) Spot#6 = MSPC4-TCO, incubados por 1 h con tetrazina-Cy5.



**Figura 55.** Esquema representando la reacción biortogonal entre TCO y tetrazina, donde **B** representa los fagos unidos a TCO y **A** el fluoróforo Cy5 con el cual esta derivatizada la molécula de tetrazina.

Como se muestra en la figura 54, en el ensayo *in vitro*, se comprueba que la reacción *click* es específica y no se presenta sobre los fagos que no poseen TCO (spot 1 y 2), en cambio la concentración empleada de fagos MSPC-3 y MSPC-4, ( $1 \times 10^{13}$  v/mL), es suficiente para obtener una señal, como así lo es la concentración de tetrazina-Cy5 empleada en el ensayo. El hecho de poder tener un sistema de reacción biortogonal entre el TCO y la tetrazina (figura 55), garantiza una excepcional cinética con una constante  $k$  mayor a  $800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Haun, et al.; 2011). Esta reacción biortogonal posee una gran selectividad y biocompatibilidad, dado que los reactivos complementarios pueden formar enlaces covalentes con los fagos y péptidos y/o anticuerpos, convirtiendo la reacción TCO-tetrazina en una poderosa herramienta de bioconjugación proteína-proteína. Es así que este ensayo verifica cualitativamente el potencial uso de la técnica de reacción *click* en un modelo *in vivo*, generando así una proyección y desafío de este trabajo, permitiendo su optimización para su empleo en un modelo *in vivo* similar al utilizado anteriormente con biotina-avidina, siendo la principal ventaja del sistema *click* su alta especificidad y cinética.

## 5. Discusión y Conclusiones

En esta tesis se muestran tanto la caracterización *in vitro* como *in vivo* de péptidos y fagos expresando péptidos en su cápside contra el receptor ErbB3.

La tecnología aquí presentada permite un rápido cribado a partir de grandes bibliotecas de fagos en una metodología clásica y funcional desde su descubrimiento como lo es la técnica de *phage display* (Azzazy, Highsmith; 2002).

La importancia de esta diana celular, en el cáncer de mama, radica en que la expresión de ErbB3 posee un valor pronóstico de la enfermedad, dado que altos niveles de este receptor está asociado con una sobrevida más corta en pacientes que sobreexpresan ErbB2 (Kronqvist, et al.; 2011). A su vez, ErbB3 juega un rol compensatorio en la señalización asociada a la resistencia al tratamiento en cáncer de mama en tumores que sobreexpresan ErbB2. Por ello el receptor ErbB3 puede ser considerado como un biomarcador predictivo en la eficacia de la terapia de cáncer de mama que sobreexpresen ErbB2. El desarrollo de agentes terapéuticos para este receptor ha demostrado ser una manera efectiva de evitar la resistencia a la terapia hormonal, quimioterapia y radioterapia. Por lo que la activación en la señalización de este receptor no sólo confiere resistencia a los fármacos en el tratamiento de cáncer sino que también promueve la metástasis tumoral (Katso, et al.; 2001). Por ello es de gran importancia monitorear la expresión de ErbB3 y diagnosticarlo *in vivo*, por eso sería deseable el desarrollo de una agente de imagen. Con este objetivo en mente es que se comenzó la selección contra la fracción extracelular del receptor ErbB3, con un población de fagos que en su superficie expresaban secuencias peptídicas aleatorias de 18 aminoácidos de longitud.

En las dos rondas de selección efectuadas, proceso conocido como *biopanning*, se encontraron cuatro clones con afinidad por el receptor, con los mencionados clones se hicieron estudios tanto en células con distintos niveles de expresión de ErbB3 (figura 9), estudios de microscopía (figura 12), así como ensayos de ELISA inmovilizando la porción extracelular del receptor contra el cual fueron seleccionados (figuras 8 y 10). De los ensayos se puede concluir que los dos clones con mayor reconocimiento son el MSPC-3 y MSPC-4, dado que son los que presentan menor unión no específica, mostrado en los bajos niveles de unión a la línea celular PC3 usada como control negativo tanto en el ensayo de unión a células (figura 9), como en la microscopía, así como una alto reconocimiento por las líneas MDA-MB-435 y MDA-MB-453 utilizadas como control positivo. En los ensayos de ELISA se observa que estos dos clones son los de mayor especificidad, dado que presentan baja unión a BSA y Gal3 (figura 11) y baja reacción cruzada dado la baja unión que presentan al receptor ErbB2 perteneciente a la misma familia (Hynes, Macdonalds; 2009).

Posteriormente se realizaron ensayos *in vivo* en ratones portadores de tumor de mama inducido con células MDA-MB-435 con los fagos marcados con el fluoróforo Dylight680. El tumor de mama así inducido es un buen modelo dado que se han realizado estudios con péptidos contra el

receptor ErbB2 perteneciente a la misma familia utilizando dicho modelo con éxito (Larimer, et al.; 2014). En suma los niveles de expresión del receptor ErbB3 en esta línea celular son adecuados para estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Xue, et al.; 2006).

El mencionado fluoróforo es óptimo para realizar imágenes IVIS dado que presentan una longitud de emisión en 715 nm, en el infrarrojo cercano donde la emisión intrínseca por los tejidos es baja, permitiendo así niveles de *background* adecuados en la adquisición de la imagen (Filfil, et al.; 2012).

Se observa una apreciable captación incluso a las dos horas de ambos clones de fagos derivatizados con el fluoróforo (figura13), mostrando una relación tumor/músculo de 5 y 4 para los clones MSPC4 y MSPC3 respectivamente, esto está de acuerdo con lo observado en la biodistribución posterior (a las 4 horas), de los animales (figura 14). Los niveles más altos en hígado se deben a que es la principal vía de eliminación de los fagos por el sistema retículo endotelial (RES) (Valadon, et al.; 2006).

Las secuencias peptídicas secuenciadas y sintetizadas posteriormente MSP3 (SVRDNAFLFSARSVG) y MSP4 (CAWCLVISPARAADG), correspondientes a los clones MSPC-3 y MSPC-4, derivatizados con biotina en su amino terminal se muestran en las figuras 15, 16 y 17. En el ensayo de ELISA (figura 15) contra la porción extracelular del receptor ErbB3 y ErbB2 se puede concluir que el péptido MSP3 mantiene la misma especificidad que cuando los péptidos se encontraban unidos a la cápside del fago, dado que presentan niveles de unión al receptor ErbB2 con la misma magnitud de la unión no específica (unión a la placa). También es de destacar que su unión al receptor ErbB3 es sensible a su conformación dado que presenta niveles de unión diferentes para el receptor viejo (aliquotado y mantenido en freezer por dos años) que al receptor nuevo. Por otra parte el péptido MSP4 presenta una unión apreciable al receptor ErbB3 pero también al receptor ErbB2, siendo esto un signo de una especificidad menor comparada a la del péptido MSP3.

En los estudios de FAC Scan (figuras 16 y 17) se puede observar que con una concentración 50  $\mu$ M en ambos péptidos biotinilados, para el MSP3 se llega a saturación en las distintas líneas celulares estudiadas (se observa un *plateau*) mientras que para el MSP4 no es alcanzada en las líneas celulares con mayor nivel de expresión del receptor ErbB3 (MDA-MB-435 y MDA-MD-231). En la figura 17 se puede observar claramente que el péptido MSP3 sigue la tendencia de

unión de acuerdo al nivel de expresión del receptor ErbB3 en las líneas celulares estudiadas, presentando bajos niveles (MDA-MB-361), niveles intermedios (A431 y SKBR3) y niveles altos (MDA-MB-435, MDA-MB-453 y MDA-MD-231). Para el péptido MSP4 se observa la misma tendencia que para MSP3.

También se sintetizó el péptido MSP4 derivatizado con HYNIC a través de un espaciador GAC, el agente bifuncional permite la marcación con metales como ser el caso del  $^{99m}\text{Tc}$ , para completar la esfera de coordinación al radiometal se empleó el coligando tricina, descrito en la literatura como el coligando con mayor estabilidad a la hora de formar compuestos de coordinación con el  $^{99m}\text{Tc}$ .

La marcación se produjo a una temperatura de 50 °C en 30 min, temperatura y tiempos adecuados pensando en una posible traslación a nivel clínico, dado que se logró optimizar la marcación y la cantidad de tricina y  $\text{SnCl}_2$ , permitiendo una formulación tipo kit. También se logró un gradiente de HPLC adecuado como para discriminar las posibles impurezas.

En los estudios de estabilidad luego de purificar por HPLC en ausencia o presencia de tricina (figura 19), se observa que la reconstitución en PBS con tricina mantiene la pureza radioquímica estable para los tiempos estudiados, mientras que en ausencia de tricina ésta baja, ello puede ser un indicador que la tricina que forma parte de la esfera de coordinación del  $^{99m}\text{Tc}$ , sean intercambiables con las tricinas presentes en el medio, y por ellos una adición de ésta a la solución luego de la purificación provoque una mayor estabilidad del complejo. Un comportamiento similar es observado cuando se practica la transquelación con cisteína, mostrando una mayor estabilidad cuando se agrega al medio tricina que en su ausencia. Para realizar la transquelación se practicó a 37 °C, para tratar de emular una posible interacción con las proteínas plasmáticas en condiciones fisiológicas, el aminoácido de elección fue la cisteína dado que el  $^{99m}\text{Tc}$  está coordinando a HYNIC a través de pares libres de electrones sobre el nitrógeno (Abrams, et al.; 1990), por tanto se opta por condiciones similares de dureza/ blandura según la teoría de Pearson.

Cuando se estudió la estabilidad del complejo frente a suero fetal bovino (figura 22), se observó que el mismo es estable para todos los tiempos estudiados (hasta 4 horas), presentando una unión a proteínas cercano al 8%, lo cual es una medida de su buena disponibilidad una vez inyectado *in bolo*.

Del estudio de metabolización *in vitro* (figura 25), se observa que la principal vía de metabolización es la microsomal, biotransformación asociado a la citocromo p450, siendo ésta la ruta más utilizada en el metabolismo de fármacos (Gardiner, Begg; 2006).

Cuando se estudia la unión a distintas líneas celulares, se observa un cierto grado de retención (figuras 28 y 29) en la línea con mayor nivel de expresión del receptor ErbB3 (MDA-MB-435), mientras que los niveles de unión son bajos cuando se compara a la línea PC3 utilizada como control negativo, esto demuestra un cierto grado de especificidad del péptido  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 por el receptor ErbB3. Cuando se realiza el bloqueo con un exceso del péptido frío sobre el marcado se observa (figura 26), un apreciable descenso en la unión del péptido a la membrana, siendo por tanto este un argumento más a que la unión del radiopéptido es específica por el receptor ErbB3.

Posteriormente, se realizaron estudios de biodistribución en ratones normales Balb/c a distintos tiempos para evaluar la farmacocinética del péptido marcado. Como se aprecia en las figuras 30 y 31, el complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 presenta un alto *clearance* denotado por la alta depuración sanguínea inclusive a tiempos de 30 min, típica biodistribución de un péptido marcado (Decristoforo, Mather; 1999). La estabilidad *in vivo* del complejo se evidenciada por la baja captación a nivel de tiroides y de estómago siendo éstos los sitios de captación de pretecnecio libre. El péptido no presenta captación inespecífica en riñones (figura 31), pero si presenta una apreciable captación a nivel hepático, lo cual no es coherente con el valor de log P obtenido de -0.8233, lo que lo cataloga como un péptido hidrofílico. Es de destacar una anormal captación a nivel pulmonar a la hora de biosdistribución, bajando a niveles inferiores pasado este tiempo.

Cuando se realiza la imagen SPECT (figura 33) a 2 horas post inyección del  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 y posterior biodistribución (figura 32) en ratones SCID portadores de tumor de mama (inducido por células MDA-MB-435), se puede apreciar la misma anomalía (aumento de actividad en pulmones), cuando se bloquea con el péptido frío. Esto puede dar lugar a dos posibles hipótesis, la primera es que tenga cierto nivel de expresión en pulmones el receptor ErbB3 y el péptido se une a él cuando es desplazado del tumor por el péptido frío. En bibliografía (Engelman, et al.; 2007) se encuentra que en cáncer de pulmón el receptor se encuentra expresado y activando la vía de PI3K/Akt. Una segunda hipótesis es que el péptido se encuentre agregado en el proceso de purga con nitrógeno (para retirar el acetonitrilo) y posterior

reconstitución en PBS, dado que en el perfil de HPLC de la marcación no se observa un corrimiento en los tiempos de retención típicos de un agregado. Esta segunda hipótesis es más plausible, pues en los ratones normales se observa que la unión en pulmones no es específica dado que pasada la hora los niveles bajan notoriamente, y cuando se realiza el bloqueo en los ratones SCID al aumentar la cantidad de péptido, por el agregado del péptido frío, se podría dar una mayor agregación y por tanto captación a nivel de pulmón e hígado. Los posibles agregados retenidos en el pulmón pueden deberse a la presencia de macrófagos presentes en los capilares sanguíneos (Kijanka, et al.; 2014). Lo indiscutible de la imagen SPECT es que el complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina/HYNIC-MSP4 no presentó captación a nivel tumoral, por tanto no llegó a darse un reconocimiento del complejo por el receptor ErbB3, pudiendo esto deberse a un cambio conformacional en la secuencia de reconocimiento, que no se debe a la presencia de HYNIC, ni a la marcación dado que si presenta niveles de reconocimiento a nivel *in vitro*; o bien que el complejo no presenta una biodistribución adecuada que permita la llegada del péptido a nivel tumoral.

Como la marcación a través de HYNIC y con  $^{99m}\text{Tc}$  no fue del todo exitosa se realizó la marcación con  $^{111}\text{In}$  a través del agente quelante DOTA de ambos péptidos, MSP3 y MSP4. Se logró una marcación estable y un sistema cromatográfico en fase líquida (HPLC) capaz de discriminar las posibles impurezas radioquímicas ( $^{111}\text{In}$  libre) y el péptido no marcado (frío), del marcado para ambos péptidos MSP3 y MSP4. Los marcados fueron estables por 24 h y presentaron baja unión a proteínas de suero murino (tabla 1).

En los estudios de unión a células es de destacar que el péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 presenta una cinética de unión diferente a la del péptido  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4, propiedad denotada por los distintos niveles de internalización que muestran ambos péptidos para los mismos tiempos estudiados (figuras 37 y 39). Los resultados arrojan que la mayoría de la unión celular se da en la membrana, y dado que la tasa de internalización es lenta, en el entorno de 5 h (Malgorzata, et al.; 2012), esto puede afectar la unión ya que una vez alcanzada la saturación no habrán más receptores disponibles capaces de interactuar con los radiopéptidos debido a la recirculación lenta.

Si bien en la biodistribución de  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 y de  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP4 presenta (figuras 40 y 41) una alta eliminación por vía urinaria, el radiopéptido MSP4 presenta una biodistribución muy similar a la que presentaba cuando era marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  a través de HYNIC, con

captación a nivel de hígado y bazo y una baja unión al receptor ErbB3 a nivel tumoral, presentando relaciones tumor/músculo=5.05 y tumor/sangre=0.49 a una hora post-inyección. El radiopéptido MSP3 presenta un patrón de biodistribución distinto cuando se realizan los ensayos con y sin bloqueo, en este último con un aumento en la captación de un 831 % y 2360 % a nivel hepático y de bazo respectivamente. Estos datos pueden ser explicados bajo la hipótesis de que el péptido se esté agregando. La relación tumor músculo es de 10.96 y la relación tumor/sangre de 1.58 al cabo de 1 h de biodistribución, manteniéndose los valores muy próximos a las 2 horas de biodistribución. Si bien hay una captación a nivel tumoral, es notorio que la biodistribución del  $^{111}\text{In}$ -DOTA-MSP3 no es la óptima, esperándose encontrar mejores relaciones tumor/sangre y tumor/músculo. En suma, es deseable que las células tumorales sean capaces de internalizar el radioligando, favoreciendo así su aplicación como agente de imagen molecular, dado que así contribuiría a un tiempo mayor de retención en los tumores. Dado la baja tasa de re-utilización (internalización y posterior externalización en la membrana), que presenta el receptor ErbB3 hace de éste un desafío importante a la hora de obtención de un agente de imagen.

Por otra parte, como las mejores eficiencias de marcación para  $^{111}\text{In}$ , se dieron a temperaturas cercanas a los 80 °C, y ello puede estar influyendo en la posterior agregación de los péptidos, se realizó la marcación de DOTA-MSP3 y DOTA-MSP4 a 70 °C, 50 °C y 37 °C con  $^{177}\text{Lu}$ . Se optó para realizar los posteriores estudios de unión a células por trabajar con DOTA-MSP3 a 70 °C y con DOTA-MSP4 a 50 °C, dado que a las mencionadas temperaturas se logró una buena marcación estable inclusive a 24 h. En los ensayos de unión a células la concentración óptima de radiopéptido a emplear fue la de 100000 cuentas por min, dado que es donde se logra apreciar una diferencia en la unión por las distintas líneas celulares y se garantiza una saturación de los lugares de unión. El péptido  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP4 muestra un mayor nivel de unión en la línea celular MDA-MB-435, pero sin embargo también presenta unión apreciable a la línea celular PC3 utilizada como control negativo, datos que señalan una unión inespecífica mayor que el péptido  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MSP3. Los niveles bajos de internalización para ambos péptidos marcados con  $^{177}\text{Lu}$ , están de acuerdo con lo descrito en bibliografía (Malgorzata, et al.; 2012), dado que el receptor presenta una tasa de internalización lenta en un proceso de endocitosis dependiente de clatrina e inclusive independiente de unión a ligando y de la fosforilación del receptor ErbB3. Sin embargo muchas estrategias de inhibición de receptores con fármacos antitumorales, como en el caso de ErbB2 y el anticuerpo humanizado trastuzumab (Rubin, Yarden; 2001), la

estrategia de acción empleada es impedir la recirculación del receptor por medio de su unión con un péptido o anticuerpo, pero como en el caso de este receptor su acción pro carcinogénica no está ligada a su activación por unión al ligando, hacen de esta última estrategia infructuosa, debiéndose desarrollar un agente terapéutico para el dímero ErbB2-ErbB3 en conjunto.

Los experimentos de unión a receptor fueron realizados en los receptores ErbB2 y ErbB3 de modo de evaluar si la conjugación a DOTA y posterior marcación cambia la cinética y fuerza de unión al receptor. Como se muestra en la figura 50, el radiopéptido MSP4 presenta un orden mayor de valor de Kd cuando se une al receptor ErbB3 que con respecto al receptor ErbB2, demostrando un cierto nivel de reacción cruzada. En el péptido MSP3 marcado con  $^{177}\text{Lu}$  sin embargo presenta dos órdenes de diferencia entre los valores de Kd de unión al receptor ErbB2 y ErbB3, presentando por tanto una mayor constante de asociación por este último. Los valores de Kd en el orden de pico molar son indicadores de la muy buena afinidad del péptido MSP3 por el receptor ErbB3, por tanto, estos datos alientan a continuar la investigación y realizar estudios *in vivo* con el péptido MSP3 marcado con  $^{177}\text{Lu}$ .

Finalmente se procedió a estudiar la biodistribución del sistema en tres pasos de los fagos biotinilados MSPC-3 y MSPC-4 anti-ErbB3-avidina-biotina ATTO680. Como se observa en la figura 51, ambos fagos MSPC-3 y MSPC-4 presentan una captación apreciable a nivel tumoral, observándose una relación tumor/músculo de 5 y tumor/hígado de 3.4 para el clon MSPC-4. Como se observa en la figura 53, los diferentes niveles de captación a nivel tumoral para cada uno de los fagos, puede deberse a que los tumores presentaba diferente tamaño tumoral, siendo esto un indicador de que el tamaño, y por ende el nivel de irrigación y fenestración a nivel del endotelio vascular tumoral, son importantes a la hora de conseguir una alta efectividad cuando se trabaja en sistemas donde la unión es dependiente de que tanto la avidina como la biotina estén en contacto.

Si bien la relación tumor/músculo no presentan una apreciable mejoría respecto a la marcación directa de los fagos con Dylight 680, comparado al sistema en tres pasos con la biotina marcada con un fluoróforo que emite en la misma longitud de onda (ATTO680); si se observa una mejor biodistribución dado que los niveles en hígado disminuyen apreciablemente, siendo esto muy importante si se piensa en una metástasis tumoral a nivel abdominal. La única desventaja que presenta este método es que el sistema avidina-biotina es inmunogénico, no debiéndose realizar dosis sucesivas, sin embargo, hay estudios en bibliografía de proteínas modificadas con avidina

con similar afinidad por la biotina y disminución considerable de la inmunogenisidad en conejos (Meyer, et al.; 2001), logrando realizar repetidas dosis, pudiéndose por tanto pensar en un traslación del sistema aquí estudiado a estudios clínicos.

Como proyecciones de esta tesis se podría pensar en la evaluación del péptido MSP3 en forma cíclica de manera de que adopte una conformación fija y estudiar si mantiene el reconocimiento por el receptor ErbB3. De esta manera se puede evitar la posible degradación *in vivo* y la eventual pérdida de reconocimiento del receptor.

Otra forma de mejorar la biodistribución de los péptidos DOTA-MSP3 y DOTA-MSP4 es pensar en la marcación de ambos a través de la tecnología de microondas a temperatura controlada, de forma de lograr una menor exposición a temperaturas elevadas y evaluar si éste procedimiento cambia la biodistribución.

Tanto el péptido MSP3 como MSP4 poseen ambos una secuencia de 18 aminoácidos, y ambos no presentan una secuencia consenso, se podría realizar un estudio de *docking* o anclaje molecular, para evaluar frente a la fracción extracelular del receptor ErbB3, la interacción proteína-proteína y determinar la estructura molecular de los complejos formados. Por tanto determinar cuales son los aminoácidos fundamentales en la interacción y en que posición dentro de la secuencia se encuentran. De esta manera se podría desarrollar una nueva entidad peptídica más corta que posea una menor captación a nivel hepático.

A nivel de los fagos, se podría pensar en un sistema de *click chemistry* sobre los fagos con la otra fracción del sistema marcado con un fluoróforo o átomo radiactivo, la principal ventaja de este sistema frente a los péptidos es que en la cápside del fago, junto a la proteína VIII, se puede expresar un gran número de péptidos, permitiendo así una mayor avidéz y también una multiplicidad de la señal en el sistema.

Como conclusión se puede aseverar que en esta tesis se seleccionaron y desarrollaron dos fagos y dos péptidos anti-ErbB3 respectivamente. Se investigó la marcación y caracterización de los distintos péptidos y fagos, permitiendo imágenes SPECT e imágenes con sistemas ópticos. Se desarrollaron tres sistemas de marcación a través de sistemas bifuncionales como lo son el DOTA y el HYNIC, obteniéndose para todos los complejos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{177}\text{Lu}$ , pureza radioquímica adecuada y estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, así como mantener la selectividad y afinidad por el receptor a nivel *in vitro*. Los sistemas desarrollados en base a los fagos MSPC-4 y MSPC-3, demostraron tener captación selectiva por el modelo tumoral

utilizado. Constituyéndose así en potenciales candidatos a radiofármacos para la detección de tumor de mama a través de imagenología molecular óptica o SPECT.

## 6. Bibliografía

Abrams M.J., Juweid M., Tenkate C.I., Schwartz D.A., Hauser M., Gaul F.E., Fuccello A.J., Rubin R.H., Strauss H.W. and Fischman A.J.; 1990. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med.*; 31: 2022–2028.

American Cancer Society ([www.cancer.org](http://www.cancer.org))

American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. Atlanta: American Cancer Society, Inc. Atlanta, EEUU.

Agris P.F., Marchbank M.T., Newman W., Guenther R., Ingram P., Swallow J., Mucha P., Szyk A., Rekowski P., Peletskaya E. and Deutscher S.L.; 1999. *J Prot Chem.* 18:425–435.

Amin DN, Campbell MR, Moasser MM; 2010. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*, 21:944–950.

Atwell S. and Wells J.A.;1999. *Proc Nat Acad Sci. USA*; 96:9497–9502.

Azzazy, H.M. and Highsmith, W.E.Jr ; 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem.*; 35:425-445.

Bartholoma M.D, Louie AS, Valliant J.F., and Zubieta J.; 2010. Technetium and gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. *Chem Rev.* 110:2903–2920.

Beneficial Uses and Production of Radioisotopes, 2004 Update. NEA/IAEA Joint Publication. OECD 2005.

Boiani M., Merlino A., Gerpe A., Porcal W., Croce F., Depaula S., Rodríguez M.A., Cerecetto H., González M.; 2009. o-Nitroanilines as major metabolic products of anti-Trypanosoma cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans in microsomal and cytosolic fractions of rat hepatocytes and in whole parasitic cells. *Xenobiotica*, 39(3):236-248.

Cai Z., Zhang G., Zhou Z., Bembas K, Drebin JA, Greene MI, Zhang H. ; 2008. Differential binding patterns of monoclonal antibody 2C4 to the ErbB3-185her2/neu and the EGFR-p185her2/neu complexes. *Oncogene*, 27:3870-3874.

Campbell M.R., Amin D. and Moasser M.M.; 2010. HER3 Comes of Age: New insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin Cancer Res*;16: 1373-1383.

Castagnoli L., Zucconi A., Quondam M., Rossi M, Vaccaro P, Panni S, Paoluzi S, Santonico E, Dente L, Cesareni G.; 2001. Alternative bacteriophage display systems. *Comb Chem High Throughput Screen*; 4: 121-133.

Cabilly S.; 1999. The Basic Structure of Filamentous Phage and its Use in the Display of Combinatorial Peptide Libraries. *Molecular Biotechnology*; 2:143-148.

Chan C., Scollard D.A., McLarty K., Smith S., and Reilly R.M.; 2011. A comparison of <sup>111</sup>In- or <sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab Fab fragments for imaging subcutaneous HER2-positive tumor xenografts in athymic mice using microSPECT/CT or microPET/CT. *EJNMMI Res.*;1(1):15 doi: 10.1186/2191-219X-1-15.

Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer ([www.comisioncancer.org.uy](http://www.comisioncancer.org.uy)).

Decristoforo C. and Mather S.J.; 1999. <sup>99m</sup>Tc-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl Med Biol.*; 26(4):389-96.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG); 2006. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*; 366(9503):2087-2106, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67887-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67887-7).

Engelman J.A., Zejnullahu K., Mitsudomi T., Song Y., Hyland C., Park J.O., Lindeman N., Gale C.M., Zhao X., Christensen J., Kosaka T., Holmes A.J., Rogers A.M., Cappuzzo F., Mok T., Lee C., Johnson B.E., Cantley L.C., Jänne P.A.; 2007. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316(5827):1039-1043.

Filfil R., Paul-Roc B., Cantin C., Iqbal U., Tolkatchev D., Vinogradova A., Xu P., Ni F., O'Connor-McCourt M.D. and Lenferink A.E.G; 2012. Molecular imaging of breast tumors using a near-infrared fluorescently labeled clusterin binding peptide. *Int J Cancer*; 131(5): E681-E692.

Gardiner S.J. and Begg E.J; 2006. Pharmacogenetics, Drug-Metabolizing Enzymes, and Clinical Practice. *Pharmacol Rev.*; 58(3):521-590.

Giltmane, J. M., Moeder, C. B., Camp, R. L., and Rimm, D. L.; 2009. Quantitative multiplexed analysis of ErbB family coexpression for primary breast cancer prognosis in a large retrospective cohort. *Cancer* 115, 2400-2409.

Glucksman M.J., Bhattacharjee S., and Makowski L.; 1992. Three-dimensional structure of a cloning vector, X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution. *J Mol Biol.*; 226:455-470.

Hanahad D and Weinberg RA; 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 10:57-70.

- Hayashi, M., Inokuchi, M., Takagi, Y., Yamada, H., Kojima, K., Kumagai, J., et al.; 2008. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 14, 7843–7849.
- Haubner R. and Wester, H. J.; 2004. *Curr Pharm Des.*; 10:1439-1455.
- Haun J.B., Devaraj N.K, Marinelli B.S., Lee H., and Weissleder R.; 2011. Probing Intracellular Biomarkers and Mediators of Cell Activation Using Nanosensors and Bioorthogonal Chemistry. *ACS Nano*. 26; 5(4): 3204–3213.
- Holbro T., Beerli R.R., Maurer F., Koziczak M., Barbas C.F. III, Hynes N.E.; 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 100:8933-8938.
- Holliger P., Hudson P.J.; 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 23(9):1126-1136.
- Hynes NE, Lane HA; 2005. ErBB receptors and cáncer: the complexity on target inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 5: 341-354.
- Hynes NE and Macdonalds G; 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cáncer. *Curr Opin Cell Biol*; 21:177-184.
- Hsieh AC and Moasser MM; 2007. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of non-target HER3. *Br J Cancer*; 97:453-457.
- International Atomic Energy Agency, Vienna; 2006. Nuclear Technology Review 2006, IAEA. Viena, Austria.
- Jiang T., Olson E.S., Nguyen Q.T., Roy M, Jennings PA, Tsien RY.; 2004. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*; 101(17):867–872.
- Johnson D.L., Farrell F.X., Barbone F.P., McMahon F.J., Tullai J., Hoey K., Livnah O., Wrighton N.C., Middleton S.A., Loughney D.A., Stura E.A., Dower W.J., Mulcahy L.S., Wilson I.A. and Jolliffe L.K.; 1998. *Biochem.*; 37:3699–3710.
- Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J., Waterfield M.D.; 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:615–675.
- Kemp P., Garcia L.R. and Molineux I.J.; 2005, *Virology* 340:307-317.

Kenneth Pienta J; 2009. Cancer as disease: types of tumor, their frequencies, and their progression. En: The biology and treatment of Cancer: Understanding Cancer. Wiley – Blackwell. Part II, 23. First Edition, New Jersey, EEUU.

Kijanka G., Prokopowicz M., Schellekens H, and Brinks V; 2014. Influence of Aggregation and Route of Injection on the Biodistribution of Mouse Serum Albumin. PLoS One; 9(1): e85281.

Kronqvist N., Malm M., Gostring L., Gunneriusson E., Nilsson M., Guthenberg I.H., Gedda L., Frejd F.Y., Stahl S. and Lofblom J.; 2011. Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3-specific Affibody molecules. Protein Eng Des Sel; 24:385-396.

Kumar S.R., Quinn T.P., and Deutscher S.L.; 2007. Evaluation of an  $^{111}\text{In}$ -radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for ErbB-2 receptor expressing Breast Carcinomas. Clin Cancer Res, 13(20):6070-6079.

Ladner R.C., Sato A.K., Gorzelany, J. and de Souza, M.; 2004. Drug Discov Today; 9: 525–529.

Lahiri S., Maiti M., Ghosh K.; 2013. Production and separation of  $^{111}\text{In}$ : an important radionuclide in life sciences: a mini review. J Radioanal Nucl Chem; 297:309–318.

Landon, L.A. and Deutscher, S.L.; 2003. J Cell Biochem.; 90:509-517.

Larimer B.M., Thomas W.D., Smith G.P., Deutscher S.L.; 2014. Affinity maturation of an ERBB2-targeted SPECT imaging peptide by in vivo phage display. Mol Imaging Biol.; 16(4):449-458.

Lee-Hoeflich S.T., Crocker L., Yao E., Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM.; 2008. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. Cancer Res.; 68:5878-5887.

Lowman, H. B., Bass, S. H., Simpson, N., and Wells, J. A.; 1991. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. Biochem.; 30;10:832–838.

Lub-de Hooge MN, Kosterink JGW, Perik PJ, Nijhuis H, Tran L, Bart J, Suurmeijer AJ, de Jong S, Jager PL, de Vries EG.; 2004. Preclinical characterisation of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab. Br J Pharmacol.; 143(1):99-106. doi:10.1038/sj.bjp.0705915.

Makowski, L.; 1992. Terminating a macromolecular helix, Structural model for the minor proteins of bacteriophage M13. J Mol Biol.; 228:885–898.

- Malgorzata M.S., Breen K., Rønning S. B., Pedersen N.M., Bertelsen V., Stang E. and Madshus I.H.;2012. The oncoprotein ErbB3 is endocytosed in the absence of added ligand in a clathrin-dependent manner. *Carcinogenesis*, 33(5):1031-1039.
- Mattoon D., Lamothe B., Lax I., Schlessinger J.; 2004. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3 K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol.*; 2:24 doi:10.1186/1741-7007-2-24
- Mazzi U.; 2007. Technetium in medicine. Technetium- 99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. Springer (ed Ilse Zolle). Primera edición, Viena, Austria.
- McCaffery J. and Schofield D.; 2015. Identification of optimal protein binders through the use of large genetically encoded display libraries. *Curr Opin Chem Biol.*; 26:16-24.
- Meyer Damon L., Schultz Jody, Lin Yukang, Henry Andrew, Sanderson James, Jackson Jeffrey M., Goshorn Steve., Rees Anthony R, and Graves Scott S.;2001. Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* ; 10(3): 491–503.
- Mori, T.; 2004. Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr Pharm Des.*; 10:2335–2343.
- Mukherjee, A., Badal, Y., Nguyen, X. T., Miller, J., Chenna, A., Tahir, H., Newton A, Parry G, Williams S.;2011. Profiling the HER3/PI3K pathway in breast tumors using proximity-directed assays identifies correlations between protein complexes and phosphoproteins. *PLoS One* 6, e16443.
- Oktavi S.M. and Maeckev H.R., 2014. Peptides for Nuclear Medicine Therapies: Chemical Properties and Production. En: *Therapeutics Nuclear Medicine*. Editor: Baum R.P. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. Berlin Heidelberg 2014, 105-123.
- Peletskaya EN, Glinsky VV, Glinsky GV, Deutscher SL and Quinn TP; 1997. *J. Molec. Biol.* 270: 374–384.
- Petrenko, V. A. and Smith, G. P.; 2000. *Protein Eng.* 13: 589-592.
- Prigent, S. A., Lemoine, N. R., Hughes, C. M., Plowman, G. D., Selden, C., & Gullick, W. J.;1992. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 7: 1273–1278.
- Reilly, R. M., Sandhu, J., Alvarez-Diez, T. M.,; 1995. Problems of delivery of monoclonal antibodies. *Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions*. *Clin.Pharmacokinet*; 28: 126–142.
- Riechmann, L. and Holliger, P.;1997. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. *Cell* 90:351–360.

- Ritchie, B.C.; 2003. *Transfus Apher Sci.* 29: 259-267.
- Rubin I, Yarden Y.; 2001. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* ;12:S3 -8.
- Scott, J. K.: 2001, Barbas, C. F., III; Burton, D. R.; Scott, J.K., Silverman, G.J. (eds.), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 4.1-4.13.
- Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, and Lemmon MA; 2010. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:7692–7697.
- Smith G.P.; 1985. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virian surface. *Science*; 228:315-317.
- Smith G.P. and Petrenko V.A.; 1997. Phage Display. *Chem Rev.*; 97(2): 391-410.
- Smith G.P., and Scott J.K.; 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*; 217:228-257; *Gene*, 128: 1-2.
- Stern M. and Herrmann R.; 2005. *Crit Rev Oncol Hematol.*; 54:11–29.
- Takikita, M., Xie, R., Chung, J. Y., Cho, H., Ylaya, K., Hong, S. M., Moskaluk CA, Hewitt SM; 2011. Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 9, 126 doi: 10.1186/1479-5876-9-126.
- Vasallo JA, Barrios E, De Stefani E, Ronco A; 2011. II Atlas de Incidencia del Cáncer en Uruguay 1996-1997. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer.
- Valadon P., Garnett J.D., Testa J.E., Bauerle M., Oh P., and Schnitzer J.E.; 2006. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting *in vivo*. *PNAS*;103(2):407-412.
- Wark, P.A.; 2002. *J Drugs* 5: 586-589.
- Weiss RB, Woolf SH, Demakos E.; 2003. Natural history of more than 20 years of node positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: A study by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*; 21:1825–1835.
- Xue C., Liang F., Mahmood R., Vuolo M., Wyckoff J., Qian H., Tsai K.L., Kim M., Locker J., Zhang Z.Y., Segall J.E.; 2006. ErbB3-Dependent Motility and Intravasation in Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.*; 66(3): 1418-1426.
- Zurita, A.J., Arap, W. and Pasqualini, R.; 2003. *J Control Release*; 91: 183-186.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2> (Mayo 2015)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> (Mayo 2015)

## 7. Lista de soluciones, buffers y medios de cultivo

### Buffers y medios

#### Buffer ACINI

7.013 g/mL NaCl, 0.298 g/mL KCl, 0.296 g/mL MgSO<sub>4</sub>, 0.163 g/mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.573 g/mL HEPES

#### Buffer de elución

HCl 0.1 N, el pH se ajustó a 2.2 con glicina, 1mg/mL de solución de BSA, 0.1 mg/mL de rojo fenol

#### Buffer carbonato de sodio 0.1mM pH=9.5

45.3 mL de una solución 84 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 18.2 mL de una solución 106g /L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se lleva a volumen de 1L con agua destilada.

#### Buffer fosfato (PBS) 5mM pH=7

2.31 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.54 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se llevó a un volumen de 100mL con agua destilada y se autoclavó por 30 minutos.

#### BSA

Se realizó una solución 50mg/mL de BSA (Sigma A-2153) en agua autoclavada, se filtró por filtro de 0.4 µm y se mantiene a 4°C.

#### Buffer Formalin (10%)

4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mL de formaldehido al 37%. Se llevó a 1000 mL con agua destilada.

#### Estreptomina (50 mg/mL stock)

Se disolvió 0.6 g de sulfato de estreptomina en 10.5 mL de agua destilada. Se autoclavó en un tubo falcom de 15 mL, se guardó a 4 °C.

#### Kanamicina (100 mg/mL stock)

Se preparó una solución 100 mg/mL de sulfato de Kanamicina en agua destilada. Se ajustó el pH a 7 con NaOH, se filtro de manera de esterilizarlo y se guarda a 4°C.

#### LB (1x)

10 g/L de bacto triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura. Se ajustó el pH a 7 con NaOH, se autoclavó y se guardó a temperatura ambiente.

#### NZY Agar

4g de medios NZY amino, 2g de levadura, 2g de NaCl. Se agregaron 400 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7,5. Posteriormente se agregaron 6 g de agar y se autoclavó por 30 minutos.

#### PEG/NaCl

100 g de PEG 8000, 116.9 g NaCl, 475 mL de agua destilada. Se disolvió, autoclavó y se guardó a 4°C.

#### Solución de bloqueo

0.1 M de NaHCO<sub>3</sub>, Solución 5 mg/mL de BSA, 0.1 µg/mL de estreptoavidina, 0.02% NaN<sub>3</sub>.

#### TB

2.8 g de triptona, 4.8 g de levadura, 800 µL de glicerol. Se llevó a 180 mL con agua destilada, se autoclavó por 30 minutos. Cuando el medio se encontró frío se agregaron 10 mL de buffer fosfato.

#### TBS

250 mL Tris 1 M, 150 mL NaCl 5 M. Se llevó a 5L con agua destilada.

#### TBS 1X

50 mM Tris.HCl pH =7.5, 150 mM NaCl

### TBS/gelatina

Se autoclavó 0.1 g de gelatina en 100 mL de TBS. Posteriormente se agitó suavemente de manera de disolver la gelatina.

### TBS/Tween

200 vol de TBS, 1 vol Tween 20. La concentración final fue de 0.5% v/v.

### TTBS

50 mL Tween 20, 300 mL NaCl 5M, 500 mL Tris 1M. Se llevó a 10 L con agua destilada.

### TTDBA

Al buffer TBS/Tween se agregó BSA para obtener una solución 1mg/mL y  $\text{NaN}_3$  al 0.02%.

### Tetracilina (20 mg/mL stock)

En un erlenmeyer de 100 mL estéril se autoclavaron 40 mL (50.4g) de glicerol. Una vez a temperatura ambiente se agregó una solución filtrada de 40 mg/mL de tetraciclina en agua destilada. Se mezcló suavemente y se coloca a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  fuera de la luz

### **Reactivos para metabolización *in vitro*:**

$\text{MgCl}_2$  (130mM) 10 $\mu\text{L}$

$\text{NADP}^+$  (40mM) 10 $\mu\text{L}$

Glucosa- 6- fosfato (350mM) 10 $\mu\text{L}$

Glucosa- 6-fosfato deshidrogenada (50 u/mL) 10  $\mu\text{L}$

Fracción microsomal 242  $\mu\text{L}$ (cedida por el Grupo de Química Medicinal, IQB, Facultad de Ciencias-UdelaR)

Buffer fosfato 0.1 M , 1.5 mM EDTA pH= 7.4 710  $\mu\text{L}$

Fracción citosólica 113  $\mu\text{L}$  (cedida por el Grupo de Química Medicinal, IQB, Facultad de Ciencias-UdelaR)

Buffer fosfato 0.1 M , 1.5 mM EDTA pH= 7.4 840  $\mu\text{L}$

### Solución 130 mM

Se disuelve 0.01238 g de  $\text{MgCl}_2$  en 1mL de agua destilada

### Solución $\text{NADP}^+$ (40 mM)

Se disuelve 0.0306 g en 1mL de buffer fosfato

### Glucosa- 6- fosfato (350 mM)

Se disuelve 0.1190 g en 1mL de buffer fosfato

### Glucosa- 6-fosfato deshidrogenada (50 u/mL)

Se disuelven 0.021930 mg en 220  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato

### Buffer fosfato 0.1 M , 1.5mM EDTA pH= 7.4

0.137 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  PM= 136.09 g/mol

0.695 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  PM= 174.18 g/mol

0.021918 g de EDTA PM= 292.24 g/mol

Se disuelve en 50 mL de agua destilada.

## **8.Lista de abreviaturas**

Ácido dietilentriaminopentaacético:( DTPA)

Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético: (DOTA)

Ácido 6-hidrazinonicotínico: (HYNIC)

Ácido trifluoroacético: (TFA)

Acetonitrilo: (ACN)

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

ADN simple hebra: (ADNss)

ADN doble hebra: (ADNds)

Adenosín trifosfato: (ATP)

Amfiregulina: (AR)

Anticuerpos monoclonales recombinantes: (mAb)

Anticuerpo anti-Fc murino derivatizado con HRP: (goat anti-mouse IgG-HRP)

3-(*p*-Benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina-Cy5: (tetrazina-Cy5)

Bisfosfato de fosfatidilinositol : (PIP2)

Betacelulin: (BTC)

Dimetil sulfóxido: (DMSO)

Epigen: (EPG)

Epiregulin: (EPR)

*Eschericia coli* : (*E. coli*)

Espaciador glicina-alanina-cisteína: (GAC)

Estreptoavidina conjugada a Oregon green: (SA-488)

Estreptoavidina derivatizada con HRP: (SA-HRP)

Fracción extracelular de la proteína ErbB3: (ErbB3 –ECD)

Fosfatidilinositol 3-quinasa: (PI3K)

Fluorenilmetiloxicarbonil: (FMOC)

High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía líquida a altas presiones: (HPLC)

Medida de densidad óptica: (DO)

Neuregulinas: (NRGs)

Receptores del factor de crecimiento epidérmio: (EGFRs)

Suero fetal bovino: (SFB)

*Single Photon Emission Computed Tomography*, Tomografía de emisión por fotón único:  
(SPECT)

Trans-Cicloocteno-NHS ester: (NHS-TCO)

Trifosfato de fosfatidilinositol: (PIP3)